Wed. Sep 8, 2021

Oral(first day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Tomomi Koshiyama (Ritshumeikan University)

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

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

hiroaki hagiwara[1], *Taisei Iwabuchi[1], eriho fujii[2], tsuyoshi takahashi[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Gunma University), 2. Science and Technology, Gunma University)

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

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

*Hiroshi Inaba[1], Yurina Sueki[1], Takashi Iwasaki[2], Arif Md. Rashedul Kabir[3], Akira Kakugo[3], Kazuki Sada[3], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, 3. Graduate School of Science, Hokkaido University)

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

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

*Takayuki Miki[1], Masahiro Hashimoto[1], Hiroki Takahashi[1], Keigo Kajiwara[1], Sae Nakayama[1], Taichi Nakai[1], Hisakazu Mihara[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

Oral(first day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Tsutsumi (Tokyo Institute of Tech.)

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

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

*Rie Wakabayashi[1], Ghazian Dzaky Syahid Fathullah[1], Ayato Higuchi[1], Noriho Kamiya[1,2], Masahiro Goto[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

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

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

*Shinichi Sato[1], Keita Nakane[2], Tatsuya Niwa[3], Michihiko Tsushima[4], Hideki Taguchi[3], Hiroyuki Nakamura[4], Shusuke Tomoshige[2], Minoru Ishikawa[2] (1. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 4. Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology)

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

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

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

Oral(first day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Osami Shoji (Nagoya Univ.)

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

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

*Satoshi Abe[1], Junko Tanaka[1], Takafumi Ueno[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

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

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

*Yuki Hishikawa[1], Basudev Maity[1], Michito Yoshizawa[2], Masakazu Morimoto[3], Satoshi Abe[1], Takafumi Ueno[1] (1. School of Life Science & Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Laboratory for Chemistry & Life Science, Tokyo Institute of Technology, 3. Department of Chemistry, Rikkyo University)

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

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

*Yoshitaka Saga[1], Madoka Yamashita[1], Aiko Tanaka[1], Yuji Otsuka[1], Yuto Masaoka[2], Tsubasa Hidaka[2], Yutaka Nagasawa[2] (1. Faculty of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University)

Oral(first day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Kenjiro Hanaoka (Keio University)

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

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

*Toshiyuki Kowada[1,2,3], Rong Liu[2], Yuyin Du[3], Toshitaka Matsui[1,2,3], Shin Mizukami[1,2,3] (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Faculty of Science, Tohoku University)

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

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

*Kazuya Matsuo[1], Ryota Uehara[2], Takashi Kikukawa[2], Nobuyuki Tamaoki[1] (1. Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, 2. Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University)

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

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

*Masafumi Minoshima[1], Ryu Hashimoto[1], Souhei Sakata[2], Fumihito Ono[2], Kazuya Kikuchi[1,3,4] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Osaka Medical and Pharmaceutical University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University, 4. Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University)

Oral(first day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Shinobu Ito (Osaka Univ.)

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

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

*Takashi Matsuo[1], Naoki Akiyama[1], Catur Jatmika[1], Ibuki Nakamura[1], Shun Hirota[1], Hiroyasu Yamaguchi[2] (1. Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, Osaka University)

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

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

*Kengo HANAYA[1], Kaho YAMOTO[1], Shuhei HIGASHIBAYASHI[1], Takeshi SUGAI[1] (1. Faculty of Pharmacy, Keio University)

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

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

*Fumihiro Ishikawa[1], Sho Konno[2], Chiharu Uchida[1], Takehiro Suzuki[3], Katsuki Takashima[1], Naoshi Dohmae[3], Hideaki Kakeya[2], Genzoh Tanabe[1] (1. Faculty of Pharmacy, Kindai University, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 3. Biomolecular Characterization Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science)

Oral(first day)

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

Nucleic acids

Chair: Yoshiya Ikawa (Toyama Univ.)

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

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

*Keiji Murayama[1], Yuuhei Yamano[2], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. The Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University)

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

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

*Koki MAKINO[1], Hiroyuki ASANUMA[1], Hiromu KASHIDA[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

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

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

*Yusuke Takezawa[1], Hanci Zhang[1], Akira Suzuki[1], Keita Mori[1], Lingyun Hu[1], Mitsuhiko Shionoya[1] (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Oral(first day)

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

Nucleic acids

Chair: Tamaki Endo (Konan Univ.)

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

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

*Kazumitsu Onizuka[1,2], Kaoru R Komatsu[3], Ryosuke Nagasawa[1,2], Yutong Chen[1,2], Emi Miyashita[3], Shunya Ishikawa[1,2], Kanna Ojima[1,2], Hirotaka Murase[1], Mamiko Ozawa[1], Hirohide Saito[3], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. Graduate school of science, Tohoku University, 3. CiRA, Kyoto University)

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

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

*Tatsuya Nishihara[1], Yuto Motohashi[1], Shuhei Moritani[1], Momoka Yajima[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Aoyama Gakuin University)

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

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

*Keisuke Fukunaga[1], Yohei Yokobayashi[1] (1. OIST)

Oral(first day)

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

Nucleic acids

Chair: Hiromu Kashida (Nagoya Univ.)

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

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

*Yuichiro Aiba[1], Masanari Shibata[1], Kota Ito[1], Masaki Hibino[1], Shinya Ariyasu[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

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

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

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

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

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

*Peng Lin[1], Huyen Dinh[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

Oral(first day)

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

Nucleic acids

Chair: Kunihiko Morihiro (The University of Tokyo)

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

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

*Radhika Biyani[1], Masahiro Takagi[1], Manish Biyani (1. School of material Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

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

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

*Maho Koda[1], Ayako Koto[2,3], Shuto Yajima[3], Hiroaki Sakamoto[3], Eiichiro Takamura[3], Shin-ichiro Suye[3] (1. Faculty of Engineering, University of Fukui, 2. NICCA CHEMICAL CO.,LTD, 3. Graduate School of Engineering, University of Fukui)

Oral(first day)

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

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Ikuhiko Nakase (Osaka Prefecture University)

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

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

*Takuya Terai[1], Wenchao Zhu[1], Dazhou Cheng[1], Yusuke Nasu[1], Robert E. Campbell[1,2] (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, University of Alberta)

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

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

*Ayana Yamagishi[1], Akane Nagata[2], Chikashi Nakamura[1,2] (1. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

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

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

*Ashok Zachariah Samuel[1], Horii Shumpei[2,3], Takuji Nakashima[1], Masahiro Ando[1], Naoko Shibata[1], Haruko Takeyama[1,3,4,5] (1. Research organization for nano and life innovation, Waseda University, 2. Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 3. CBBD-OIL, AIST-Waseda University, 4. Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, 5. Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

Oral(first day)

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

Analysis, Measurement, Sensor devices

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

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

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

*Kanji Miyabe[1,2], Momoko Umeda[1], Shunta Inaba[2] (1. College of Science, Rikkyo University, 2. Graduate School of Science, Rikkyo University)

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

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

*Takuma Otsuki[1], Yasumasa Takenaka[2], Tomohiro Hiraishi[2], Hideki Abe[2], Noriyuki Asakura[1] (1. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. RIKEN CSRS)

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

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

*Yusuke Kitamura[1], Shunpei Sakamoto[1], Yuta Nakashima[1], Masaaki Iwatsuki[2], Yasuda Keiihiro[3], Seitaro Kumamoto[1,3], Yousuke Katsuda[1], Hideo Baba[2], Yoshitaka Nakanishi[1], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, 2. Faculty of Life Sciences, 3. OGIC technologies Co., Ltd.)

Oral(first day)

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

Analysis, Measurement, Sensor devices/ DDS

Chair; Noriyuki Asakura (Tokyo Institute of Tech.)

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

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

*Kazuya Inoue[1], Yin Ruikang[1], Shohei Uchinomiya[1], Akio Ojida[1] (1. Faculty of pharmacy, Kyushu University)

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

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

*Yudai Ode[1], Peni Ahmadi[2], Yang Wang[3], Xiaojie Yin[3], Nozomi Sato[3], Hiromitsu Haba[3], Ambara R. Pradipta[1,2], Katsunori Tanaka[1,2,4] (1. Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN, 3. RI Application Research Group, Nishina Center for Accelerator-Based Science, RIKEN, 4. Biofunctional Chemistry Laboratory, Alexander Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University)

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

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

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

Oral(first day)

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

Sugar, Lipids/Medical biology

Chair: Yusuke Kitamura (Kumamoto Univ.)

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

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

*Yoshiyuki Manabe[1,2], Marchetti Roberta[3], Tomoyuki Takebe[1], Satomi Kasahara[1], Yohei Takakura[1], Wataru Nihei[1], Katsunori Tanaka[4,5], Kazuya Kabayama[1,2], Alba Silipo[3], Antonio Molinaro[3], Koichi Fukase[1,2] (1. Graduate School of Science, Osaka University, 2. Project Research Center for Fundamental Sciences, Osaka University, 3. Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II, 4. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, RIKEN, 5. Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology)

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

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

*Hidehiro ITO[1], Arisa Yamauchi[1], Shunsuke Odai[1], Masaki Okamoto[2], Toshiaki Kamachi[1] (1. Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Faculty of Letters, Keio University)

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

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

*Yudai Tabuchi[1], Masumi Taki[1] (1. Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications)

Online Seminar(first day)

12:20 PM - 1:20 PM JST | 3:20 AM - 4:20 AM UTC | Room B Zoom

ASTECH CORPORATION

Chair: Toshihiko Sakurai (Tottori Univ.)

12:20 PM - 1:20 PM JST | 3:20 AM - 4:20 AM UTC

[1B-OS] Basics and Applications of Solid-Phase Synthesis Method: -Design, Side Reactions and Manufacturing-

*Takanori Ikegami[1] (1. ASTECH CORPORATION)

Online Seminar(first day)

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

CEM Japan

Chair: Tomoya Hino (Tottori Univ.)

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

[1C-OS] High-speed epitope mapping and screening of peptides, and peptide synthesizer

*Yokono Ken[1], Koichi Sato[1] (1. CEM Japan)

Poster(first day)

4:50 PM - 5:50 PM JST | 7:50 AM - 8:50 AM UTC | First half number Zoom

Odd (1P-001~1P-047)

[1P-001] Development of chemi-genetic calcium ion indicators based on Photoactive Yellow Protein-tag

*Hayato Kadoya[1], Yusuke Nasu[1], Takuya Terai[1], Robert Earl Campbell[1,2] (1. Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, University of Alberta)

[1P-003] Development of global DNA methylation level sensing system using MBD-GFP and CXXC-TagRFP-T

*Marika Fujita[1], Natsumi Taka[1], Wataru Yoshida[1] (1. Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology)

[1P-005] Establishment of Ni(II)-complex modified phage display method against His-hDM2

*Shota Kakehi[1], Kenta Seko[1], Takayuki Miki[1], Hisakazu Mihara[1] (1. Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[1P-007] Importance of cooperative molecular interactions in the self poly (ADP ribosyl) ation of PARP-1

*Saki Aoki[1], Midori Turuta[1], Sakura Hosoi[1], Masato Mashimo[1], Kayo Sugimoto[1], Mami Hamori[1], Hiroyuki Furusawa[2], Shigeru Negi[1] (1. Faculty of Pharmacy, Doshisha Women University, 2. IPGE, Yamagata University)

[1P-009] An Efficient One-pot Peptide Ligation Strategy Mediated by N-terminal Thiazolidine deprotection using 2-aminobenzamide derivatives

*Koki Nakatsu[1], Hiroshi Murakami[1,2], Gosuke Hayashi[1], Akimitsu Okamoto[3,4] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University, 3. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 4. Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo)

[1P-011] Fluorescence correlation spectroscopic analysis of formation of surface BODIPY-labeled artificial viral capsid under molecular crowding conditions

*Satomi Yano[1], Risako Kobayashi[1], Hiroshi Inaba[1], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[1P-013] Synthesis and O_2 Affinity Control of Recombinant Human Hemoglobin Nanoparticles

*Tatsuhiro Kobayashi[1], Wataru Okamoto[1], Mai Hasegawa[1], Yoshitsugu Morita[1], Teruyuki Komatsu[1] (1. Faculty of Science and Engineering, Chuo University)

[1P-015] Controlling the dynamic assembly of the β-helical protein needle by tip engineering

*Kosuke Kikuchi[1], Tatsuya Fukuyama[2], Takayuki Uchihashi[3], Tadaomi Furuta[1], Yusuke Maeda[2], Takafumi Ueno[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Department of Physics, Kyusyu University, 3. Department of Physics, Nagoya University)

[1P-017] Construction of fluorescent immunosensor for detecting recombinant proteins produced in bioprocess

*Xuerao NING[1], Takanobu YASUDA[1], Bo ZHU[2], 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, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology)

[1P-019] Selective Anchoring of Artificial Lipid-modified Proteins to Membrane Domain and Evaluation of Localization Behavior

*Kazuki Uchida[1], Hiroki Obayashi[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1], Naofumi Shimokawa[2], Masahiro Takagi[2], Noriho Kamiya[1] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. JAIST)

[1P-021] Activation of adenosine A_{2A} receptor from class A GPCR utilizing coordination chemogenetics

*Takuto Sugawara[1], Muneo Tsujikawa[2], Yuta Deen Miura[1], Akinobu Senoo[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-023] Non-Native Reactions Based on Substrate Misrecognition System in Bacteria Expresssing Homologs of P450BM3

*Fumiya Ito[1], Shinya Ariyasu[1], Masayuki Karasawa[1], Joshua Kyle Stanfield[1], Yuya Yokoyama[1], Chie Kasai[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[1P-025] Enhancing the Solubility of Monobody by Optimizing C-terminal Sequence − Toward Development of SARS-CoV-2 Neutralizing Proteins

*Shun Umemoto[1], Hikaru Saiki[1], Taishi Kondo[1], Tomoshige Fujino[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[1P-027] A chemogenetic platform for manipulating plasma membrane signaling

*Sachio Suzuki[1], Yuka Hatano[1], Akinobu Nakamura[2], Masaru Yoshikawa[1], Tatsuyuki Yoshii[3], Kazuhiro Aoki[2], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 2. National Institute for Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences, 3. Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University)

[1P-029] Development of artificial metalloenzymes toward stereodivergent Michael addition reactions

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

[1P-031] Identification of synaptic cleft-resident proteins with photo-proximity labeling

*Hayata Utsunomiya[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-033] Analysis of Interaction of a Highly Adhesive Protein to Material Surfaces by Molecular Dynamics Calculation

*Jun Sasahara[1], Atsuo Suzuki[1], Kazushi Fujimoto[1], Susumu Okazaki[2], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

[1P-035] The development of immunotherapeutics that redirect endogenous antibodies to cancer cells

*Hiroshi Tagawa[1], Takshi Mori[1,2], Akihiro Kishimura[1,2], Yoshiki Katayama[1,2] (1. Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, 2. Graduate School of Engineering, Kyushu University)

[1P-037] Synthesis of Ribbon-like Gold Nanocrystals Using A Nuclear Localization Signal Tethering Peptide as A Template

*Kazutoshi Ishida[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[1P-039] Development of a High-throughput Screening Platform for Directed Evolution of Myoglobin Reconstituted with an Iron Corrole Complex

*Koki Takeuchi[1], Shunsuke Kato[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[1P-041] Construction of Hydrogel Containing Trimeric Coiled-coil Peptides with Azido Groups at N-terminal Sites

*Takumi Ikeda[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[1P-043] Development of novel genome-scale DNA synthesis technology using chemical methods

*Kohei Nomura[1], Kaoru Onda[1], Yiuno Gao[1], Hirotaka Murase[1], Kosuke Nakamoto[1], Masahito Inagaki[1], Haruka Hiraoka[1], Naoko Abe[1], Fumitaka Hashiya[2], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,3,4] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Material Science, Nagoya University, 3. CREST, Japan Science and Technology Agency, 4. Institute for Glyco-core Research (iGCORE))

[1P-045] Discovery of non-canonical structures formed by non-canonical rules

*Rio Matsumoto[1], Yousuke Katsuda[1], Shin-ichi Sato[2], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[3], Motonari Uesugi[2], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University, 2. Institute for Chemical Research, Kyoto University, 3. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University)

[1P-047] *In vitro* selection system of ribozymes adaptable to μ-droplet compartment: toward artificial evolution of ribozyme quaternary structures

*Misato Ueda[1], Shigeyoshi Matsumura[1,2], Yoshiya Ikawa[1,2] (1. Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, 2. Graduate School of Innovative Life Science, University of Toyama)

Poster(first day)

4:50 PM - 5:50 PM JST | 7:50 AM - 8:50 AM UTC | Second half number Zoom

Odd (1P-049~1P-093)

[1P-049] Metal-dependent activity regulation of a compact-sized DNAzyme containing an imidazole-4-carboxylate base pair

*Lingyun Hu[1], Yusuke Takezawa[1], Takahiro Nakama[1], Mitsuhiko Shionoya[1] (1. The University of Tokyo)

[1P-051] Development of weakly acidic environment-responsive unnatural nucleobase and its application to cancer cell-selective DNA aptamer

*Yui Nemoto[1], Kunihiko Morihiro[1], Akimitsu Okamoto[1,2] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo)

[1P-053] Development of pyrene aggregates using DNA backbone for high-brightness CPL expression

*Yuka Ito[1], Takahiro Kakuta[2], Tomoki Ogoshi[3], Hiroyuki Asanuma[1], Hiromu Kashida[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, 3. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-055] Development of oligonucleotide-based artificial partial agonists for a growth factor receptor and evaluation of their biological effects

*Momoko Akiyama[1], Masataka Yanagawa[2], Mitsuhiro Abe[2], Michio Hiroshima[2,3], Yasushi Sako[2], Ryosuke Ueki[1], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. RIKEN CPR, 3. RIKEN BDR)

[1P-057] Cancer-cell-selective toxicity of dicopper complexes: effect of linker size on DNA targeting enhancement of DAN cleavage activity and cytotoxicity

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

[1P-059] Enhanced Stability and Structural Changes of DNA Origami by Enzymatic Ligation

*Kirankumar Krishnamurthy[1], Arivazhagan Rajendran[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

[1P-061] Properties of DNAbinding proteins modified with solvatochromic fluorophore

*Mariko Aso[1], Kaori Tabata[1], Yukiko Abe[1], Yosuke Taniguchi[1], Shigeki Sasaki[2] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 2. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University)

[1P-063] Development of double-duplex invasion using ultrafast DNA photo-cross-linking

*Ami Shimabara[1], Ayumu Hirano[1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute Science and Technology)

[1P-065] Detection of DNA and RNA by two peptide nucleic acids modified with a pyrene group.

*Koki Ishii[1], Sakura Tsuchitani[1], Miyu Toyama[1], Mizuki Kitamatsu[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University)

[1P-067] Evaluation of the effect of mechanical stress on cell arraying using Microcavity Array

*Chikara Suzuki[1], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Department of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[1P-069] Development of fluorescent chemical probes compatible with tissue-clearing, and their application for 3D imaging of tumor hypoxia

*Daichi Sakamoto[1], Tamura Iori[1], Bo Yi[1], Yutaro Saito[1], Naoki Yamada[1], Yoichi Takakusagi[2], Shimpei Kubota[3], Kazuki Tainaka[4], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, 3. Molecular Neuroimmunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, 4. Development of System Pathology for Neurological Disorders, Center for Bioresources, Brain Research Institute, Niigata University)

[1P-071] Rapid and precise antigen detection using Quenchbody by fluorescence polarization

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

[1P-073] Rapid Discrimination of Food-contaminated microorganisms based on Colony Fingerprinting using a Line Imaging Sensor

*Yusuke Tanaka[1], Hiroya Kohketsu[1], Yoshiaki Maeda[1], Tae-Kyu Lim[2], Manabu Harada[2], Tomoko Yoshino[1], Tadashi Matsunaga[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Department of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Malcom Co., Ltd)

[1P-075] Nucleolus Imaging in Plant Cells Using NIR-fluorescent Dyes Conjugated with a Cell Penetrating Peptide

*Yuki Sakai[1], Natsuki Nakashima[1], Takuya Nagae[1], Yoshikatsu Sato[2], Tetsuya Higashiyama[2,3], Masayasu Taki[2], Shigehiro Yamaguchi[1,2] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University, 3. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

[1P-077] Contribution of Tunneling Effect in Alkane Oxidation by Compound I Model Complex

*Yuma Morimoto[1], Kosuke Fukui[1], Hiroshi Fujii[2], Shinobu Itoh[1] (1. Osaka Univ., 2. Nara Women's Univ.)

[1P-079] Analysis of Structural Conversion of Bacteriochlorophyll *b* from the Purple Photosynthetic Bacterium *Blastochloris viridis*

*Yusuke Takashima[1], Shiori Nakagawa[1], Yoshitaka Saga[1] (1. Faculty of Science and Engineering, Kindai University)

[1P-081] Development of antioxidant nanozymes with numerous coordination sites similar to the active site of antioxidant enzyme Cu,Zn-SOD

*Hiroki Nakahara[1], Mami Okamura[1], Akiko Nomura[1], Masahito Kodera[1], Yutaka Hitomi[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[1P-083] Studies on association of a human catalytic antibody light chain taht oligomerizes

*Takahiro Sakai[1], Fitriana Wahyu[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Emi Hifumi[2], Taizo Uda[3], Shun Hirota[1] (1. Division of Materials science, Nara Institute of Science and Technology, 2. Research Promotion Institute, Oita University, 3. Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies)

[1P-085] Double Click Reagent Directed to Cell Surface

*Kohei Kitagawa[1], Moeka Yoshinaga[1], Masayuki Tera[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[1P-087] Invasion of enveloped artificial viral capsid into cells via membrane fusion

*Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Yoshihiro Sasaki[2], Kazunari Akiyoshi[2], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-089] Development of Perfluorocarbon-encapsulated Polymer Nanoparticle as ^{19}F MRI Contrast Agents

*Yuki Konishi[1], Fuminori Sugihara[2,3], Masafumi Minoshima[1], Wataru Nagaike[4], Takayuki Uchihashi[4], Kazuya Kikuchi[1,2,5] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ., 3. Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 4. Graduate School of Science, Nagoya University, 5. Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University)

[1P-091] Synthesis of Hemoglobin-Albumin Cluster Incorporating Antioxidant Reagents

*Marika Ishiamru[1], Taiga Yamada[1], Teruyuki Komatsu[1] (1. Faculty of Science and Engineering, Chuo University)

[1P-093] Analysis of circulating tumor cells in bloods derived from patients with urothelial carcinoma based on MCA/GCM method

*Kurumi Nakazawa[1], Ryo Negishi[1], Takatsugu Okegawa[2], Yu Nakamura[2], Mayumi Deki[2], Midori Watanabe[1], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Department of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Department of Urology, Kyorin University School of Medicine)

Poster(first day)

5:50 PM - 6:50 PM JST | 8:50 AM - 9:50 AM UTC | First half number Zoom

Even (1P-002~1P-048)

[1P-002] Development of CpG methylation level measurement system using Methyl-CpG-binding domain fused luciferase

*Ayano Goto[1], Wataru Yoshida[1] (1. Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology)

[1P-004] In Cell analysis of protein-protein interaction accompanied by cluster formation by Yn-designed peptides

*Masahiro Hashimoto[1], Takayuki Miki[1], Taichi Nakai[1], Hisakazu Mihara[1] (1. Tokyo Institute of Technology, School of Life Science and Technology)

[1P-006] *In silico* design of growth factors with modulated agonistic activity

*Hanrui Liu[1], Daisuke Kuroda[1], Ryosuke Ueki[1], Shinsuke Sando[1] (1. The University of Tokyo)

[1P-008] Development of antimicrobial peptide foldamers introducing non-proteinogenic amino acids

*Motoharu Hirano[1,2], Chihiro Saito[3], Ryuji Kawano[3], Takashi Misawa[2], Yosuke Demizu[1,2] (1. Grad. Sch. Med. Life. Sci., Yokohama city Univ., 2. NIHS, 3. Dept. Biotech. Life Sci., Tokyo Univ. Agr. Tech.)

[1P-010] Structural stabilization of microtubules by photocrosslinking of a Tau-derived peptide

*Soei Watari[1], Hiroshi Inaba[1], Arif Md. Rashedul Kabir[2], Akira Kakugo[2], Kazuki Sada[2], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Science, Hokkaido University)

[1P-012] Extended JAZ degron sequence for plant hormone binding in jasmonate co-receptor of tomato

*Misuzu Nakayama[1], Rina Saito[2], Kengo Hayashi[1], Haruna Nomoto[1], Yousuke Takaoka[1], Hiroaki Saito[3], Souhei Yamagami [2], Toshiya Muto[1], Minoru Ueda[1,2] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University)

[1P-014] Structure analysis of intrinsically disordered protein using in vivo protein crystal

*Mariko Kojima[1], Satoshi Abe[1], Takafumi Ueno[1] (1. Life science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[1P-016] Development of lasso grafted Venus-based CD24—Siglec-10 immune checkpoint inhibitor

*Wei-En Huang[1], Naohiro Terasaka[1], Hiroaki Suga[1] (1. Faculty of Science, The University of Tokyo)

[1P-018] Analysis of interaction site between Dicer-PAZ/Platform and dsRNA by using photo crosslink reaction

*Shunya Suzuki[1], Noriko Yokota[1], Hiroki Tsuda[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Engineering of Biomolecular, Nagoya University)

[1P-020] Control the AMPA-Type Glutamate Receptor Activity Utilizing the Molecular Stopper Approach

*Yuta Deen Miura[1], Kento Ojima[2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-022] Directed Evolution and Structure Analysis of P450BM3 Utilizing Natural Products as Decoy Molecules

*Yuya Yokoyama[1], Masayuki Karasawa[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Hiroshi Sugimoto[2,3], Osami Shoji[1,2] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. JST CREST, 3. RIKEN Spring-8)

[1P-024] Structural Effects of Conjugation between Thiol and Functional Groups on Accelerating Oxidative Protein Folding

*Shunsuke Okada[1], Motonori Matsusaki[2], Masaki Okumura[3], Takahiro Muraoka[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. IAMS, Tokushima University, 3. FRIS, Tohoku University, 4. GIR, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[1P-026] Improvement of the translation efficiency with a Ser/Leu-swapped genetic code by using native and *in vitro* transcribed tRNAs

*Tomoshige Fujino[1], Masahiro Tozaki[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future

Society, Nagoya University)

[1P-028] Reversible control of lipid metabolism in living cells by chemogenetic membrane contact manipulation

*Masaru Yoshikawa[1], Moeka Ajiki[2], Fubito Nakatsu[3], Shinya Tsukiji[1] (1. Department of Nanopharmaceutical science, Nagoya Institute of Technology, 2. Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 3. Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University)

[1P-030] Development of Fixation-driven Chemical Crosslinking Probes for Pharmacokine- tic Analysis in Brain

*Akihiro Tsushima[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-032] Construction of a fusion protein consisting of a PET hydrolase and an adhesive protein

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

[1P-034] Development of inkjet system-based intracellular delivery technology using cell-penetrating peptides

*Mika Omura[1], Ikuhiko Nakase[1,2] (1. College of Life, Environment, and Advanced Sciences, Osaka Prefecture University, 2. Graduate School of Science, Osaka Prefecture University)

[1P-036] Synthesis of A Peptide-Based Drug Carrier for Facilitating Endosomal Escape by Fusogenic Sequence

*Shogo Hirota[1], Takahito Imai[1], Yamasaki Masayuki[1], Tomizaki Kin-ya[1] (1. Ryukoku University)

[1P-038] Synthesis of Gold Nanorods Modified with Mitochondrial Targeting Signal Peptides

*Shoya Nakamura[1], Takahito Imai[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[1P-040] Preparation of Hydrogel Containing a Protein Unit Modified by Two Different Fluorophores

*Hiroki Innami[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[1P-042] Condensation of Antibodies and Macromolecule Delivery Peptides into Liquid Droplets by Liquid-Liquid Phase Separation and Intracellular Delivery of Antibodies

*Takahiro Iwata[1], Hisaaki Hirose[1], Kentarou Sakamoto[1], Yusuke Hirai[1], Jan Vincent V. Arafiles[1], Misao Akishiba[1], Miki Imanisi[1], Shiroh Futaki[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[1P-044] Mechanistic Study of Irreversible Inhibition of Reverse Transcriptase with 2′-β-propargyl-seleno Nucleoside Analogue

*Yuki Yoshida[1], Yushi Nimi[1], Daichi Fushihara[1], Hirotaka Murase[1], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,2,3] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University, 2. JST CREST, 3. iGCORE)

[1P-046] Pursuit of shorten and stability of Staple oligomer for application to a nucleic acid medicine

*Tomoki Kida[1], Yousuke Katsuda[1], Takuto Kamura[1], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[2], Shin-ichi Sato[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[1P-048] Improvement of the method for preparing super-giant liposomes to construct a giant artificial cell capable of efficient gene expression in the interior

*Hajime TAKAHASHI[1], Atsushi OGAWA[1] (1. Proteo-Science Center, Ehime University)

Poster(first day)

5:50 PM - 6:50 PM JST | 8:50 AM - 9:50 AM UTC | Second half number Zoom

Even (1P-050~1P-094)

[1P-050] Investigation for effect of epigenetic modification on LLPS of nucleic acid

*Mitsuki Tsuruta[1], Daisuke Miyoshi[1] (1. Konan univ. FIRST)

[1P-052] Development of dicopper(II) complexes exerting cancer-cell selective toxicity: electronic effect of substituents

*Jin Ueno[1], Machi Hata[1], Yutaka Hitomi[1], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[1P-054] Development of replication, transcription, and reverse transcription of L-*a*TNA by non-enzymatic chemical ligation

*Hikari Okita[1], Keiji Murayama[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[1P-056] Ratiometric SERS assays for reliable quantification of nucleic acids using SERS probes as internal standard.

*Kenta Sasaki[1], Ryo Ota[1], Tomonori Waku[1], Akio Kobori[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology)

[1P-058] DNA Origami as scaffolds to assemble quantifiable channel proteins on artifical organelles

*Shiwei Zhang[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Kyoto university)

[1P-060] Development of Functional Oligonucleotide for Highly Sensitive Metabolite Detection

*Yuto Motohashi[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[1P-062] Development of novel FISH by ultrafast RNA photo-cross-linking targeting difficult-to-detect regions in E. coli 16S rRNA

*Junichi Mihara[1], Nanami Watanabe[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. School of Advanced Institute Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[1P-064] Development of novel visible light-responsive DNA photo-cross-linker containing pyranocarbazole derivatives

*Yasuyuki narita Narita[1], Junichi Mihara[1], Shinobu Sasago[1], Kenzou Fujimoto[1] (1. School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[1P-066] Guanine-Tethered Antisenses Inhibit Protein Synthesis Through G-Quadruplex Formation

*Shuhei Shiroto[1], Masaki Hagihara[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University)

[1P-068] Development of Luminescent Probe for Visualization of Endogenous RNA in Living Single Cells

*Masatoshi Eguchi[1], Hideaki Yoshimura[1], Yoshibumi Ueda[1], Takeaki Ozawa[1] (1. School of Science, The University of Tokyo)

[1P-070] Development of evaluation method for intercellular cross-linking abilities to obtain functional bispecific antibodies

*Atsushi MAEJIMA[1], Kenta Ishibashi[1], Hyonchol Kim[1,2], Izumi Kumagai[1], Ryutaro Asano[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[1P-072] Development of cell-arraying device filled with silica particles for capturing cancer cell-secreted proteins toward single cell analysis

*Rina Nishikawa[1], Kento Ota[1], Yoshiaki Maeda[1], Keiichi Hatakeyama[2], Tomoko Yoshino[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Department of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Medical Genetics Division, Shizuoka Cancer Center Hospital and Research Institute)

[1P-074] Exploitation of a hydrolase as an orthogonal enzyme to human cells for bioanalysis

*Ryosuke Kaneko[1], Chuya Tateishi[2], Kenta Tanito[2], Teruki Nii[1,2], Akihiro Kishimura[1,2,3], Takeshi Mori[1,2], Yoshiki Katayama[1,2,3] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. School of SystGraduateems Life Sciences, Kyushu University, 3. International Research Center for Molecular Systems, Kyushu University)

[1P-076] Construction of Redox Responsive Hydrogel Cross-linked by Interaction between Heme and Protein Matrix

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

[1P-078] Optical Properties of Chlorophyll Aggregates Assisted by Chlorophyll-Appended Peptides

*Ma-aya Semba[1], Ryuichi Yamamoto[1], Tomohiro Miyatake[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University)

[1P-080] Protein Encapsulation within an Expanded Self-assembled Hollow Cage

*Risa Ebihara[1], Takahiro Nakama[1], Daishi Fujita[2], Makoto Fujita[1,3] (1. The University of Tokyo, 2. Kyoto University, 3. Institute for Molecular Science)

[1P-082] Design and construction of the three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion

*Kodai Fujiwara[1], Masaru Yamanaka[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Haruki Onishi[1], Takayuki Uchihashi[2], Shun Hirota[1] (1. Division of Materials Science, Nara institute of science and technology, 2. Graduate School of Science, Nagoya University)

[1P-084] Apoptotic activity of ceramide derivative towards living cells

*Koya Tsujimura[1] (1. Graduate School of Science, Kyushu University)

[1P-086] Development of multivalent electrophilic probes for exploring carbohydrate binding proteins.

*Shione Kamoshita[1], Kaori Sakurai[1] (1. Engineering, Tokyo University of Agriculture and technology)

[1P-088] Complex of porphyrin derivatives with polysaccharides for photodynamic therapy

*Keita Yamana[1], Riku Kawasaki[1], kouta Sugikawa[1], Atsushi Ikeda[1] (1. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University)

[1P-090] Creation of a transdermal malaria vaccine using next-generation transdermal absorption technology

*Keisuke Tanaka[1], Kosuke Minamihata[2], Rie Wakabayashi[2,3], Noriho Kamiya[2,3,4], Masahiro Goto[2,3,4] (1. Kyushu University Graduate School of Engineering, 2. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 3. Next Generation Transdermal Absorption Center, 4. Center for Future Chemistry and Innovation)

[1P-092] Transcriptome and genome mutation analysis of non-small cell lung cancer for elucidation of cell diversity in cancer microenvironment after EGFR-TKI treatment

*Miki Yamazaki[1,2], Hiroko Matsunaga[3], Masahito Hosokawa[1,3], Koji Arikawa[3], Naoko Suzuki[3], Takuo Hayashi[4], Haruko Takeyama[1,2,3,5] (1. Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 2. CBBD-OIL, AIST-Waseda University, 3. Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University , 4. Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Department of Human Pathology, Graduate School of Medicine, Juntendo University, 5. Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

[1P-094] Synthesis of An Anthracene Derivative with Selective Gold Recovery Mechanism

*Shungo Teramura[1], Takahito Imai[1], Masahiro Asano[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Department of Materials Chemistry, Ryukoku University)

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)

Fri. Sep 10, 2021

Oral

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Miki Imanishi (Kyoto Univ.)

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

[3A-01] Identification of degraders for epigenetic enzymes

*Yukihiro Itoh[1,2], Tetsuya Iida[1,2], Jiranan Chotitumnavee[1,2], Yukari Takahashi[2], Yasunobu Yamashita[1], Takashi Kurohara[1], Yuka Miyake[1], Makoto Oba[2], Takayoshi Suzuki[1,2] (1. SANKEN, Osaka University, 2. Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine)

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

[3A-02] Coordination chemogenetics for direct activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue

*Kento Ojima[1], Wataru Kakegawa[2], Masayuki Ito[2], Michisuke Yuzaki[2], Itaru Hamachi[1,3], Shigeki Kiyonaka[4] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. School of Medicine, Keio University, 3. ERATO, JST, 4. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

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

[3A-03] Induction of Programmed Cell Death in Cancer Cells by Cyclometalated Iridium(III) Complex-Peptide Hybrids and its Mechanistic Study

*Kenta Yokoi[1], Chandrasekar Balachandran[1,2], Jebiti Haribabu[1], Arisa Koyamada[1], Masakazu Umezawa[3], Koji Tsuchiya[3], Shin Aoki[1,2,3] (1. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2. Research Institute for Biomedical Sciences (RIBS), Tokyo University of Science, 3. Research Institute for Science and Technology (RIST), Tokyo University of Science)

Oral

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Shigeki Kiyonaka (Nagoya Univ.)

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

[3A-04] Construction of Tumor Tissue Models Using Functionalized Peptide Hydrogel Materials for Anticancer Drug Test

*Hiroshi Tsutsumi[1], Yea Jyh Chia[1], Takayuki Miki[1], Hisakazu Mihara[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

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

[3A-05] Improvement of Neutralization Activity for SARS-CoV-2 and Variants of Concerns by Affinity Maturation of Monobody.

*Taishi Kondo[1], Kazuhiro Matsuoka[2], Tomoshige Fujino[1], Shun Umemoto[1], Gosuke Hayashi[1], Yasumasa Iwatani[2,3], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Naoya University, 2. Department of Infectious Diseases and Immunology, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, 3. Division of Basic Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

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

[3A-06] The development of the artificial insulin receptors that have the ability of self-assembly on Au surface.

*Yusuke Murai Murai[1], Hiroya Sato[2], Eiji Arita[2], Takeshi Ikeda[1], Takenori Isida[1], Ryuichi Hirota[1], Akio Kuroda[1], Hisakage Funabashi[1] (1. Hiroshima University, 2. Terumo corporation)

Oral

11:20 AM - 12:00 PM JST | 2:20 AM - 3:00 AM UTC | Room A Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Inaba (Tottori Univ.)

11:20 AM - 11:40 AM JST | 2:20 AM - 2:40 AM UTC

[3A-07] Crucial amino acid residues concerning the catalytic activity of the human super-catalytic antibody (H34 clone) degrading the immune checkpoint PD-1 molecule

*Taizo Uda[1], Testuro Minagawa[2], Hiroaki Taguchi[3], Emi Hifumi[4] (1. ISIT, 2. Graduate School of Engineering, Oita University, 3. Suzuka University of Medical Science, 4. Research Promotion Institute, Oita University)

11:40 AM - 12:00 PM JST | 2:40 AM - 3:00 AM UTC

[3A-08] Study on the production of super catalytic antibody against the conserved sequence of virus and the antiviral effect

*Emi Hifumi[1], Tamami Nonaka[1], Ayuka Tanaka[2], Haruna Tsuda[2], Hiroaki Taguchi[3], Taizo Uda[4] (1. Research Promotion Institute, Oita University, 2. Graduate School of Engineering, Oita University, 3. Suzuka University of Medical Science, 4. Institute of Systems, Information Technologies, and Nanotechnologies)

Oral

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

Nucleic acids

Chair: Tatsuya Nishimura (Aoyama Gakuin Univ.)

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

[3B-01] Development of DNA hybridization-responsive BRET system

*Fumiaki Takano[1] (1. Intelligent Molecules Lab,Kansai University)

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

[3B-02] Real-time tracking of G4 DNA formation by using DNA structure selective dual-color fluorescence “switch-on” probe

*Takashi Sakamoto[1], Zehui Yu[2], Yuto Otani[1] (1. Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University, 2. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

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

[3B-03] Application of Chimeric Artificial Nucleic Acids for Efficient Suppression of Functional RNA for Controlling of Cellular Functions

Masaki Nishijima[1], Masahito Inagaki[3], Nozomu Ishiwata[1], Toshiyuki Sato[1], Akira Yano[1], Hironori Hayashi[2], Yasuyuki Araki[1], Eiichi Kodama[2], *Takehiko WADA[1] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. IRDeS, Tohoku University, 3. Graduate School of Science, Nagoya University)

Oral

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

Nucleic acids

Chair: Takehiko Wada (Tohoku Univ.)

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

[3B-04] Inhibition of miRNA maturation through triplex formation by peptide nucleic acid (PNA) containing unnatural nucleobases

*Tamaki Endoh[1], Nikita Brodyagin[2], Dziyana Hnedzko[2], Eriks Rozners[2], Naoki Sugimoto[1,3] (1. FIBER, Konan University, 2. Binghamton University, The State University of New York, 3. FIRST, Konan University)

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

[3B-05] Unusual topological RNA G-quadruplex formed of RNA duplex: Implications for dimerization of COVID-19 mRNA

*Yan Xu[1], Yi Song[1], Shi-Yu Wang[1] (1. Division of Chemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Miyazaki)

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

[3B-06] Nucleic Binding Selectivity of RGG Domain in TLS/FUS Regulated by Arginine Methylation

*Tatsuki Masuzawa[1], Ryota Yagi[2], Shinnosuke Kawai[2], Takanori Oyoshi[2] (1. Graduate school of Science and Technology, Shizuoka University, 2. Graduate school of Integrated Science and Technology, Shizuoka University)

Oral

11:20 AM - 12:00 PM JST | 2:20 AM - 3:00 AM UTC | Room B Zoom

Nucleic acids

Chair: Takashi Sakamoto (Wakayama Univ.)

11:20 AM - 11:40 AM JST | 2:20 AM - 2:40 AM UTC

[3B-07] Development of Fluorophosphoramidate as a New Biocompatible Transformable Functional Group and its Application as a Phosphate Prodrug for Nucleoside Analogs

*Yasuaki Kimura[1], Yuki Yoshida[1], Fumiaki Tomoike[6], Fumitaka Hashiya[1], Tetsuro Suzuki[7], Shuto Hirota[2], Yuriko Saiki[2], Akira Horii[2], Akiyoshi Hirayama[3], Tomoyoshi Soga[3], Hiroshi Abe[1,4,5] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. School of Medicine, Tohoku University , 3. Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 4. JST CREST, 5. Institute for Glyco-core Research, 6. Department of Life Science, Gakushuin University, 7. School of Medicine, Hamamatsu University)

11:40 AM - 12:00 PM JST | 2:40 AM - 3:00 AM UTC

[3B-08] Development of 4'-thiomodified cyclic dinucleotide analogs

*Mao Kinoshita[1], Noriko Tarashima[1], Noriaki Minakawa[1] (1. Pharmaceutical sciences, Tokushima University)

Oral(first day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Tomomi Koshiyama (Ritshumeikan University)

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

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

hiroaki hagiwara[1], *Taisei Iwabuchi[1], eriho fujii[2], tsuyoshi takahashi[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Gunma University), 2. Science and Technology, Gunma University)

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

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

*Hiroshi Inaba[1], Yurina Sueki[1], Takashi Iwasaki[2], Arif Md. Rashedul Kabir[3], Akira Kakugo[3], Kazuki Sada[3], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, 3. Graduate School of Science, Hokkaido University)

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

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

*Takayuki Miki[1], Masahiro Hashimoto[1], Hiroki Takahashi[1], Keigo Kajiwara[1], Sae Nakayama[1], Taichi Nakai[1], Hisakazu Mihara[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

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

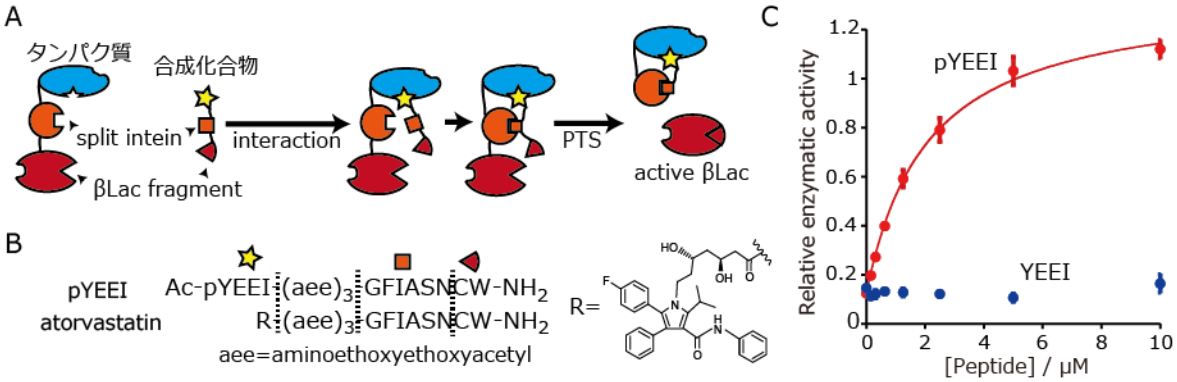
萩原弘顕[1]・○岩渕泰世[1]・藤井絵里帆[2]・高橋剛[1]（[1]群馬大院理工、[2]群馬大理工）

Detection of Synthetic Compound-Protein Interactions Using Artificial Split Intein and β-Lactamase

(Graduate School of Science and Technology, Gunma University[1], Science and Technology, Gunma University[2]) HAGIWARA Hiroaki[1]; IWABUCHI, Taisei[1]; FUJII, Eriho[2]; TAKAHASHI, Tsuyoshi[1]

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

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



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

1) M. Kawase, M. Fujioka, T. Takahashi, *ChembioChem,* **22**, 577-584 (2021)
2) A. S. Aranko *et al.*, *Mol. BioSyst.,* **10**,10, 1023-1034 (2014)
3) J. Hecky, K. M. Müller, *Biochemistry,* **44**, 12640-12654 (2005)

Tau 由来ペプチドを介したタンパク質内包による微小管の構造制御

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

Structural control of microtubules by protein encapsulation using Tau-derived peptide (Graduate School of Engineering, Tottori University[1], Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University[2], Graduate School of Science, Hokkaido University[3]) INABA, Hiroshi[1]; SUEKI, Yurina[1]; IWASAKI, Takashi[2]; KABIR, Arif Md. Rashedul[3]; KAKUGO, Akira[3]; SADA, Kazuki[3]; MATSUURA, Kazunori[1]

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

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

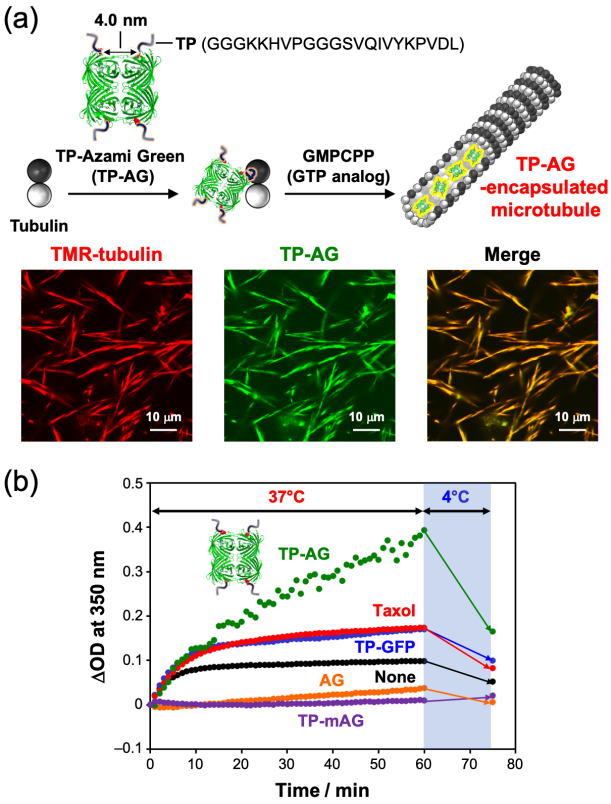


Fig. 1. (a) Encapsulation of TP-conjugated Azami Green (TP-AG) in microtubule and the CLSM images. (b) Effects on changes in turbidity over time caused by tubulin polymerization.

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

©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

両親媒性ペプチドによる細胞内での蛋白質高次構造体の形成

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

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

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

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

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

(1) 細胞内で自己集合する両親媒性ペプチドの設計指針の確立

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

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

(2)光応答的な自己集合性システムの開発

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

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

Oral(first day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Tsutsumi (Tokyo Institute of Tech.)

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

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

*Rie Wakabayashi[1], Ghazian Dzaky Syahid Fathullah[1], Ayato Higuchi[1], Noriho Kamiya[1,2], Masahiro Goto[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

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

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

*Shinichi Sato[1], Keita Nakane[2], Tatsuya Niwa[3], Michihiko Tsushima[4], Hideki Taguchi[3], Hiroyuki Nakamura[4], Shusuke Tomoshige[2], Minoru Ishikawa[2] (1. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 4. Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology)

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

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

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

自己組織化ペプチドファイバーへのタンパク質修飾とワクチン応用

○若林里衣[1]・Syahid Fathullah Ghazian Dzaky[1]・樋口亜也斗[1]・神谷典穂[1,2]・後藤雅宏[1,2]

（[1]九大院工、[2]九大未来化セ）

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

(Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University[2])
WAKABAYASHI, Rie[1]; SYAHID FATHULLAH, Ghazian Dzaky[1]; HIGUCHI, Ayato[1]; KAMIYA, Noriho[1,2]; GOTO, Masahiro[1,2]

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

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

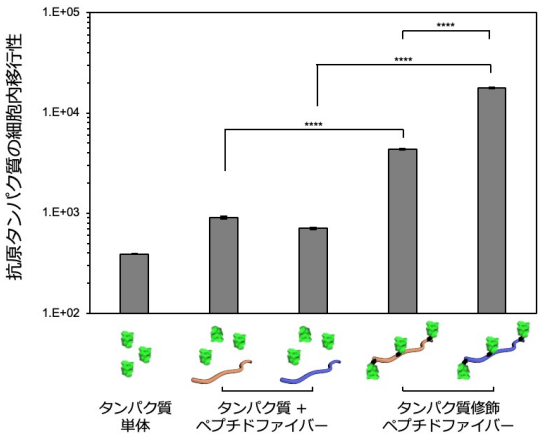


図 1. ペプチドファイバーを用いた抗原タンパク質の細胞内デリバリー. N = 3 wells, mean ± SD, $^{****}p < 0.0001$.

References

[1] O'Hagan *et al.*, *J. Controlled Release*, *190*, 563-579, 2014.

[2] C. L. O'Neill *et al.*, *Acta Biomaterialia*, DOI: 10.1016/j.actbio.2021.05.003.

[3] R. Wakabayashi, *et. al*., *Chem. Commun*., *55*, 640-643, 2019; *Int. J. Mol. Sci*., *22*, 3459, 2021.

©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

一重項酸素を活用したヒスチジン残基化学修飾

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

Histidine Chemical Modification Using Singlet Oxygen (Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University[1], Graduate School of Life Sciences, Tohoku University[2], Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology[3], Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology[4]) SATO, Shinichi[1]; NAKANE, Keita[2]; NIWA, Tatsuya[3]; TSUSHIMA, Michihiko[4]; TAGUCHI, Hideki[3]; NAKAMURA, Hiroyuki[4]; TOMOSHIGE, Shusuke[2]; ISHIKAWA, Minoru[2]

タンパク質の化学修飾は近年注目されている抗体薬物複合体などのバイオ医薬創出や、タンパク質を基盤とするバイオマテリアル創出に必要不可欠な技術である。しかし、水中で使用できる化学反応のバリエーションが乏しく、効率的に修飾できるアミノ酸残基の種類は大きく限定されている。ヒスチジン残基（His）は酵素活性中心のプロトン移動の触媒、金属原子へのキレート、化学的に不安定なリン酸化 His によるシグナル伝達等に関わっている。しかし、His への残基選択的修飾法は困難であり、新規手法の開発が求められている。従来の His 修飾法は求電子的な試薬を用いて、求核性の His を修飾するという手法が開発されているが[1]、他の求核性アミノ酸残基との直交性の確立が課題である。一方で、ヒスチジン残基は一重項酸素（$^1O_2$）との反応性が高く、Diels-Alder 反応により求電子性の高反応性中間体（**1**）が形成される[2]。本研究では、**1** を求核性の高い 1-methyl-4-arylurazole（MAUra; **2**）で捕捉する極性転換反応により His 選択的修飾を達成した（図 1 上）。

本反応で使用する $^1O_2$ はマイクロ秒スケールの寿命を持つ高反応性であるため、$^1O_2$ 発生源となる光増感剤の近傍空間で選択的にヒスチジンの酸化反応と **2** による求核的付加反応が瞬時に完結すると考えた。近接依存性標識の有用性を応用すべく、抗体（大きさ約 10 nm）の Fc 領域選択的な修飾に本反応を活用した。磁気ビーズ表面上に、抗体 Fc 領域に対するリガンド分子と光増感剤[3]を同時に担持した反応場を構築し、本ヒスチジン修飾反応をタンパク質部位選択的に制御した(図 1 下)。LC-MS 解析の結果、Fc 領域のヒスチジン残基を選択的に標識できることを明らかにした[4]。

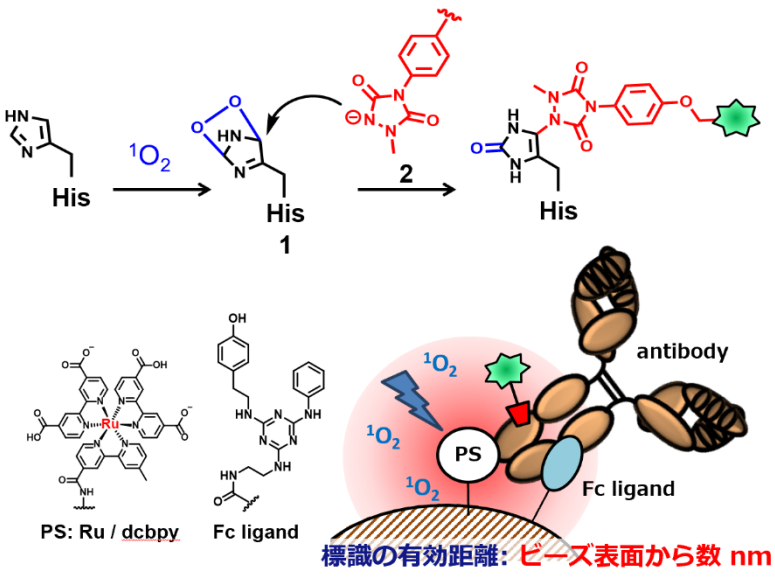


図 1 ヒスチジン修飾反応と抗体 Fc 領域部位選択的修飾

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

©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

高付着性細菌の定量的付着力解析

○吉本将悟・堀克敏（名大院工）

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

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

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

まず、グルタルアルデヒドで活性化したポリイミン修飾ガラスボトムディッシュに細菌懸濁液を滴下し室温で 30 分間静置した。この方法により、細菌細胞の底面側がガラスボトムディッシュ表面のポリイミンと共有結合で架橋される。固定化した細胞に、材質の異なる直径 2 μm のコロイドが先端についたコロイダルプローブをリン酸緩衝液中で 1 秒間押しつけ、1 μm/s で引き離す際に細菌細胞-プローブ間に働く力を AFM で測定した(Fig. 1A)。それぞれの材質に対する、AtaA に起因した Tol 5 細胞の強い付着力が検出された。続いて、AtaA 一分子の付着力を測定するために、アラビノース濃度で *ataA* 遺伝子の発現量を制御可能な Tol 5 由来の変異株を用いて、細胞表層に AtaA をわずかに提示した細胞を調製した。この細胞をガラスボトムディッシュ表面に固定化し、先端曲率半径が 30 nm 以下のシャープなシリコン製プローブまたは電荷や疎水性の異なるアルカンチオールの自己組織化単分子膜で修飾したプローブをリン酸緩衝液中で 1 秒間押しつけ、1 μm/s で引き離す際に AtaA-プローブ間に働く力を AFM で測定した(Fig. 1B)。全てのプローブで AtaA 一分子の強い付着力を測定することに成功した。これらの結果は、Tol 5 とその付着因子である AtaA の付着が材料非特異的であることを示している。

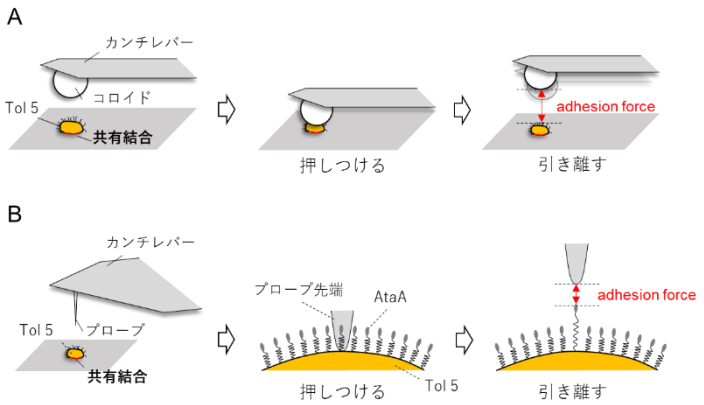


Fig. 1. AFM を用いた単細胞・単分子付着力解析の模式図.

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

Oral(first day)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Osami Shoji (Nagoya Univ.)

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

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

*Satoshi Abe[1], Junko Tanaka[1], Takafumi Ueno[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

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

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

*Yuki Hishikawa[1], Basudev Maity[1], Michito Yoshizawa[2], Masakazu Morimoto[3], Satoshi Abe[1], Takafumi Ueno[1] (1. School of Life Science & Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Laboratory for Chemistry & Life Science, Tokyo Institute of Technology, 3. Department of Chemistry, Rikkyo University)

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

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

*Yoshitaka Saga[1], Madoka Yamashita[1], Aiko Tanaka[1], Yuji Otsuka[1], Yuto Masaoka[2], Tsubasa Hidaka[2], Yutaka Nagasawa[2] (1. Faculty of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University)

迅速タンパク質結晶化とサブミクロン結晶構造解析

○安部　聡・田中潤子・上野隆史（東工大生命理工）

Rapid Protein Crystallization in Cell for the Submicron Crystal Structure Analysis (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology1) ABE, Satoshi; TANAKA, Junko; UENO Takafumi

【序論】

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

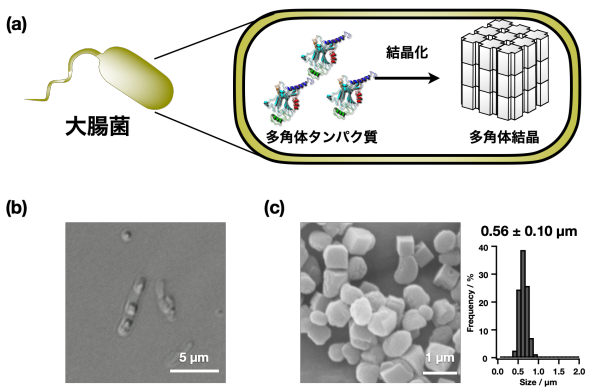


図 1.（a），(b) 大腸菌内でのタンパク質結晶化、(c) 精製した多角体結晶の SEM 像

【実験】

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

【結果】

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

【参考文献】

(1) R. Schonherr *et al. Biol. Chem.* **2018**, 399, 751., C. N. Mudogo *et al. Traffic.* **2020**, 21, 220.

(2) T. Nguyen *et al. ACS Appl. Nano Mater*. **2021**, 4, 1672. S. Abe *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 12341.

タンパク質ケージ内芳香族クラスターによる蛍光分子特性制御

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

Control of Fluorescent Molecular Properties by Aromatic Clusters in Protein Cages (Sch. of Life Sci. & Technol., Tokyo Inst. of Technol.[1]; Lab. for Chem. & Life Sci.., Tokyo Inst. of Technol. [2]; Dept. of Chem., Rikkyo Univ.[3]) Hishikawa, Yuki[1]; MAITY, Basudev[1]; YOSHIZAWA, Michito[2]; MORIMOTO, Masakazu [3]; ABE, Satoshi[1]; UENO, Takafumi[1]

【背景・目的】

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

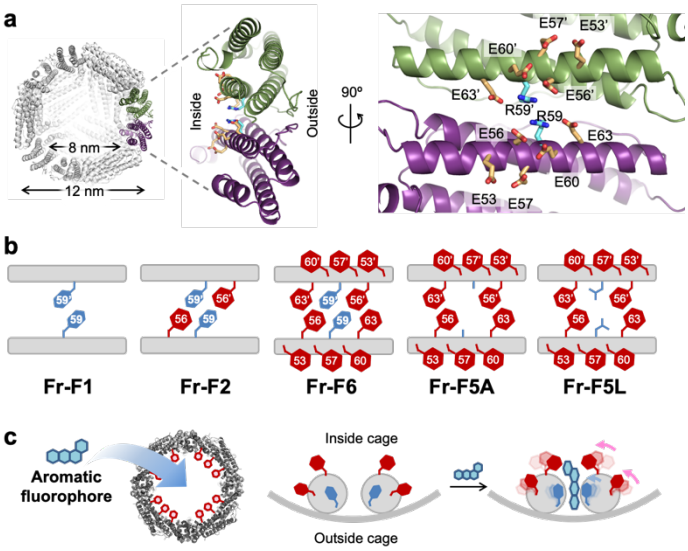


Fig 1. (a) The structure of a ferritin cage and the two-fold symmetric inter-subunit interface (PDB ID: 1DAT). (b) Design of mutants with aromatic clusters at the two-fold interface. (c) Cartoon representation for incorporation of aromatic fluorophore into the cage and concept of dynamic conformational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

【方法】

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

【結果・考察】

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

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

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

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

Excitation Energy Transfer in Photosynthetic Light-harvesting Protein LH2 with Modification of Energy-donating Pigments (Faculty of Science and Engineering, Kindai University[1], Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University [2]) SAGA, Yoshitaka[1]; YAMASHITA, Madoka[1]; TANAKA, Aiko[1]; OTSUKA, Yuji[1]; MASAOKA, Yuto[2]; HIDAKA, Tsubasa[2]; NAGASAWA, Yutaka[2]

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

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

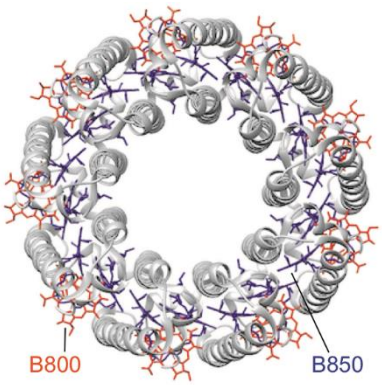


Fig. 1. Top-view structure of LH2 protein from *Rbl. acidophilus*.

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

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

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

©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)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Kenjiro Hanaoka (Keio University)

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

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

*Toshiyuki Kowada[1,2,3], Rong Liu[2], Yuyin Du[3], Toshitaka Matsui[1,2,3], Shin Mizukami[1,2,3] (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Faculty of Science, Tohoku University)

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

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

*Kazuya Matsuo[1], Ryota Uehara[2], Takashi Kikukawa[2], Nobuyuki Tamaoki[1] (1. Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, 2. Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University)

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

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

*Masafumi Minoshima[1], Ryu Hashimoto[1], Souhei Sakata[2], Fumihito Ono[2], Kazuya Kikuchi[1,3,4] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Osaka Medical and Pharmaceutical University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University, 4. Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University)

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

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

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

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

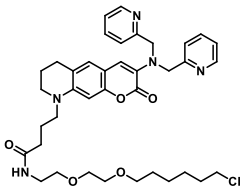


図 1. ZnDA-1H の構造.

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

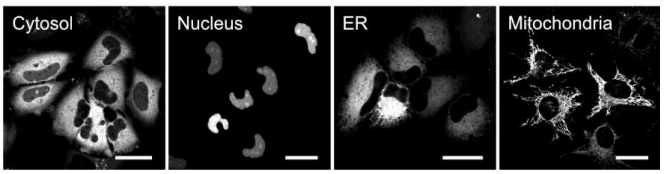


図 2. HeLa 細胞に発現させた HaloTag を介して細胞小器官に局在する ZnDA-3H の共焦点蛍光顕微鏡画像.

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

©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

可視光による分裂期染色体の光操作法

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

Development of the photopharmacological technique to control chromosome movements and positioning using visible light stimulus (Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University[1], Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University[2]) MATSUO, Kazuya[1]; UEHARA, Ryota[2]; KIKUKAWA, Takashi[2]; TAMAOKI, Nobuyuki[1]

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

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

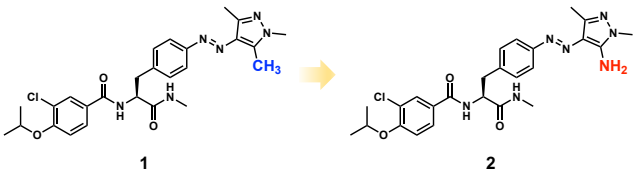


Figure 1. 光制御型 CENP-E 阻害剤 **1** および可視光制御型 CENP-E 阻害剤 **2**

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

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

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

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

[References]

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

©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

非対称シアニン色素を用いた可視光応答型ケージド化合物の開発

○蓑島維文[1]・橋本　龍[1]・坂田宗平[2]・小野富三人[2]・菊地和也[1,3,4]（[1]阪大院工、[2]大阪医薬大、[3]阪大免フロ、[4]阪大 QIQB）

Development of Visible-light Responsive Caged Compounds based on Asymmetrical Cyanine. (Graduate School of Engineering, Osaka University[1], Faculty of Medicine, Osaka Medical and Pharmaceutical University[2], Immunology Frontier Research Center, Osaka University[3], Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University[4]) MINOSHIMA, Masafumi[1]; HASHIMOTO, Ryu[1]; SAKATA, Souhei[2]; ONO Fumihito[2]; KIKUCHI, Kazuya[3,4]

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

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

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

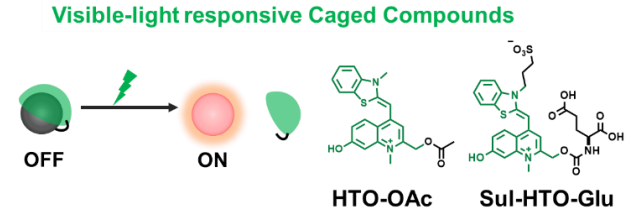


Fig 1. Chemical structure of HTO-based caged compounds

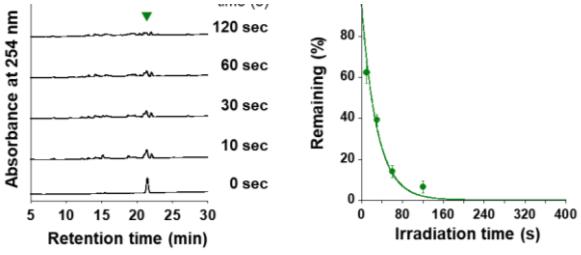


Fig 2. (left) HPLC chart of HTO-OAc photolysis. (right) Time course of photolysis of HTO-OAc. Light illumination: λ = 490 ± 5 nm (10 mW/cm^2)

1) P. Klán, *et al*., *Chem. Rev*. **2013**, *113*, 119. 2) N. Umeda, *et al*., *ACS Chem. Biol*. **2014**, *9,* 2242.
3) P. P. Goswami, *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3783. 4) T. Narumi, *et al*., *Org. Lett.* **2018**, *20,* 4178.

©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)

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Shinobu Ito (Osaka Univ.)

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

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

*Takashi Matsuo[1], Naoki Akiyama[1], Catur Jatmika[1], Ibuki Nakamura[1], Shun Hirota[1], Hiroyasu Yamaguchi[2] (1. Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, Osaka University)

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

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

*Kengo HANAYA[1], Kaho YAMOTO[1], Shuhei HIGASHIBAYASHI[1], Takeshi SUGAI[1] (1. Faculty of Pharmacy, Keio University)

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

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

*Fumihiro Ishikawa[1], Sho Konno[2], Chiharu Uchida[1], Takehiro Suzuki[3], Katsuki Takashima[1], Naoshi Dohmae[3], Hideaki Kakeya[2], Genzoh Tanabe[1] (1. Faculty of Pharmacy, Kindai University, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 3. Biomolecular Characterization Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science)

ルテニウム-オレフィン相互作用を用いた生体分子の化学修飾

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

Chemical Modification of Biomacromolecules through Ru-Olefin Specific Interaction (Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology[1], Graduate School of Science, Osaka University[2]) MATSUO, Takashi[1]; AKIYAMA, Naoki; JATMIKA, Catur; NAKAMURA, Ibuki; HIROTA, Shun; YAMAGUCHI, Hiroyasu[2]

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

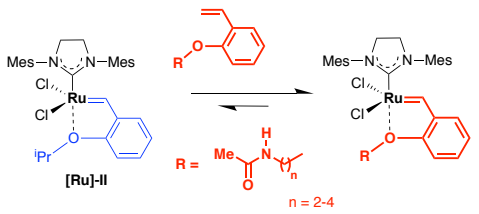


Fig. 1. Ligand exchange on Hoveyda-Grubbs second generation complex (**[Ru]-II**)

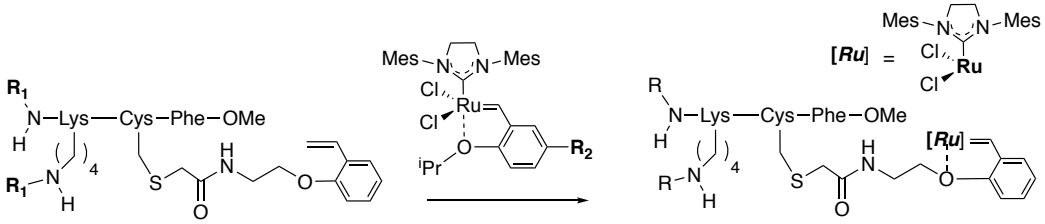


Fig. 2. Immobilization of Ru complex moiety on model tripeptides with a benzylidene moiety

ベンジリデン配位子を導入したトリペプチド Boc-Lys(Boc)-Cys-Phe-OMe (**1**) に対してホベイダ-グラブス型錯体 **[Ru]-II** をルテニウム錯体ドナーとして $CHCl_3$ 中で反応させたところ、70%の反応率でルテニウム錯体移動反応が起こり、ルテニウム錯体の固定化が確認できた。電子求引的な性質をもつ**[Ru]**-$_{NO2}$ もしくは**[Ru]**-$_{TMA}$ を錯体ドナーに用いた場合、錯体固定化効率が上昇した。**[Ru]**-$_{TMA}$ を用いた錯体移動反応は、CD_3OD 中においても 86%の反応率で進行した。さらに、脱 Boc トリペプチド **2** と錯体**[Ru]**-$_{TMA}$ との反応を D_2O/DMSO 中で行ったところ、ルテニウム錯体移動反応が 70%の反応率でおこり、本手法は水溶液中でも適用可能であることが確認できた。そこで、本手法をタンパク質に拡張すべく、モデルタンパク質としてベンジリデン配位子を導入したアデニル酸キナーゼ三変異体(A55C/C77S/V169C)に対して**[Ru]**-$_{TMA}$ を作用させたところ、タンパク質上にルテニウム錯体が固定化された。一方、ベンジリデン配位子を導入しなかった場合、錯体の固定化は起こらなかった。以上のことから、様々な官能基を有する生体分子に対しても、ルテニウム–アルケン相互作用は特異的に機能し、生体分子の新たな化学修飾の戦略として有効であると考えられる。

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

©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

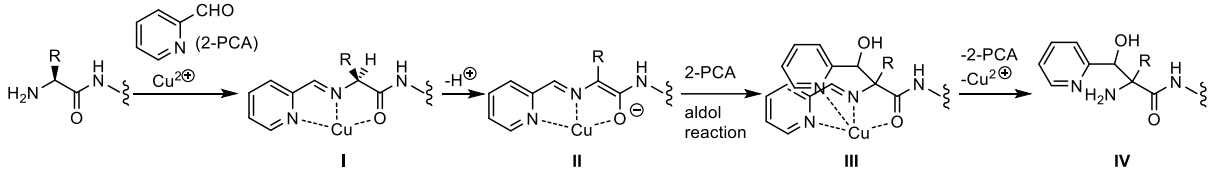
銅(II)イオンを用いたアルドール反応による N 末端アミノ酸選択的化学修飾法の開発

○花屋賢悟・八本果歩・東林修平・須貝威（慶大薬）

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

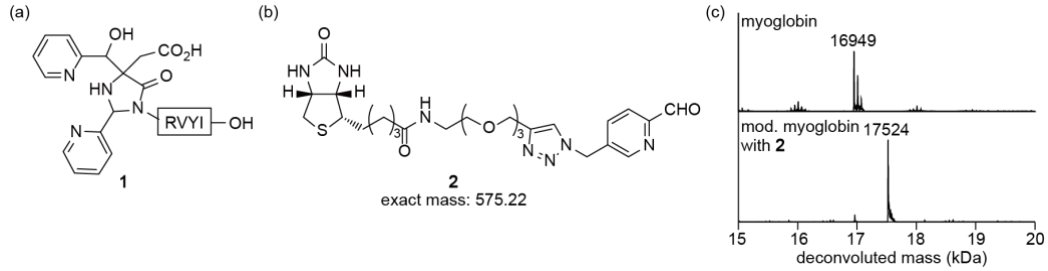
薬物や蛍光分子などの人工分子をタンパク質上の狙った場所に導入する反応（化学修飾法）は、バイオ医薬品創薬やケミカルバイオロジーの基礎研究において欠かせない。N 末端アミノ酸はタンパク質に必ず 1 箇所存在するので、これを標的にすれば人工分子を特定の位置に導入することができる。

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



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

本反応を分子量 17 kDa のミオグロビンの N 末端グリシンの化学修飾に適用した。銅イオン存在化、ビオチンを結合した 2-PCA 誘導体 **2** を pH 6.5 で 3 時間反応させると、ESI-MS においてミオグロビンのピーク（16494 Da）は消失し、**2** が 1 分子のみ結合した **IV** に相当するミオグロビンのピーク（17524 Da）が観測された。



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

細胞内での非リボソームペプチド合成酵素の選択的ケミカルラベリング

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

Chemoproteomics profiling of nonribosomal peptide synthetases in living bacterial cells (Faculty of Pharmacy, Kindai University[1], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University [2], Biomolecular Characterization Unit, RIKEN Center for Sustainable Resource Science[3]) ISHIKAWA, Fumihiro[1]; KONNO, Sho[2]; UCHIDA, Chiharu[1]; SUZUKI, Takehiro[3]; TAKASHIMA, Katsuki[1]; DOHMAE, Naoshi[3]; KAKEYA, Hideaki[2]; TANABE, Genzoh[2]

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

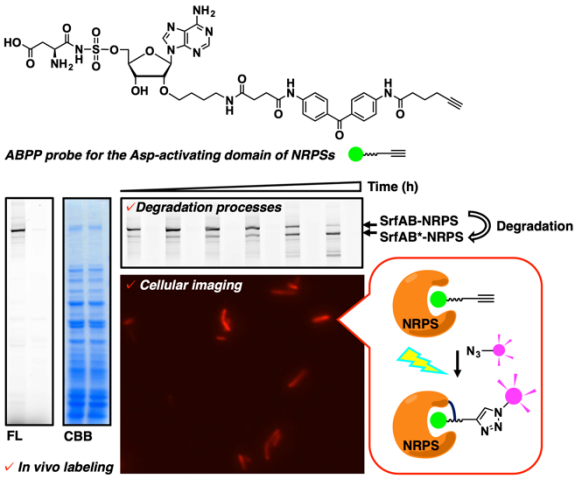


Figure 1. Chemoproteomics profiling of surfactin-producing NRPSs in living bacterial cells.

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

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

Oral(first day)

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

Nucleic acids

Chair: Yoshiya Ikawa (Toyama Univ.)

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

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

*Keiji Murayama[1], Yuuhei Yamano[2], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. The Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University)

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

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

*Koki MAKINO[1], Hiroyuki ASANUMA[1], Hiromu KASHIDA[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

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

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

*Yusuke Takezawa[1], Hanci Zhang[1], Akira Suzuki[1], Keita Mori[1], Lingyun Hu[1], Mitsuhiko Shionoya[1] (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

異なる波長で独立に制御可能な光応答性人工核酸の開発

○村山恵司[1]・山野雄平[2]・浅沼浩之[1]（[1]名大院工、[2]東北大多元研）

Orthogonal Photoregulation of Artificial Nucleic Acid via Irradiation with Different Wavelength of Light

(Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], The Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University [2]) MURAYAMA, Keiji[1]; YAMANO, Yuuhei[2]; ASANUMA, Hiroyuki[1]

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

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

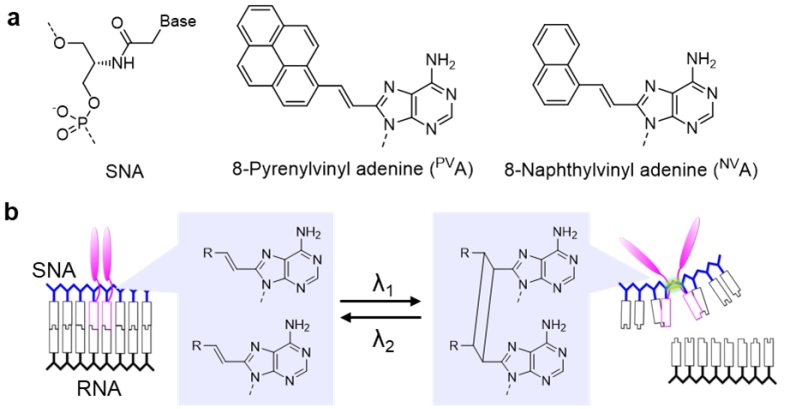


Fig. 1. (a) Chemical structures of SNA, 8-pyrenylvinyl adenine (^{PV}A), and 8-naphthylvinyl adenine (^{NV}A). (b) Scheme and illustration of reversible photo-regulation of SNA/RNA duplex formation.

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

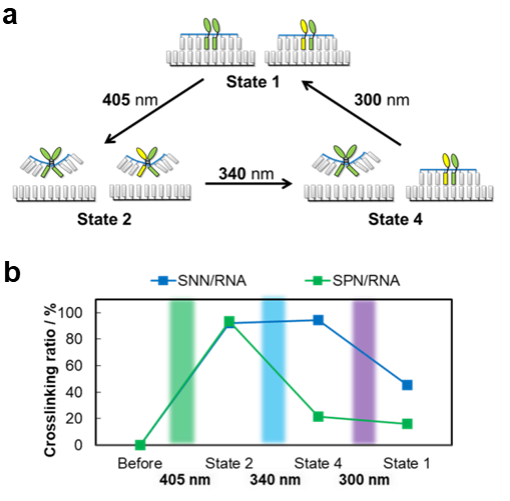


Fig. 2. (a) Scheme of orthogonal photo-regulation of SNA/RNA duplexes. (b) Crosslinking ratio of two duplexes after irradiation.

[1] Kashida, H., Murayama, K., Toda, T., Asanuma, H., (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 1285-1288.
[2] Murayama, K., Kashida, H., Asanuma, H., (2015) *Chem. Commun.*, **51**, 6500-6503.
[3] Murayama K., Yamano Y., Asanuma H., (2019) *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 9485-9489.
[4] Yamano Y., Murayama K., Asanuma H., (2021) *Chem. Eur. J.*, **27**, 4599-4604.

©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

生体分子のマルチラベリングを可能とする蛍光バーコードの開発

○牧野 航海・浅沼 浩之・樫田 啓（名大院工）

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

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

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

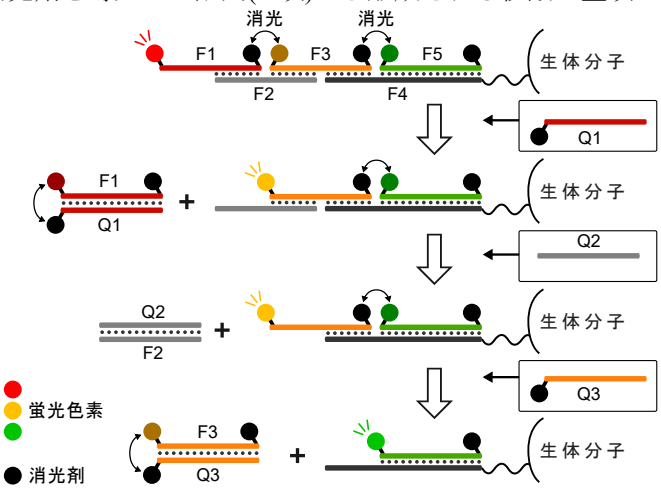


Fig. 1 Schematic illustration of fluorescent barcode approach based on strand displacement reaction.

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

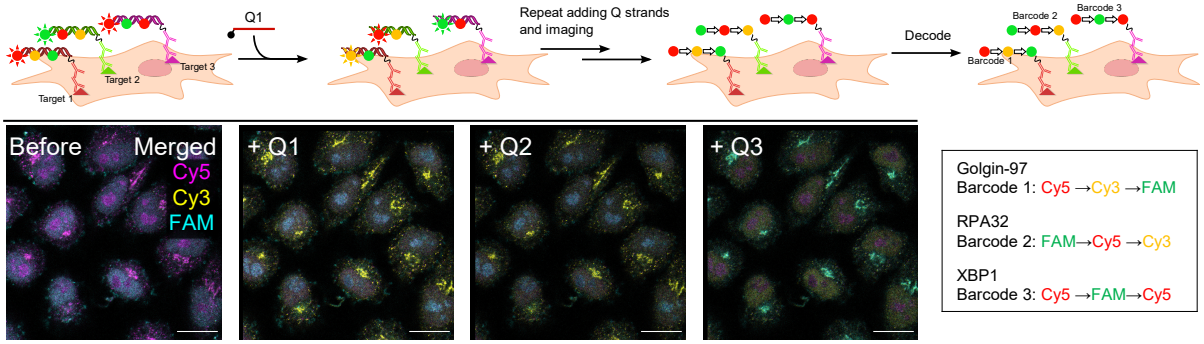


Fig. 2 Multiplex labeling of three proteins in fixed HeLa cells with fluorescent barcodes.

©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

金属配位に基づく 5-カルボキシウラシルの塩基対スイッチング

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

Base-pair Switching of 5-Carboxyuracil Nucleobases Driven by Metal Coordination (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1]) TAKEZAWA, Yusuke[1]; ZHANG, Hanci[1]; SUZUKI, Akira[1]; MORI, Keita[1]; HU, Lingyun[1]; SHIONOYA, Mitsuhiko[1]

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

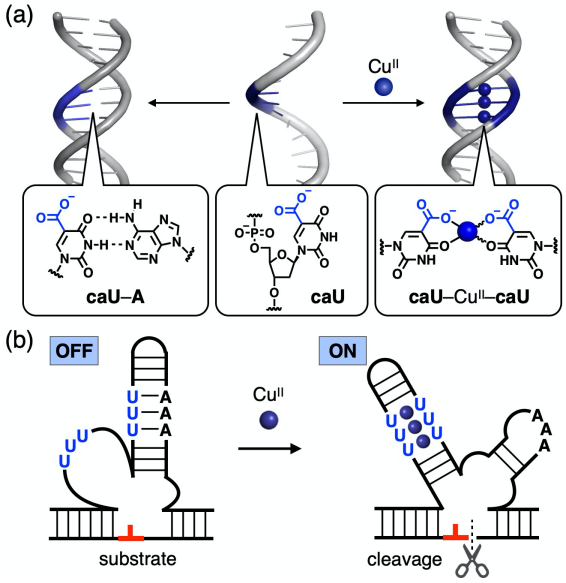


図 1 (a) 5-カルボキシウラシル(caU)が形成する水素結合型塩基対(caU–A)と金属錯体型塩基対(caU–Cu^{II}–caU)。(b) Cu^{II} イオン添加により活性化されるアロステリック DNAzyme の模式図。"U"は caU 塩基を表す。

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

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

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

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

©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)

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

Nucleic acids

Chair: Tamaki Endo (Konan Univ.)

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

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

*Kazumitsu Onizuka[1,2], Kaoru R Komatsu[3], Ryosuke Nagasawa[1,2], Yutong Chen[1,2], Emi Miyashita[3], Shunya Ishikawa[1,2], Kanna Ojima[1,2], Hirotaka Murase[1], Mamiko Ozawa[1], Hirohide Saito[3], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. Graduate school of science, Tohoku University, 3. CiRA, Kyoto University)

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

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

*Tatsuya Nishihara[1], Yuto Motohashi[1], Shuhei Moritani[1], Momoka Yajima[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Aoyama Gakuin University)

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

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

*Keisuke Fukunaga[1], Yohei Yokobayashi[1] (1. OIST)

RNA 結合性・アルキル化反応性の大規模解析技術開発

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

Development of large-scale analytical system for RNA binding and alkylation reactivity (Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University[1], Graduate School of Science, Tohoku University[2], CiRA, Kyoto University[3]) ONIZUKA, Kazumitsu[1,2]; KOMATSU, Kaoru R.[3]; NAGASAWA, Ryosuke[1,2]; CHEN, Yutong[1,2]; MIYASHITA, Emi[3]; ISHIKAWA, Shunya[1,2]; OJIMA, Kanna[1,2]; MURASE, Hirotaka[1]; OZAWA Mamiko[1]; SAITO, Hirohide[3]; NAGATSUGI, Fumi[1,2]

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

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

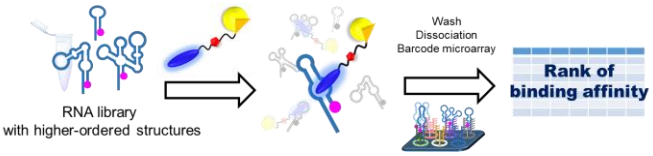


Fig. 1 RNA 結合性の大規模解析

一方、独自に開発したビニルキナゾリノン（VQ）ユニットは、その安定前駆体である SPh 体と平衡状態で存在しており、近傍に T や U が存在すると速やかに反応する（Fig. 2）。また S(O)Me 体は自発的な脱離反応の後、アルキル化を引き起こすことも明らかにしている[2)]。本研究では、この VQ ユニットをマイクロアレイ法に適用させ、アルキル化反応効率の大規模解析を行った。具体的には、VQ ユニットを核酸結合分子であるアクリジンにコンジュゲートし、さらに評価のためのアジド基を修飾したアクリジン-VQ-S(O)Me-N_3 を合成した（Fig. 2）。次に、マイクロアレイ法に付すことでアルキル化効率のランク化を試みた。得られた結果を実際に検証したところ、精度よくランク化できていることが分かった。本発表では、VQ アルキル化の化学およびマイクロアレイ法に関して詳しく報告する予定である。

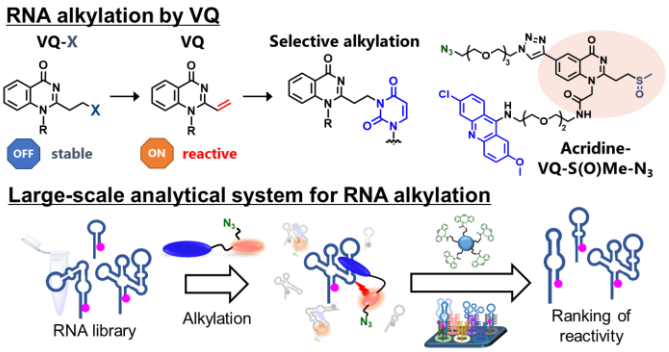


Fig. 2 VQ のアルキル化とマイクロアレイ法

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

代謝物情報をコード可能にする機能性核酸の開発

○西原達哉・本橋優人・盛谷周平・矢島百華・田邉一仁（青山学院大院理工）

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

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

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

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

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

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

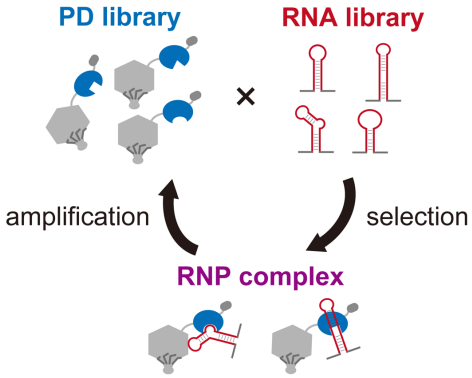
©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

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

○福永 圭佑・横林 洋平（沖縄科学技術大学院大学）

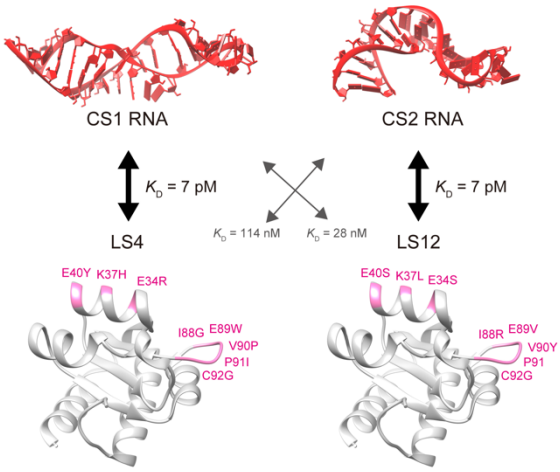
Discovery of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library *in vitro* selection (Nucleic Acid Chemistry and Engineering Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST)) FUKUNAGA, Keisuke; YOKOBAYASHI, Yohei

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



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

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



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

©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)

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

Nucleic acids

Chair: Hiromu Kashida (Nagoya Univ.)

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

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

*Yuichiro Aiba[1], Masanari Shibata[1], Kota Ito[1], Masaki Hibino[1], Shinya Ariyasu[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

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

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

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

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

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

*Peng Lin[1], Huyen Dinh[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

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

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

Sequence-selective recognition of double-stranded DNA by using PNAs with natural nucleobases (Graduate School of Science, Nagoya University[1]) AIBA, Yuichiro[1]; SHIBATA, Masanari[1]; ITO, Kota[1]; HIBINO, Masaki[1]; ARIYASU, Shinya[1]; SHOJI, Osami[1]

ペプチド核酸（Peptide Nucleic Acid; PNA）は、DNA のリボース・リン酸骨格を *N*-(2-aminoethyl) glycine 骨格に置き換えた構造を持つ人工核酸である [1)]。このリン酸基を持たない特徴的な骨格により、PNA は相補的な DNA と、非常に安定な 2 本鎖を形成することが可能である。さらに、この高い DNA 結合力から、相補的な 2 本鎖 DNA 中に侵入して複合体を形成するインベージョンという現象が報告されている（Fig. 1）。このインベージョンでは、事前の変性操作などを必要とせず、2 本鎖状態の DNA を直接認識可能なことから、ゲノム DNA などを標的とした生体内応用などが期待されている。ここで、インベージョンに用いる 1 組の PNA は原則的に相補的であるため、インベージョンを進行させるにはより安定に形成する PNA/PNA の 2 本鎖形成を抑制する必要があった。そのため、特殊な化学修飾核酸塩基 [2,3)]が効率的なインベージョンには必要不可欠とされてきた（Fig. 1）。一方で、複雑なモノマー合成の手間や、合成時の試薬 [4)]の問題から自動合成化が困難なことが、PNA を応用展開する妨げとなっていた。

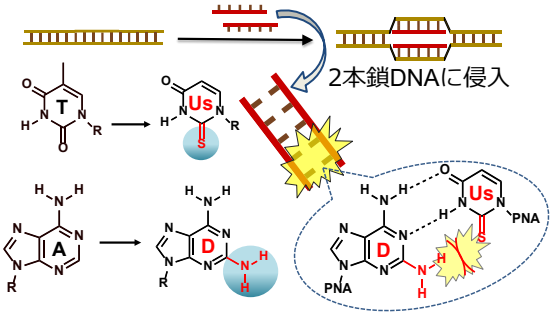


Fig. 1 PNA によるインベージョン

そこで本研究では、複雑な化学修飾を必要としない新たなPNAインベージョン法の構築を目指した。そこで、PNA 間の相互作用を抑制するために PNA の配向に着目し、parallel 型の PNA を採用した（Fig. 2）。このような設計を施すことで、これまでインベージョンに不可欠であった化学修飾核酸塩基を用いることなく、合成の簡便な未修飾 PNA でのインベージョンを達成した [5)]。この新規 PNA インベージョン手法では、市販の安価な Fmoc-PNA モノマーが使用可能であり、ペプチド自動合成機を用いた多検体同時合成やスケールアップも容易となる。本手法により、様々な PNA 配列によるスクリーニングなど、従来は検討が困難であった PNA インベージョンの広範な応用が可能となる。本発表では、parallel 型 PNA の特性に加え、PNA 設計の最適化や、インベージョン効率の向上に対する取り組みについて報告する。

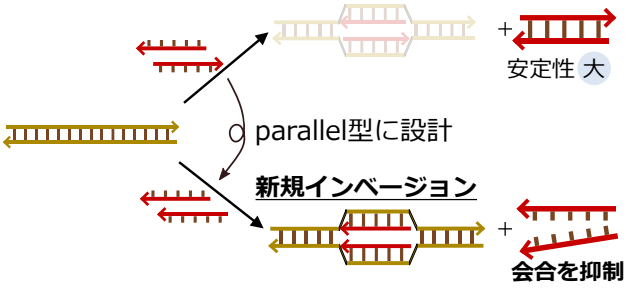


Fig. 2 PNA の配向に着目した新規インベージョン法

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

©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

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

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

Intracellular Reconstruction of Viral Infection Response Field by Nucleic Acid Nanotechnology and Its Application to Selective Cancer Immunotherapy

(Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo[2]) MORIHIRO, Kunihiko[1]; MORITA, Shunto[1]; OKAMOTO, Akimitsu[1,2]

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

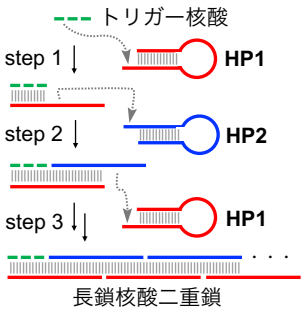


図 1. HCR の概要

本研究では、核酸ナノ技術の 1 種である Hybridization Chain Reaction (HCR) を利用することで細胞内で長鎖 RNA 二重鎖を in situ 構築し、ウイルス感染応答場を再現する技術を開発する。HCR は 2 種類のヘアピン型核酸の連続する鎖置換反応であり、生成物としてニックの入った長い核酸二重鎖を与えることができる (図 1)[3]。HCR の開始を代表的ながん関連マイクロ RNA (miRNA) である miR-21 によって制御することで、がん細胞選択的に細胞死を引き起こす免疫療法に応用する。本技術は、(1) 短鎖ヘアピン型 RNA プローブの設計と化学合成 (2) プローブの細胞内導入 (3) 細胞内 miR-21 をトリガーとした HCR (4) がん細胞選択的な免疫応答から構成される (図 2)。本シンポジウムでは設計した技術の試験管内、細胞内及び動物個体内での評価について議論したい。

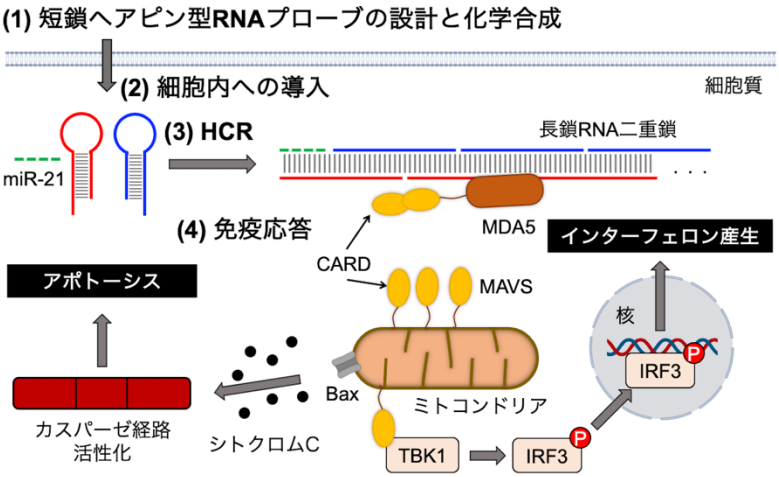


図 2. 本研究で開発するウイルス感染応答場再構築技術の概要

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

©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

動的 DNA 足場に構築した酵素カスケード反応

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

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

Structural programmability and accurate addressability of DNA nanostructures are ideal characteristics for the platform of arranging enzymes with the nanoscale precision.[1] In this study, a three-dimensional DNA scaffold[2] was designed to enable a dynamic shape transition from an open plate-like structure to its closed state of a hexagonal prism structure. The two domains in the open state were folded together to transform to the closed state by hybridization of complementary short DNA closing keys at both facing edges in over 90% yield.[3] The shape transformation of the DNA scaffold was quantitatively studied by means of the fluorescence energy transfer measurement, atomic force microscope images and agarose gel electrophoretic analyses.

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

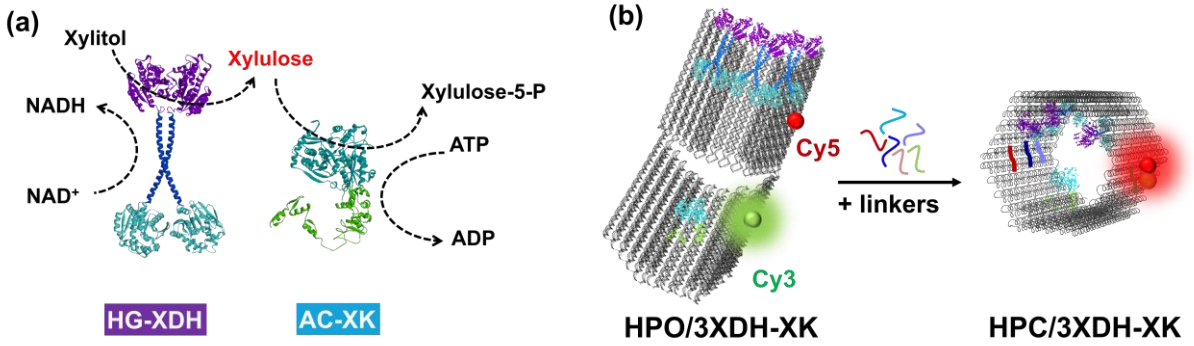


Fig 1. (a) A scheme shows cascade reaction of HG-XDH (modular adaptor fused XDH)[4] and AC-XK (modular adaptor fused XK).[5] (b) A scheme represents the shape transformation of enzyme loaded DNA scaffold in the open state (HPO/3XDH-XK) to its closed state (HPC/3XDH-XK) by the hybridization of DNA linkers.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

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

Oral(first day)

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

Nucleic acids

Chair: Kunihiko Morihiro (The University of Tokyo)

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

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

*Radhika Biyani[1], Masahiro Takagi[1], Manish Biyani (1. School of material Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

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

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

*Maho Koda[1], Ayako Koto[2,3], Shuto Yajima[3], Hiroaki Sakamoto[3], Eiichiro Takamura[3], Shin-ichiro Suye[3] (1. Faculty of Engineering, University of Fukui, 2. NICCA CHEMICAL CO.,LTD, 3. Graduate School of Engineering, University of Fukui)

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

(Graduate School of Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)[1], BioSeeds Corporation [2]) Radhika Biyani[1]; Manish Biyani[2] ; Masahiro Takagi[1]

Amyloid beta 42 (Aβ42) is the main cause of neuronal death in the brains of patients with Alzheimer's disease (AD). The social and economic burden of this disease is very high because neither a specific therapy that can cause a delay in AD progression is offered, nor a specific test that can make early-diagnosis possible is offered. Aβ42 is a 42 amino-acid chain small-peptide and a key biomarker for the pathogenesis of AD. Early diagnosis of Aβ42 thus can be particularly important for prognosis and treatment.

Recently, a variant form of Aβ42, i.e., E22P (Glutamic acid at 22 position changes to Proline) with a turn at Glu22 and Asp23, has been described and differentiated with the wild-type Aβ42 (E22) which has a turn at Gly25 and Ser26 [1]. This artificial mutation triggers the beta-sheet formation due to the turn making the aggregation more prone. Thus, highly specific bio-probes that recognize the variants of Aβ42 holds great promise for AD diagnosis and therapy. Antibodies are ideal choice for biomarkers, however, not fit for a small sized target like Aβ42. Aptamers have emerged as new smart class of biomolecules that can be used for molecular recognition of targets for diagnostic and therapeutic applications. With limited applications of aptamers in the field of Aβ42 research, it can be encouraging to develop DNA Aptamer that can selectively recognize to the variants of Aβ42. To perform screening for highly similar targets (E22 and E22P), a modified strategy of conventional SELEX, termed as SELCOS (Systematic Evolution of Ligands by COmpetitive Selection) [2] can be utilized.

In this study, we employed SELCOS to screen highly selective 70-mer DNA aptamer, named Apta-8 , that specifically binds to E22-type Aβ42. The electrochemical binding assay indicated that Apta-8 had capability to bind to Aβ42 monomers strongly and specifically. Although further characterization needs to be done, the current evidence supports the proposition that Apta-8 could be further applied to a wide-range of affinity assays for both diagnosis and treatment.

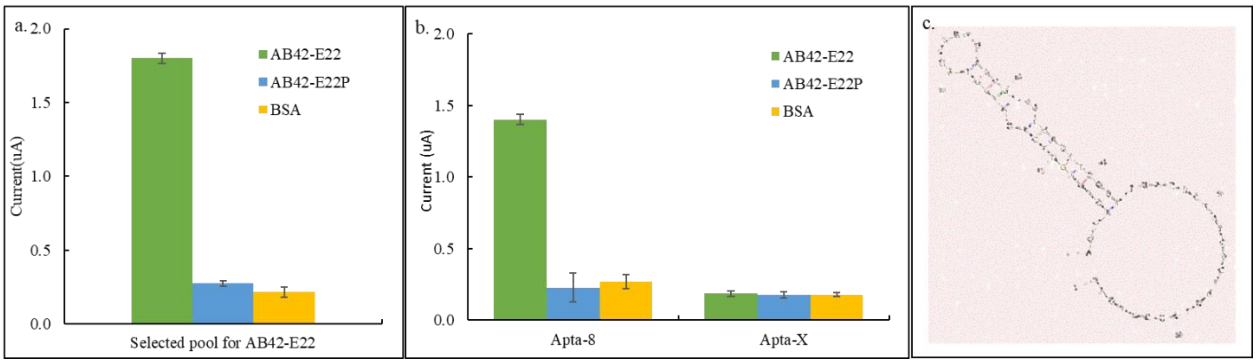


Figure 1: (a) Binding affinity of Selected Pool after selection to E22- and E22P type Aβ42 and BSA(control). (b) Binding affinity of Apta-8 and Apta-X (negative control) to E22- and E22P- type Aβ42 and BSA.(c) Secondary structure of Apta-8

Reference:

1) Murakami, K., Tokuda, M., Suzuki, T., Irie, Y., Hanaki, M., Izuo, N., & Tokuda, T. (2016). Monoclonal antibody with conformational specificity for a toxic conformer of amyloid β42 and its application toward the Alzheimer's disease diagnosis. Scientific reports, 6(1), 1-12.

2) Kushwaha, A., Takamura, Y., Nishigaki, K., & Biyani, M. (2019). Competitive non-SELEX for the selective and rapid enrichment of DNA aptamers and its use in electrochemical aptasensor. Scientific reports, 9(1), 1-11.

PCR 検査精度向上のための光架橋性プローブ修飾磁気粒子(PPMP)の開発

○神田真穂[1]・向當綾子[2 3]・矢嶋修登[3]・坂元博昭[3]・髙村映一郎[3]・末信一朗[3]
(福井大工[1]、日華化学株式会社[2]、福井大院工[3])

Design and preparation of photocrosslinkable probe-modified magnetic particles (PPMP) to improve PCR test accuracy (Faculty of Engineering, University of Fukui[1], NICCA CHEMICAL CO.,LTD.[2], Graduate School of Engineering, University of Fukui [3])
KODA, Maho[1]; KOTO, Ayako[23]; YAJIMA, Shuto[3]; SAKAMOTO, Hiroaki[3]; TAKAMURA, Eiichiro[3]; SUYE, Shin-ichiro[3]

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

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

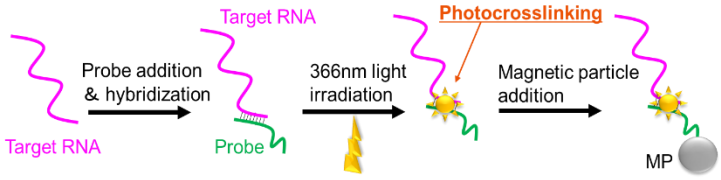


Fig. 1 Schematic illustration of capture of target RNA by PPMP.

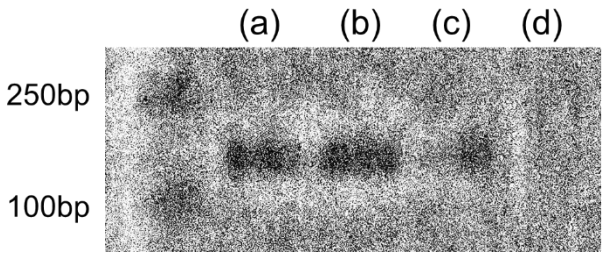


Fig. 2 RT-PCR result. (a) Target RNA (b) PPMP (c) PPMP without light irradiation (d) magnetic particles

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

©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)

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

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Ikuhiko Nakase (Osaka Prefecture University)

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

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

*Takuya Terai[1], Wenchao Zhu[1], Dazhou Cheng[1], Yusuke Nasu[1], Robert E. Campbell[1,2] (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, University of Alberta)

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

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

*Ayana Yamagishi[1], Akane Nagata[2], Chikashi Nakamura[1,2] (1. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

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

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

*Ashok Zachariah Samuel[1], Horii Shumpei[2,3], Takuji Nakashima[1], Masahiro Ando[1], Naoko Shibata[1], Haruko Takeyama[1,3,4,5] (1. Research organization for nano and life innovation, Waseda University, 2. Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 3. CBBD-OIL, AIST-Waseda University, 4. Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, 5. Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

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

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

Development of novel chemi-genetic fluorescent calcium sensors using directed evolution (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1], Department of Chemistry, University of Alberta, Canada[2]) TERAI, Takuya[1]; ZHU, Wenchao[1]; CHENG, Dazhou[1]; NASU, Yusuke[1]; CAMPBELL, Robert E.[1,2]

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

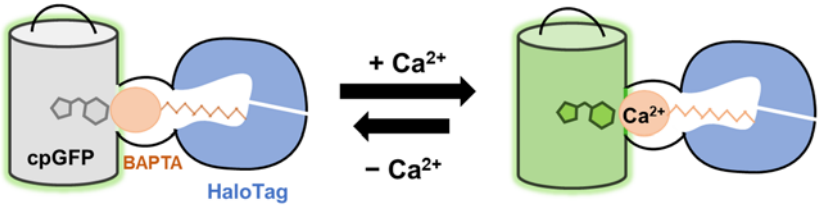


Fig. 1. Schematic illustration of our chemi-genetic Ca^{2+} indicator

まず Ca^{2+}と結合するキレーターとして BAPTA[4]を選択し、PEG リンカーを介して chloroalkane と連結させた化合物を合計 10 種類合成した。また HaloTag タンパク質のリガンド結合ポケット近傍に circularly permutated GFP（cpGFP）を挿入した変異体を約 30 種類作製した。これらの組合せを網羅的に評価し、Ca^{2+}への応答が見られたものに対して立体構造に基づく合理的変異導入を行った。さらにタンパク質全長へのランダムな変異導入を繰り返し行って指向性進化を進めたところ、Ca^{2+}の有無で蛍光レシオ値（Ex. 500 nm/Ex. 400 nm）が約 20 倍変化する高性能 chemi-genetic センサーの開発に成功した。また本センサーはリガンドの acetoxymethyl ester（AM）体を用いることで生細胞でも機能する事が確かめられた。

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

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

©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

塩化物イオン排出能の測定によるがん細胞の浸潤性評価

○山岸彩奈[1]・長田　あかね[2]・中村　史[1, 2]（[1]産総研細胞分子工学、[2]農工大院工）

Evaluation of cancer cell invasiveness by measuring chloride ion efflux ability (Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST [1], Grad. Sch. Eng., TUAT [2]) Yamagishi, Ayana[1]; NAGATA, Akane[2]; NAKAMURA, Chikashi[1, 2]

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

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

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

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

○ SAMUEL, Ashok Zachariah[1]; SHUMPEI, Horii;[2,3] NAKASHIMA, Takuji;[1] ANDO, Masahiro;[1] SHIBATA, Naoko;[1] TAKEYAMA, Haruko[1,3,4,5] (Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University,[1] Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University,[2] CBBD-OIL, AIST-Waseda University,[3] Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University,[4] Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University[5])

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

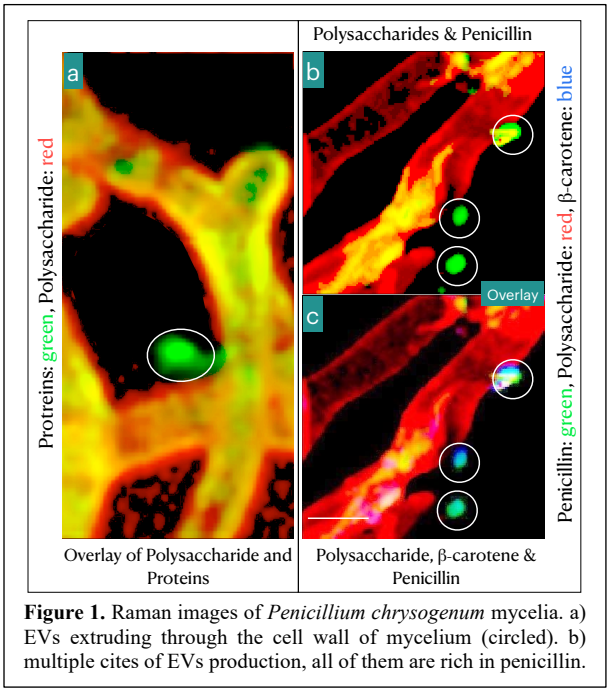


Figure 1. Raman images of *Penicillium chrysogenum* mycelia. a) EVs extruding through the cell wall of mycelium (circled). b) multiple cites of EVs production, all of them are rich in penicillin.

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

©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)

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

Analysis, Measurement, Sensor devices

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

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

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

*Kanji Miyabe[1,2], Momoko Umeda[1], Shunta Inaba[2] (1. College of Science, Rikkyo University, 2. Graduate School of Science, Rikkyo University)

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

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

*Takuma Otsuki[1], Yasumasa Takenaka[2], Tomohiro Hiraishi[2], Hideki Abe[2], Noriyuki Asakura[1] (1. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. RIKEN CSRS)

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

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

*Yusuke Kitamura[1], Shunpei Sakamoto[1], Yuta Nakashima[1], Masaaki Iwatsuki[2], Yasuda Keiihiro[3], Seitaro Kumamoto[1,3], Yousuke Katsuda[1], Hideo Baba[2], Yoshitaka Nakanishi[1], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, 2. Faculty of Life Sciences, 3. OGIC technologies Co., Ltd.)

リポソーム脂質二分子膜における溶質透過速度のモーメント解析

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

Moment Analysis Method for Determination of Solute Permeation Kinetics at Lipid Bilayer of Liposomes

(College of Science, Rikkyo University[1], Graduate School of Science, Rikkyo University[2]) MIYABE, Kanji[1,2]; UMEDA, Momoko[1]; INABA, Shunta[2]

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

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

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

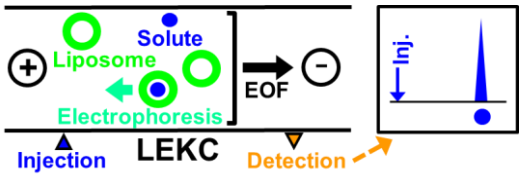


Fig. 1. Schematic illustration of LEKC system.

リン脂質として 1,2-dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DLPC) と phosphatidyl serine (PS)を使用し、膜を用いる押し出し法によりリポソーム DLPC/PS（80/20 mol%）を調製した（粒子径約 144 nm）。2-シクロヘキシルアミノエタンスルホン酸（50 mM）緩衝溶液（pH = 9.0）にリポソームを溶解し（リン脂質濃度として 0～10 mM）、泳動液を調製した。緩衝溶液に試料物質としてコルチゾン（副腎皮質ステロイド）、電気浸透流（EOF）マーカーとしてジメチルスルホキシド（DMSO）を溶解して混合試料溶液を調製した。溶融シリカキャピラリー（内径 75 μm、有効長 45.4 cm）に泳動液を満たし、混合試料溶液を微少量注入して電気泳動実験を行った。また、リン脂質として 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC) と PS を使用してリポソーム DMPC/PS（80/20 mol%）を調製し（粒子径約 162 nm）、同様に電気泳動実験を行った。

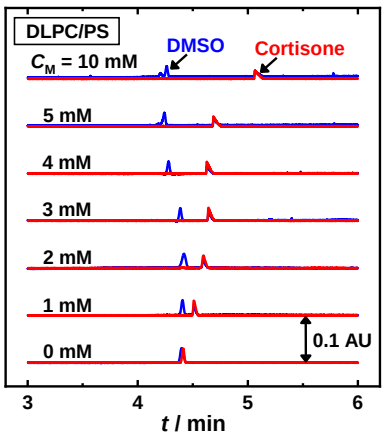


Fig. 2. Electropherograms in the LEKC system using DLPC/PS liposomes.

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

©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

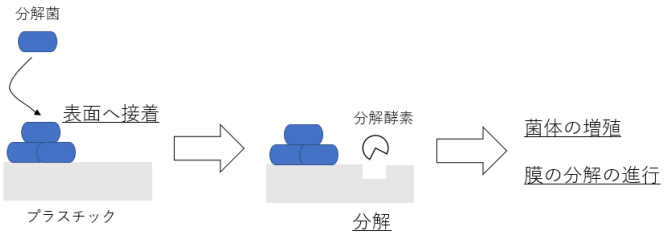
QCM と電気化学測定を用いた生分解性ポリマーの分解過程の解析

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

Measurement of microbial degradation of biodegradable polymer by QCM and electrochemistry (Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology [1], RIKEN CSRS[2])
OTSUKI,Takuma[1]; TAKENAKA,Yasumasa[2]; HIRAISHI, Tomohiro[2]; ABE, Hideki[2]; ASAKURA, Noriyuki[1]

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

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



Scheme 1　Microbial degradation process

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

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

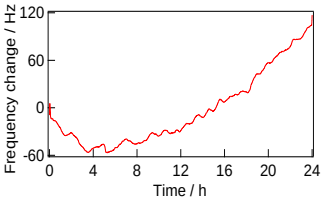


Fig.1 Time dependence of QCM response.

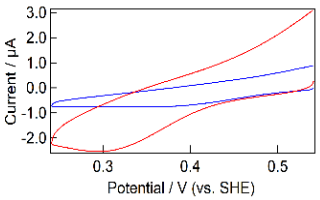


Fig.2　Cyclic Voltammograms of Quartz Crystal electrode before (blue) / after (red) PHBH biodegradation.

核酸の連鎖的鎖交換反応を利用した血中循環腫瘍細胞の検出

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

Detection of circulating tumor cells by the successive strand exchange of nucleic acids (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University[1], Faculty of Life Sciences, Kumamoto University[2], OGIC technologies Co., Ltd.[3]) KITAMURA, Yusuke[1]; SAKAMOTO, Shunpei[1]; NAKASHIMA, Yuta[1]; IWATSUKI, Masaaki[2]; YASUDA, Keiichiro[3]; KUMAMOTO, Seitaro[1,3]; KATSUDA, Yousuke[1]; BABA, Hideo[2]; NAKANISHI, Yoshitaka[1]; IHARA, Toshihiro[1]

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

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

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

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

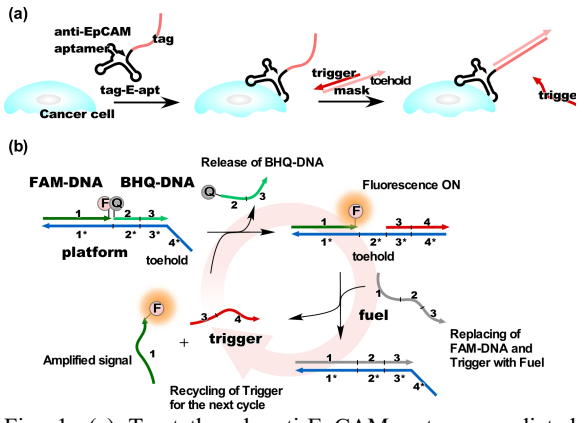


Fig. 1. (a) Tag-tethered anti-EpCAM aptamer-mediated strand exchange on cancer cells and resulting trigger release. (b) Fluorescence signal amplification based on entropy-driven catalysis (DNA circuit) initiated by the trigger.

Oral(first day)

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

Analysis, Measurement, Sensor devices/ DDS

Chair; Noriyuki Asakura (Tokyo Institute of Tech.)

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

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

*Kazuya Inoue[1], Yin Ruikang[1], Shohei Uchinomiya[1], Akio Ojida[1] (1. Faculty of pharmacy, Kyushu University)

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

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

*Yudai Ode[1], Peni Ahmadi[2], Yang Wang[3], Xiaojie Yin[3], Nozomi Sato[3], Hiromitsu Haba[3], Ambara R. Pradipta[1,2], Katsunori Tanaka[1,2,4] (1. Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN, 3. RI Application Research Group, Nishina Center for Accelerator-Based Science, RIKEN, 4. Biofunctional Chemistry Laboratory, Alexander Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University)

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

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

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

蛍光プローブを用いた脂肪酸β酸化阻害剤の探索

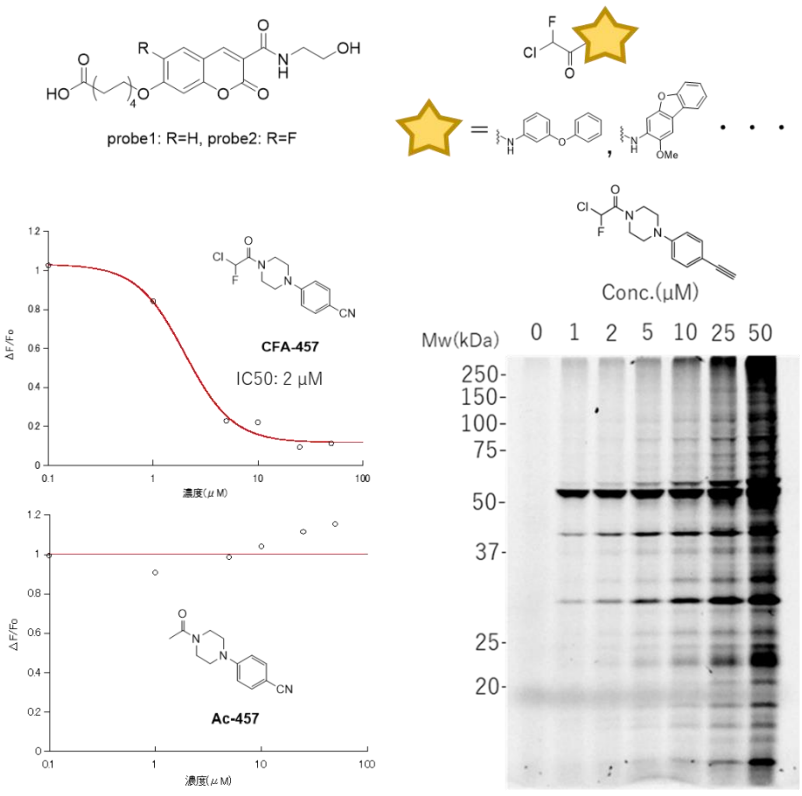
○井上　和哉・Yin Ruikang・内之宮祥平・王子田彰夫（九大院薬）

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

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

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

反応性フラグメントライブラリーを HepG2 細胞に添加した後、プローブ **2** を加えプレートリーダーを用いて蛍光強度を算出した。その結果、プローブ **2** の蛍光を減少させる CFA-457 を見出した(IC_{50}=2 μM)。反応基部位を CFA 基からアセチル基に変更したところ阻害活性を示さなかったことから、CFA-457 は何らかのタンパク質と共有結合を形成することでβ酸化活性を阻害していると示唆される。続いて CFA-457 にアルキンを導入した阻害剤を合成し、ABPP による細胞内タンパク質のラベル化挙動の解析を行ったところ、化合物が特異的にタンパク質をラベル化することが分かった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いてこの化合物の局在を調べたところ、化合物がミトコンドリアに集積している結果が得られた。



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

アクロレインとの反応に基づくα線放出核種を用いたがん治療

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

Cancer treatment using alpha-ray emitters based on the reaction with acrolein (Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology[1], Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN[2], RI Application Research Group, Nishina Center for Accelerator-Based Science, RIKEN[3], Biofunctional Chemistry Laboratory, Alexander Butlerov Institute of Chemistry, Kazan Federal University[4]) Ode Yudai[1]; Peni Ahmadi[2]; Yang Wang[3]; Xiaojie Yin[3]; Nozomi Sato[3]; Hiromitsu Haba[3]; Ambara R. Pradipta[1,2]; Tanaka Katsunori[1,2,4]

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

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

光濃縮を基盤とした膜透過性ペプチドのサイトゾル導入促進

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

Enhanced cytosolic delivery system based on light-induced condensation of cell-penetrating peptides

(Graduate School of Science, Osaka Prefecture University[1], Research Institute for Light-induced Acceleration System (RILACS), Osaka Prefecture University[2], Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University[3])
NAKASE, Ikuhiko[1,2]; MIYAI, Moe[1,2]; NOGUCHI, Kosuke[1,2]; TOKONAMI, Shiho[2,3]; IIDA, Takuya[1,2]

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

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

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

<参考文献>

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

©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)

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

Sugar, Lipids/Medical biology

Chair: Yusuke Kitamura (Kumamoto Univ.)

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

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

*Yoshiyuki Manabe[1,2], Marchetti Roberta[3], Tomoyuki Takebe[1], Satomi Kasahara[1], Yohei Takakura[1], Wataru Nihei[1], Katsunori Tanaka[4,5], Kazuya Kabayama[1,2], Alba Silipo[3], Antonio Molinaro[3], Koichi Fukase[1,2] (1. Graduate School of Science, Osaka University, 2. Project Research Center for Fundamental Sciences, Osaka University, 3. Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II, 4. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, RIKEN, 5. Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology)

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

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

*Hidehiro ITO[1], Arisa Yamauchi[1], Shunsuke Odai[1], Masaki Okamoto[2], Toshiaki Kamachi[1] (1. Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Faculty of Letters, Keio University)

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

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

*Yudai Tabuchi[1], Masumi Taki[1] (1. Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications)

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

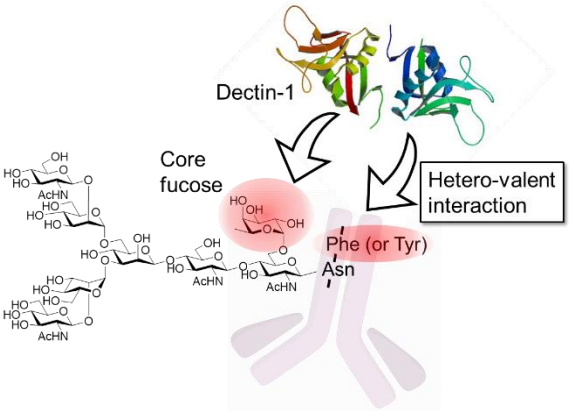
○真鍋良幸[1,2]・Roberta Marchetti[3]・武部智之[1]・笠原里実[1]・高倉陽平[1]・二瓶渉[1]・田中克典[4,5]・樺山一哉[1,2]・Alba Silipo[3]・Antonio Molinaro[3]・深瀬 浩一[1,2]（[1]阪大院理，[2]阪大基礎理学プロジェクトセンター，[3]フェデリコ２世ナポリ大学，[4]理研，[5]東工大物質理工）

Chemical biology study on core fucose-containing N-glycan (Graduate School of Science, Osaka University[1], Project Research Center for Fundamental Sciences, Osaka University[2], Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II[3], Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, RIKEN[4], Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology[5]) MANABE, Yoshiyuki[1,2]; MARCHETTI, Roberta[3]; TAKEBE, Tomoyuki[1]; KASAHARA, Satomi[1]; TAKAKURA, Yohei[1]; NIHEI, Wataru[1]; TANAKA, Katsunori[4,5]; KABAYAMA, Kazuya[1,2]; SILIPO, Alba[3]; MOLINARO, Antonio[3]; FUKASE, Koichi[1,2]

N-結合型糖鎖（*N*-グリカン）はタンパク質のアスパラギン残基に対する修飾糖鎖で，コアフコースは *N*-グリカンの還元末端の *N*-アセチルグルコサミンに付加したフコースで，α1,6-フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）により形成される．コアフコースは，がんや免疫調節をはじめとするさまざまな生命現象に関与する．本研究では，コアフコース認識レクチンを発見した．また，コアフコースの活性制御を目指し，FUT8 阻害剤の開発も検討した．

1．コアフコース認識レクチンの探索

まず，Fut8 ノックアウトしたマウスから採取した IgG（Fut8 KO IgG）と野生型マウスの IgG（WT IgG）の *in vivo* イメージングの結果から，免疫細胞上にコアフコース認識レクチンが存在することを示唆する結果を得た．続いて，SPR を用いた相互作用解析により，真菌のβ-グリカンを認識する自然免疫受容体の Dectin-1 が IgG 抗体上のコアフコースを認識することを見出した．これは内因性のコアフコース認識レクチンの初の報告である．加えて，STD-NMR を用いた解析の結果，Dectin-1 はコアフコースに加え，グリコシル化部位に隣接する芳香族アミノ酸を合わせて多点認識するユニークな結合様式を持つことを明らかにした．



2．FUT8 阻害剤の開発

約 30000 個の化合物ライブラリを用いたハイスループットスクリーニングにより，FUT8 阻害剤のファーマコフォアを発見した．この構造をもとに構造展開し，IC_{50} が 10 μM 程度の FUT8 阻害剤を創製した．開発した阻害剤の作用機構を精査したところ，本化合物は FUT8 に結合したのちに分解し，生じた活性中間体が共有結合阻害剤として機能していることが分かった．さらに，この阻害剤をプロドラッグ化することで，安定性の問題を解決し，細胞系で機能する世界初の FUT8 選択的阻害剤の創製に至った．

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

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

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

Oxygen Concentration Imaging in 3T3-L1 Adipocytes Using Phosphorescent Mesoporous Silica Nanoparticles Modified with Platinum Porphyrin (Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology [1], Faculty of Letters, Keio University [2]) ITO, Hidehiro[1]; YAMAUCHI, Arisa[1]; ODAI, Shunsuke[1]; OKAMOTO, Masaki[2]; KAMACHI, Toshiaki[1]

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

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

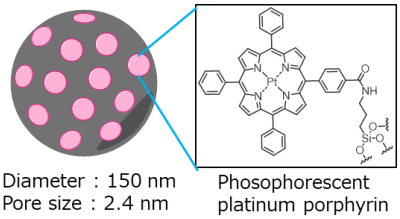


Fig. 1 Schematic of PtP@MSN.

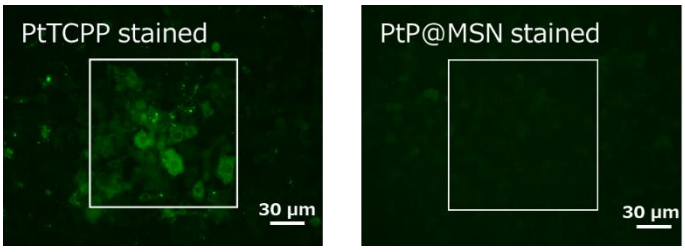


Fig. 2 Intracellular ROS levels determined using an H_2DCFDA in 3T3-L1 adipocyte cells staining PtTCPP (left) and PtP@MSN (right) after intracellular oxygen concentration imaging.

1) Kurokawa, H; Ito, H; Inoue, M; Tabata, K; Sato, Y; Yamagata, K; Kizaka-Kondoh, S; Kadonosono, T; Yano, S; Inoue, M; Kamachi, T, *Scientific Reports*, **2015**, *5*:10657

2) Kitajima, N.; Umehara, Y.; Son, A.; Kondo, T.; Tanabe, K. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 4168-4175.

3) Umehara, Y.; Kimura, Y.; Kleitz, F.; Nishihara, T.; Kondo, T.; Tanabe, K. *RSC Adv.*, **2021**, *11*, 5865-5873.

©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

中分子バイオロジクス型共有結合性薬剤

○田淵雄大[1]・瀧真清[1]（[1]電気通信大学大学院）

Middle-biologics as covalent drugs (Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications[1]) TABUCHI, Yudai[1]; TAKI, Masumi[1]

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

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

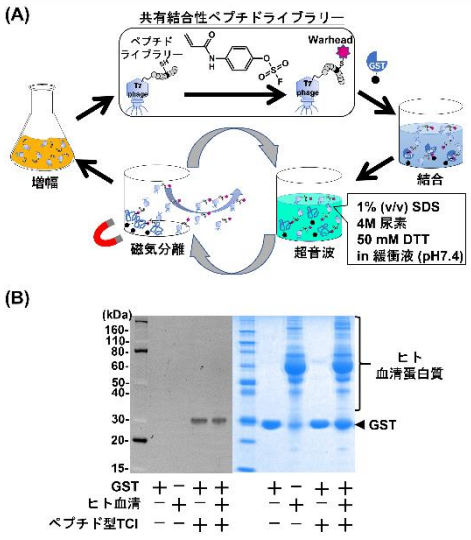


図 1. (A) 共有結合性ペプチドライブラリーを用いたセレクション, (B) ペプチド型 TCI (蛍光標識済)の標的特異性

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



図 2. 核酸アプタマー型 TCI の反応様式及び相補鎖による薬効の中和

1) **Y. Tabuchi**, T. Watanabe, R. Katsuki, Y. Ito, M. Taki, *Chem. Commun.* (HOT and cover article), **57**, 5378 (2021).
2) **Y. Tabuchi**, J. Yang, M. Taki, *Chem. Commun.* (cover article), **57**, 2483 (2021).

Online Seminar(first day)

Wed. Sep 8, 2021 12:20 PM - 1:20 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 3:20 AM - 4:20 AM UTC | Room B
Zoom

ASTECH CORPORATION

Chair: Toshihiko Sakurai (Tottori Univ.)

12:20 PM - 1:20 PM JST | 3:20 AM - 4:20 AM UTC

[1B-OS] Basics and Applications of Solid-Phase Synthesis Method: -Design, Side Reactions and Manufacturing-

*Takanori Ikegami[1] (1. ASTECH CORPORATION)

オンラインセミナー

アステック株式会社

タイトル：固相合成法の基礎と応用：
～設計、副反応および製造について～

講師：池上孝紀 様（アステック株式会社）

近年ペプチドベースの治療法は、多くの医薬品開発プログラムの将来として期待されており、これらの化合物は、癌ワクチン、個別化医療、代謝性疾患や心血管疾患の治療など、多くの臨床治療分野で利用されています。

これらの画期的な創薬は通常、標的配列の固相ペプチド合成（SPPS）から研究が始まります。このごろペプチドの化学的複雑さが増す中で、新しいペプチド配列の合成を自動化するプロトコルを開発するときに、成功の可能性を最大化するにはどうすればよいでしょうか。副反応のリスクを最小限に抑えるにはどうすればよいでしょうか？そして、製造に移行するときに研究者が直面する課題は何でしょうか？

本オンラインセミナーでは、以下の内容をご説明いたします。

- 合成配列の分析や合成方法論などの基礎に焦点を当てて、SPPS理論と合成設計の主要な領域について説明いたします。
- SPPS中に発生する副反応に対しての合成戦略にも焦点が当てて説明いたします。
- 臨床用ペプチド製品を製造する際のcGMPおよび規制順守に重要なペプチドシンセサイザーの機能についても説明いたします。

Online Seminar(first day)

Wed. Sep 8, 2021 11:20 AM - 12:20 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 2:20 AM - 3:20 AM UTC | Room C
Zoom

CEM Japan

Chair: Tomoya Hino (Tottori Univ.)

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

[1C-OS] High-speed epitope mapping and screening of peptides, and peptide synthesizer

*Yokono Ken[1], Koichi Sato[1] (1. CEM Japan)

オンラインセミナー

CEM Japan株式会社

タイトル：ペプチドの高速スクリーニング・エピトープ マッピングと合成機の紹介

講師：横野健 様、佐藤公一 様（CEM Japan株式会社）

医薬品として、また機能性食品としても注目を集めているペプチドですが、これらをはじめとする多くの分野での開発研究が、ペプチドアレイを用いることにより大幅に効率化、高速化できることはあまり知られていません。

最初のプレゼンテーションでは、このペプチドアレイをそのままアッセイのできるセルロース媒体の上に直接合成するSPOT合成を中心にお話をさせていただきます。

まず、従来のレジン合成とのアプリケーションにおける違い、次にSPOT合成を用いたエピトープマッピング、アレルゲンの同定、ウイルスに対する抗体のスクリーニング、ペプチドライブラリによる結合能の最適化の実例を紹介させていただきます。さらにSPOT合成にかかる時間とコスト、合成機の機能と価格についてお話をさせていただき、検討から導入、稼働させるまでのステップにも触れさせていただきます。

CEM社では、SPOT合成用の機械だけでなく、各種アプリケーション需要にお応えできるマイクロ波連続型、パラレル型のペプチド合成機をご用意させていただいております。２番目のプレゼンテーションでは、このうち、マイクロ波連続型の合成機について、CEM社独自の技術をご紹介させていただきます。

時間は合計で45分程度を予定しております。この機会にSPOT合成に触れていただければ幸いです。

Poster(first day)

Wed. Sep 8, 2021 4:50 PM - 5:50 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 7:50 AM - 8:50 AM UTC | First half number Zoom

Odd (1P-001~1P-047)

[1P-001] Development of chemi-genetic calcium ion indicators based on Photoactive Yellow Protein-tag

*Hayato Kadoya[1], Yusuke Nasu[1], Takuya Terai[1], Robert Earl Campbell[1,2] (1. Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, University of Alberta)

[1P-003] Development of global DNA methylation level sensing system using MBD-GFP and CXXC-TagRFP-T

*Marika Fujita[1], Natsumi Taka[1], Wataru Yoshida[1] (1. Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology)

[1P-005] Establishment of Ni(II)-complex modified phage display method against His-hDM2

*Shota Kakehi[1], Kenta Seko[1], Takayuki Miki[1], Hisakazu Mihara[1] (1. Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[1P-007] Importance of cooperative molecular interactions in the self poly (ADP ribosyl) ation of PARP-1

*Saki Aoki[1], Midori Turuta[1], Sakura Hosoi[1], Masato Mashimo[1], Kayo Sugimoto[1], Mami Hamori[1], Hiroyuki Furusawa[2], Shigeru Negi[1] (1. Faculty of Pharmacy, Doshisha Women University, 2. IPGE, Yamagata University)

[1P-009] An Efficient One-pot Peptide Ligation Strategy Mediated by N-terminal Thiazolidine deprotection using 2-aminobenzamide derivatives

*Koki Nakatsu[1], Hiroshi Murakami[1,2], Gosuke Hayashi[1], Akimitsu Okamoto[3,4] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University, 3. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 4. Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo)

[1P-011] Fluorescence correlation spectroscopic analysis of formation of surface BODIPY-labeled artificial viral capsid under molecular crowding conditions

*Satomi Yano[1], Risako Kobayashi[1], Hiroshi Inaba[1], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[1P-013] Synthesis and O_2 Affinity Control of Recombinant Human Hemoglobin Nanoparticles

*Tatsuhiro Kobayashi[1], Wataru Okamoto[1], Mai Hasegawa[1], Yoshitsugu Morita[1], Teruyuki Komatsu[1] (1. Faculty of Science and Engineering, Chuo University)

[1P-015] Controlling the dynamic assembly of the β-helical protein needle by tip engineering

*Kosuke Kikuchi[1], Tatsuya Fukuyama[2], Takayuki Uchihashi[3], Tadaomi Furuta[1], Yusuke Maeda[2], Takafumi Ueno[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Department of Physics, Kyusyu University, 3. Department of Physics, Nagoya University)

[1P-017] Construction of fluorescent immunosensor for detecting recombinant proteins produced in bioprocess

*Xuerao NING[1], Takanobu YASUDA[1], Bo ZHU[2], 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, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology)

[1P-019] Selective Anchoring of Artificial Lipid-modified Proteins to Membrane Domain and Evaluation of Localization Behavior

*Kazuki Uchida[1], Hiroki Obayashi[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1], Naofumi Shimokawa[2], Masahiro Takagi[2], Noriho Kamiya[1] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. JAIST)

[1P-021] Activation of adenosine A_{2A} receptor from class A GPCR utilizing coordination chemogenetics

*Takuto Sugawara[1], Muneo Tsujikawa[2], Yuta Deen Miura[1], Akinobu Senoo[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-023] Non-Native Reactions Based on Substrate Misrecognition System in Bacteria Expresssing Homologs of P450BM3

*Fumiya Ito[1], Shinya Ariyasu[1], Masayuki Karasawa[1], Joshua Kyle Stanfield[1], Yuya Yokoyama[1], Chie Kasai[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[1P-025] Enhancing the Solubility of Monobody by Optimizing C-terminal Sequence − Toward Development of SARS-CoV-2 Neutralizing Proteins

*Shun Umemoto[1], Hikaru Saiki[1], Taishi Kondo[1], Tomoshige Fujino[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[1P-027] A chemogenetic platform for manipulating plasma membrane signaling

*Sachio Suzuki[1], Yuka Hatano[1], Akinobu Nakamura[2], Masaru Yoshikawa[1], Tatsuyuki Yoshii[3], Kazuhiro Aoki[2], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 2. National Institute for Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences, 3. Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University)

[1P-029] Development of artificial metalloenzymes toward stereodivergent Michael addition reactions

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

[1P-031] Identification of synaptic cleft-resident proteins with photo-proximity labeling

*Hayata Utsunomiya[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-033] Analysis of Interaction of a Highly Adhesive Protein to Material Surfaces by Molecular Dynamics Calculation

*Jun Sasahara[1], Atsuo Suzuki[1], Kazushi Fujimoto[1], Susumu Okazaki[2], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

[1P-035] The development of immunotherapeutics that redirect endogenous antibodies to cancer cells

*Hiroshi Tagawa[1], Takshi Mori[1,2], Akihiro Kishimura[1,2], Yoshiki Katayama[1,2] (1. Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, 2. Graduate School of Engineering, Kyushu University)

[1P-037] Synthesis of Ribbon-like Gold Nanocrystals Using A Nuclear Localization Signal Tethering Peptide as A Template

*Kazutoshi Ishida[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[1P-039] Development of a High-throughput Screening Platform for Directed Evolution of Myoglobin Reconstituted with an Iron Corrole Complex

*Koki Takeuchi[1], Shunsuke Kato[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[1P-041] Construction of Hydrogel Containing Trimeric Coiled-coil Peptides with Azido Groups at N-terminal Sites

*Takumi Ikeda[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[1P-043] Development of novel genome-scale DNA synthesis technology using chemical methods

*Kohei Nomura[1], Kaoru Onda[1], Yiuno Gao[1], Hirotaka Murase[1], Kosuke Nakamoto[1], Masahito Inagaki[1], Haruka Hiraoka[1], Naoko Abe[1], Fumitaka Hashiya[2], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,3,4] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Material Science, Nagoya University, 3. CREST, Japan Science and Technology Agency, 4. Institute for Glyco-core Research (iGCORE))

[1P-045] Discovery of non-canonical structures formed by non-canonical rules

*Rio Matsumoto[1], Yousuke Katsuda[1], Shin-ichi Sato[2], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[3], Motonari Uesugi[2], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University, 2. Institute for Chemical Research, Kyoto University, 3. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University)

[1P-047] *In vitro* selection system of ribozymes adaptable to μ-droplet compartment: toward artificial evolution of ribozyme quaternary structures

*Misato Ueda[1], Shigeyoshi Matsumura[1,2], Yoshiya Ikawa[1,2] (1. Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, 2. Graduate School of Innovative Life Science, University of Toyama)

Photoactive Yellow Protein タグを用いた chemi-genetic 蛍光カルシウムイオンセンサーの開発

○門屋颯人[1]・那須雄介[1]・寺井琢也[1]・Robert E. Campbell[1,2]（[1]東京大院理、[2]アルバータ大化学科）

Development of chemi-genetic calcium ion indicators based on Photoactive Yellow Protein-tag (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1], Department of Chemistry, University of Alberta[2]) KADOYA, Hayato[1]; NASU, Yusuke[1]; TERAI, Takuya[1]; CAMPBELL, Robert E.[1,2]

蛍光タンパク質は、現代の生物学研究において多くの画期的発見を促進してきた、強力かつ広く利用されているツールである。しかし、遺伝子工学的手法により開発された蛍光タンパク質センサーの中で近赤外領域に発光を持つものの数は限られているため、組織の奥深くにある標準物質を可視化することは困難である。この限界を克服するためのアプローチのひとつとして、細胞内に発現させた特定のタンパク質（タグタンパク質）と、それに共有結合するように設計された発蛍光合成色素を併用する化学遺伝学（chemi-genetic）蛍光タンパク質を利用する方法[1,2]が挙げられる。本研究では、Photoactive Yellow Protein (PYP)[3]を新たなタグタンパク質として選択し、Ca^{2+}濃度に応答したタンパク質の立体構造変化によって蛍光強度が変化する、化学遺伝学蛍光 Ca^{2+}センサーの開発（Fig. 1A）を目的とした。

PYP に Ca^{2+}応答性を付与するため、Ca^{2+}感知ドメインである CaM-RS20 ペプチドを PYP 中の 10 箇所のループ（Fig. 1B, C）にリンカーを介して挿入した。これらの変異体について、PYP と結合する緑色蛍光色素 DMAC-CMK（Fig. 1D）を用いて、Ca^{2+}依存性の蛍光応答を *in vitro* で評価した。Ca^{2+}添加時に明瞭な蛍光強度の変化を示したプロトタイプは、C 末端側のリンカーから 1〜3 残基を削除してリンカーの長さを調整し、続いて N 末端側でも残基を削除して最適化した（Fig. 1B）。最適化された変異体は、Ca^{2+}添加による蛍光強度の変化率が 25%以上にまで増加した。

現在これらの変異体について、蛍光強度や Ca^{2+}応答性を改善するために指向性タンパク質進化による最適化を進めている。その後は、標識効率、明るさ、および生理学的に適切な Ca^{2+}濃度変化に対する応答性を確認するために、細胞内での評価を実施する予定である。また、近赤外領域の合成色素についても、同様の手法を用いて蛍光強度変化型の Ca^{2+}センサーの開発を進めている。本研究が成功すれば、細胞や組織での多波長蛍光イメージングが可能になると期待される。

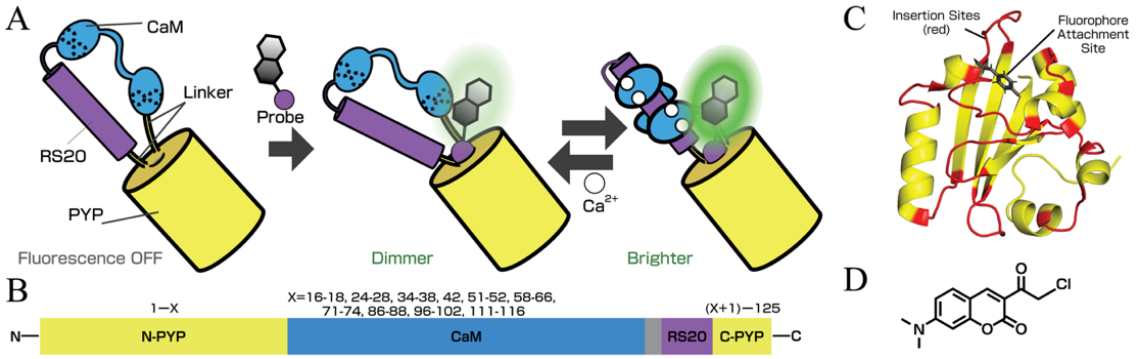


Figure 1. (A) Schematic of fluorogenic chemi-genetic indicator. (B) Topology of prototype indicator. (C) Crystal structure of PYP (PDB ID: 2ZOI) with labelled insertion sites (red), and fluorophore attachment site (black). (D) Chemical structure of fluorogenic probe DMAC-CMK.

1) Abdelfattah, A. S. et al. *Science* **365**, 699–704 (2019).
2) Deo, C., Abdelfattah, A.S., Bhargava, H.K. et al. *Nat Chem Biol* **17**, 718–723 (2021).
3) Hori, Y. et al. *Journal of the American Chemical Society*, 131(46):16610-16611 (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

MBD-GFP と CXXC-TagRFP-T を用いたゲノム DNA メチル化レベル定量法の開発

○藤田 希香・髙 夏海・吉田 亘（東京工科大院バイオニクス）

Development of global DNA methylation level sensing system using MBD-GFP and CXXC-TagRFP-T

(Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology) FUJITA, Marika; TAKA, Natsumi; YOSHIDA, Wataru

DNA メチル化とはゲノム DNA 中の CpG のシトシンの 5 位炭素がメチル化される反応であり、遺伝子発現制御に関連している。ヒトゲノム DNA の約 45%は反復配列で構成されており、正常細胞では高度にメチル化されている。一方、がん細胞ではメチル化レベルが低下しているため、ゲノム DNA のメチル化レベルは、がんのバイオマーカーとして利用できる。本研究室ではメチル化 CpG 結合蛋白質(Methyl-CpG-binding domain: MBD)とホタルルシフェラーゼの融合蛋白質と、非メチル化 CpG 結合蛋白質(Cys-X-X-Cys motif: CXXC)とトゲオキヒオドシエビ由来ルシフェラーゼの融合蛋白質を用いたゲノム DNA メチル化レベル測定法を開発している[1-4]。本手法は、ゲノム DNA に結合させた DNA インターカレーターと融合蛋白質間で起こる生物発光共鳴エネルギー移動を利用したゲノム DNA メチル化レベル測定法である。そこで、本研究では MBD に緑色蛍光蛋白質(Green fluorescent protein: GFP)を融合させた蛋白質 MBD-GFP と CXXC に赤色蛍光蛋白質(Tag Red fluorescent protein-T: TagRFP-T)を融合させた蛋白質 CXXC-TagRFP-T を用いて、これら蛍光強度を指標にゲノム DNA のメチル化レベルを測定する方法を開発することを目的とした。

pET30c-*StreptagII-MBD-GFP*、pET30c-*StreptagII-CXXC-TagRFP-T* 発現ベクターを構築した。これら発現ベクターを用いて BL21 (DE3)を形質転換し、MBD-GFP と CXXC-TagRFP-T の発現誘導を行った。得られた水溶性画分から、Strep-Tactin カラムを用いて MBD-GFP と CXXC-TagRFP-T を精製し、SDS-PAGE によりこれら融合蛋白質が精製されていることを確認した。次に、MBD-GFP と CXXC-TagRFP-T がメチル化 DNA または非メチル化 DNA にそれぞれ特異的に結合するか検討した。ビオチン修飾メチル化 DNA とビオチン修飾非メチル化 DNA を化学合成し、メチル化レベルが 0, 25, 50, 75, 100%となるように混合した。ストレプトアビジンが固定化されているプレートにこれらメチル化レベルが異なる DNA を固定化し、MBD-GFP または CXXC-TagRFP-T を加え、洗浄後、GFP または TagRFP-T の蛍光強度を測定した。その結果、MBD-GFP の蛍光強度は固定化した二本鎖 DNA のメチル化レベルに、CXXC-TagRFP-T の蛍光強度は固定化した二本鎖 DNA の非メチル化レベルに依存して上昇した。つまり、MBD-GFP はメチル化 DNA に、CXXC-TagRFP-T は非メチル化 DNA に特異的に結合し、それらの結合はそれぞれの蛍光強度を指標に検出できることが示された。

次に、MBD-GFP と CXXC-TagRFP-T を用いて、ゲノム DNA のメチル化レベルを測定できるか検討した。HeLa 細胞と DNA メチル化酵素阻害剤で処理した HeLa 細胞からゲノム DNA を抽出し、メチル化レベルが異なる 2 種類のゲノム DNA を調整した。アミノ基が固定化されているプレートにこれらゲノム DNA を別々に固定化し、MBD-GFP または CXXC-TagRFP-T を加え、洗浄後、GFP または TagRFP-T の蛍光強度を測定した。その結果、MBD-GFP と CXXC-TagRFP-T の蛍光強度は固定化したゲノム DNA のメチル化レベルに依存することが示された。以上の結果より、MBD-GFP と CXXC-TagRFP-T を用いてゲノム DNA のメチル化レベルを測定できることが示された。

1) W. Yoshida, Y. Baba, I. Karube, *Anal. Chem.*, **88**, 9264 (2016)
2) W. Yoshida, Y. Baba, K. Banzawa, I. Karube, *Anal. Chem. Acta.*, **990**, 168 (2017)
3) Y. Baba, I. Karube, W. Yoshida, *Anal. Lett.*, **52**, 754 (2019)
4) Y. Baba, K. Yamamoto, W. Yoshida, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 4765 (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

His タグ融合 hDM2 を標的とした Ni(II)錯体修飾ファージディスプレイ法の確立

○筧 翔太・瀬古 健太・三木 卓幸・三原 久和（東工大生命理工）

Establishment of Ni(II)-complex modified phage display method against His-hDM2 (Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) KAKEHI, Shota; SEKO, Kenta; MIKI, Takayuki; MIHARA, Hisakazu

中分子医薬品のリードペプチドの探索方法としてファージディスプレイ法が挙げられる。バクテリオファージの遺伝子に、ランダムな DNA 配列を挿入することで、ランダムなペプチド配列を外殻蛋白質上へ提示したファージライブラリを構築できる。10^9 超の多様性を有するライブラリから、標的蛋白質と強く結合するペプチドを提示したファージのみ回収することで、リードペプチドを同定できる。しかし膜蛋白質や蛋白質複合体などは創薬において注目されるが、精製が難しいため適応が困難である。未精製の夾雑環境下ではファージが標的以外の分子にも結合してしまう。したがって夾雑環境下でのスクリーニングで得られたファージプールは標的非特異的なジャンクファージが大半を占め、リードペプチドの同定が困難である。

本研究では夾雑環境下においても標的特異的なペプチドリガンドが探索可能な"Ni(II)錯体修飾ファージディスプレイ法"の開発を目的とした。これは通常のファージディスプレイ法に、金属錯体と His タグ間の相互作用を組み込んだ手法である(図 1)。標的に対して親和性を有するファージは提示するペプチドと標的蛋白質間の相互作用(a)に加え、Ni(II)錯体と His タグ間の相互作用(b)によって強固に結合する。そのため、ヒットファージの回収率を増加でき、ヒット率を高められる。非特異的に結合するファージは厳しい洗浄により除去することで、リードペプチドの同定が可能になると考えた。

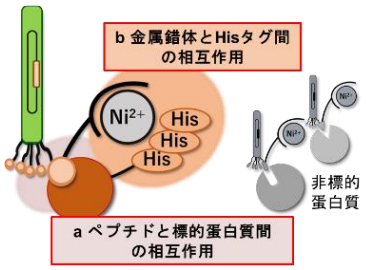


図 1. Ni(II)錯体と His タグの相互作用を組込んだファージディスプレイ法

Ni(II)錯体として、His タグとの親和性が低い順に Ni(II)-NTA（ニトリロ三酢酸）錯体、Ni(II)-IDA（イミノ二酢酸）錯体と Ni(II)-bisNTA 錯体を選択した。これらの Ni(II)錯体をファージのランダムペプチド部位近傍へ化学修飾し、Ni(II)錯体修飾ファージライブラリを構築した。まずヒットファージの回収率の増加を評価するため、精製条件下で hDM2 (human Double Minute2)を標的蛋白質のモデルとしてスクリーニングした。His-hDM2 に対して Ni(II)錯体修飾ファージを添加し、洗浄の後、標的へ結合したファージを回収した。その結果、Ni(II)錯体修飾により回収率がそれぞれ 8.1, 15, 440 倍上昇し、Ni(II)錯体と His タグ間の相互作用でファージがより強く His-hDM2 へ結合したことが確認された。続いて次世代シーケンサーを用いてスクリーニングで得られたペプチド配列を解析した。hDM2 は[i, i+4, i+7]位置に[F, W, L]をもつペプチドが強く結合することが知られている。そこでスクリーニング前後における "FWL 類似ペプチド"の存在比の変化を評価した。Ni(II)-NTA/IDA 錯体を修飾した際には類似度の高いペプチド(赤プロット)が濃縮される傾向にあった(図 2)。一方、錯体なし/Ni(II)-bisNTA 錯体修飾時はそれらが淘汰される傾向にあった。Ni(II)-bisNTA 錯体は His タグとの親和性が高すぎるために、ペプチド配列に関係なくファージが回収されたと考えられる。以上より His タグと適度な親和性の Ni(II)錯体を化学修飾することで、hDM2 特異的なペプチド配列を有意に濃縮できた。また夾雑環境下においても Ni(II)-IDA 修飾ファージライブラリを用いてスクリーニングを行い、評価したので報告する。

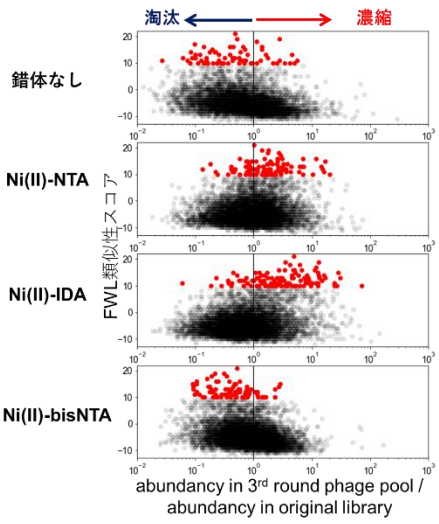


図 2. 各錯体修飾時のペプチドの存在比変化

PARP-1 の自己 PAR 化反応における協同的分子間相互作用の重要性

○青木咲樹[1]・鶴田みどり[1]・細井咲良[1]・間下雅士[1]・杉本佳与[1]・羽森真美[1]・
古澤宏幸[2]・根木滋[1] ([1]同志社女子大学・薬、[2]山形大院 IPGE)

Importance of cooperative molecular interactions in the self poly (ADP ribosyl) ation of PARP-1 ([1]Doshisha Women's University, [2]Yamagata University) AOKI, Saki[1] ; TURUTA Midori[1] ; HOSOI Sakura[1] ; MASHIMO Masato [1]; SUGIMOTO, Kayo[1] ; HAMORI Mami [1]; FURUSAWA Hiroyuki[2]; NEGI Shigeru[1]

PARP-1 (Poly (ADP-ribose) polymerase-1)は、DNA 修復などを始めとする多岐にわたる細胞機能に関与しており、特異的阻害剤を含めた標的タンパク質として注目されている多機能酵素である。PARP-1 は自己ポリ ADP リボシル化 (PAR 化) により DNA の修復等に関与する。Pascal らにより損傷 DNA への結合に重要な役割を果たすアミノ酸残基が X 線構造解析から示された (Fig. 1)。[1)] しかし、その詳細については不明な点も多い。そこで本研究では、重要なアミノ酸の一つである WGR ドメインに存在する W589 残基に注目し、PARP-1 WT および Ala、Leu、His、Phe および Tyr 残基に変異させた点変異体の自己 PAR 化反応を比較し、DNA 修復機構における W589 残基の協同的分子間相互作用の重要性について検討を行った。

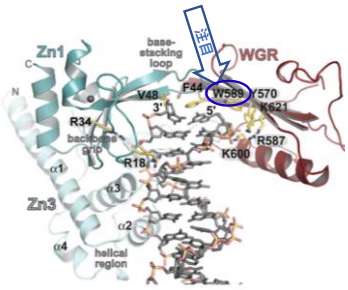


Fig 1. X-ray structure of PARP-1-DSB DNA complex.

試験管内において、PARP-1 WT および各点変異体 (W589Y ,W589F, W589H, W589L, W589A) を作製し自己 PAR 化反応を行い、ウェスタンブロッティングで解析を行った結果、変異体の Trp 残基が関与すると考えられる分子間相互作用を系統的に減じるにつれ、自己 PAR 化反応の反応性は低下し PAR の産生量が明らかに減少した。さらに、PARP-1 の mCherry 融合タンパク質を作製し細胞核内での自己 PAR 化反応においては、WT では PAR 化反応進行にともない高分子量の PAR が生成した。変異体では W589Y や W589F において PAR 産生が認められたが、WT と比較するとその産生量が著しく低下し、W589H, W589L および W589A は、PAR 産生は全く認められなかった。

次に、ゲルシフトアッセイおよび水晶発振子マイクロバランス法 (QCM)を用いて、未修飾 PARP-1 WT と点変異体 W589A における損傷 DNA への結合能の比較を行った。ゲルシフトアッセイにおいては両者の DNA 結合能にあまり差が認められなかった。次に QCM 測定を用いてより定量的な測定を行った結果、両者の間で損傷 DNA への結合速度に差が認められ、W589A のほうが WT よりも DNA に緩やかに結合した。しかし、WT と W589A ともに最終的な熱力学的な平衡状態において DNA に対する結合量に差がないことから、未修飾 PARP-1 の DNA 結合に関して、W589 残基の分子間相互作用はあまり影響がないことが明らかとなった。

また、細胞核内での PARP-1 と DNA の結合・解離挙動に関して、レーザーを細胞核に照射し DNA に損傷を与え、照射部位における mCherry の蛍光強度の時間変化から DNA 損傷部位に対する PARP-1 の最大集積量および DNA 損傷部位からの解離時間を解析した。その結果、PARP-1 が DNA 損傷部位に集積する最大量は、WT が点変異体よりも大きいことが明らかとなった。さらに、DNA 損傷部位から PARP-1 が解離するまでの時間について、Trp 残基が関与すると考えられる分子間相互作用を減じるにつれ、DNA 損傷部位からより速く解離する傾向が認められた。

W589 の Trp 残基のインドール環はその構造からも分かるように、π-π 相互作用、水素結合性、静電相互作用、疎水性相互作用などの複数の分子間相互作用を形成することが可能である。今回の実験から、これらの分子間相互作用の協同的作用が、PARP-1 の自己 PAR 化反応において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

1) M.-F. Langelier, J. L. Planck, S. Roy, J. M. Pascal, *Science*, **336**, 728-732 (2012) .

2-aminobenzamide 誘導体を用いた N 末端チアゾリジン脱保護による高効率 one-pot ペプチド連結法

○中津幸輝[1]・村上裕[1,2]・林剛介[1]・岡本晃充[3,4]（[1]名大院工、[2]名大ナノライフ、[3]東大院工、[4]東大先端研）

An Efficient One-pot Peptide Ligation Strategy Mediated by N-terminal Thiazolidine deprotection using 2-aminobenzamide derivatives (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University[2], Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[3], Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo[4]) Nakatsu, Koki[1]; Murakami, Hiroshi[1,2]; Hayashi, Gosuke[1]; Okamoto, Akimitsu[3,4]

遺伝子工学的手法では調整困難なタンパク質を合成する「タンパク質化学合成法」においては、固相合成したペプチド断片を種々のペプチド連結反応を用いて連結することで達成する。連結反応の中でも Native Chemical ligation (NCL)[1]は最も信頼性の高い反応であり、N 末端 Cys 残基と C 末端チオエステルが中性の水溶液中で縮合される。しかし、連結する断片数が多くなるほど、反応数や精製回数が増加し収率の低下を招くため、複数断片を精製を介さず高効率で連結する「One-pot ペプチド連結法」の開発が望まれる。また、多数のペプチド断片を連結する際、内部のペプチド断片においては、多量化や自己環化を防ぐため N 末端もしくは C 末端の反応性を適切に制御することが必要となる。

N 末端チアゾリジン(1,3-thiazolidine-4-carbonyl, Thz)を Cys の前駆体として用いる報告例が多くある[2]。この N 末端 Thz は pH 4 程度の酸性条件下 methoxyamine と反応させることで Cys へと変換可能であるが、methoxyamine はα効果により高い求核性を持つことからチオエステルと反応してしまうため、多数のペプチド断片の One-pot ペプチド連結に向かない(Fig 1a.)。

本発表では、2-aminobenzamide 誘導体を用いた新しい Thz 脱保護法開発による高効率 One-pot 連結法を報告する。Aniline のアミノ基に対して *o*-位に弱い求核性官能基を導入することで、アルデヒドと反応してイミン形成の後に閉環反応を起こし、加水分解耐性の高い生成物を与える[3]。このタイプの化合物を用い、酸性条件下で Thz の Cys と formaldehyde への加水分解を誘導しつつ、formaldehyde を捕捉することで脱保護が可能になると考えた。いくつかの誘導体を設計して反応条件を検討したところ、ヒドラジドを導入した 2-amino-5-methoxy-*N*′,*N*′-dimethylbenzohydrazide (AMDBH)が pH 4.0 で Thz を効率良く脱保護すると分かった(Fig 1b.)。また methoxyamine に比べて、AMDBH は求核性が抑えられており、NCL の条件でチオエステルとほぼ反応しないことも分かった。さらに、AMDBH 存在下で pH を 7.5 と 4.0 の間で行き来させることで、NCL と Thz の脱保護を連続的におこない、4 つのペプチド断片での高効率 One-pot 連結を達成した(Fig 1c.)。

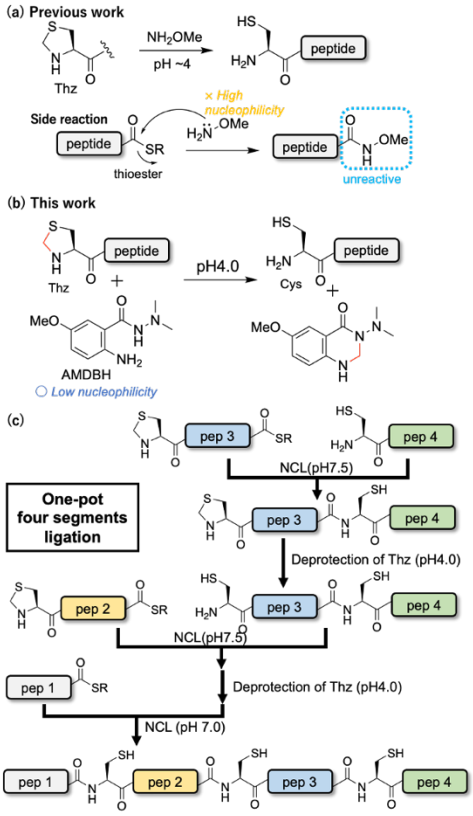


Fig 1. (a) Thz deprotection by methoxyamine. (b) Thz deprotection by AMDBH. (c) Scheme for One-pot four segments ligation.

1) P. E. Dawson, et al., *Science* **1994**, *266*, 776–779. 2) D. Bang, S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534–2538. 3) P. I. Kitov, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 8149–8152.

分子夾雑環境下での表面 BODIPY ラベル人工ウイルスキャプシド形成の蛍光相関分光解析

○矢野智美・小林利沙子・稲葉央・松浦和則（鳥取大院工）

Fluorescence correlation spectroscopic analysis of formation of surface BODIPY-labeled artificial viral capsid under molecular crowding conditions (Graduate School of Engineering, Tottori University) YANO, Satomi ; KOBAYASHI, Risako ; INABA, Hiroshi ; MATSUURA, Kazunori

ウイルスキャプシドは、宿主細胞内の様々な生体高分子が高密度に存在する分子夾雑環境下で自己集合することにより形成している。近年、細胞内を模倣した分子夾雑環境下での生体高分子の構造・安定性・反応性が、希薄水溶液の場合と大きく異なることが明らかにされてきている[1]。当研究室では、ウイルスキャプシドの単純なモデルとして、Tomato bushy stunt virus由来の24残基β-Annulusペプチドが自己集合することで形成する人工ウイルスキャプシドを開発している[2]。また、分子夾雑環境下における蛍光ラベル人工ウイルスキャプシド形成の蛍光相関分光(FCS)解析により、排除体積効果によりキャプシド形成が促進されることを見出している[3]。本研究では、クリック反応により蛍光色素BODIPYをC末端側に修飾したβ-Annulus-BODIPYペプチドを合成し、表面にBODIPYを有する人工ウイルスキャプシド形成における分子クラウディング剤の添加効果をFCSで解析した(Fig.1)。

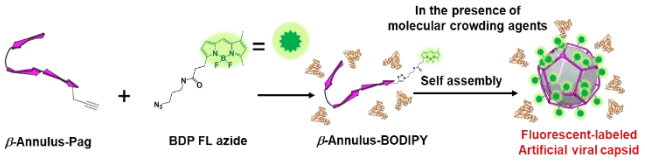


Figure 1. Construction of BODIPY-labeled artificial virus capsid in the presence of molecular crowding agents.

アルキン側鎖を有するpropargylglycine (Pag)をC末端側に導入したβ-Annulus-Pag (INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVG-**Pag**-S)をFmoc固相法で合成し、アジド化BODIPYとのクリック反応によりβ-Annulus-BODIPYを合成した。10 mM Phosphate buffer (pH7.5)中において、1 μM β-Annulus-BODIPYが60 nm程度の球状集合体を形成することを動的光散乱(DLS)測定と透過型電子顕微鏡(TEM)観察により確認した(Fig.2 A,B)。同条件におけるFCS自己相関関数の二成分フィッティングにより、未集合ペプチドと思われる速い成分(43.2%)と、粒径42.4 nmのキャプシドと思われる遅い成分(56.8%)が確認された (Fig.2C)。分子クラウディング剤として5~20 wt% PEG_{2000}、trimethylamine oxide (TMAO)存在下で同様の測定を行ったところ、キャプシドと思われる遅い成分の存在割合が濃度依存的に上昇した(Fig.2D,E)。このことから、排除体積効果によってキャプシド形成が促進したことが示唆された。

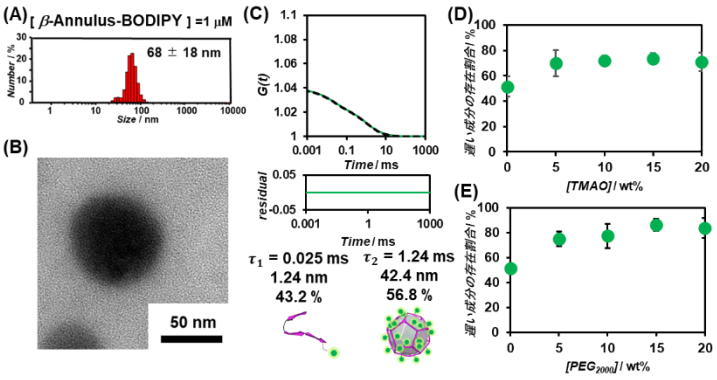


Figure 2. (A) DLS size distribution, (B) TEM image stained with EM stainer, (C) diffusion time and apparent size obtained from FCS autocorrelation function curve in phosphate buffer, (D,E) Effect of (D)TMAO, (E)PEG contents on the ratio of artificial viral capsids at [β-Annulus-BODIPY] = 1 μM.

1) S. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Rev.,* **114**, 2733 (2014)
2) K. Matsuura, *Chem. Commun.* (Feature Article), **54**, 8944 (2018)
3) R. Kobayashi, H. Inaba, K. Matsuura, *Int. J. Mol. Sci.,* **22**, 4754 (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

組換えヒトヘモグロビンナノ粒子の合成と酸素親和性制御

○小林 樹広・岡本 航・長谷川 舞・森田 能次・小松 晃之（中央大理工）

Synthesis and O_2 Affinity Control of Recombinant Human Hemoglobin Nanoparticles (*Faculty of Science and Engineering, Chuo University*) KOBAYASHI, Tatsuhiro; OKAMOTO, Wataru; HASEGAWA Mai; MORITA, Yoshitsugu; KOMATSU, Teruyuki

少子高齢化や新型コロナウイルス感染症拡大に伴う献血者数の減少により、輸血液不足が社会問題となり始め、安全で長期保存可能な人工酸素運搬体の開発に大きな注目が集まっている。我々はヒトヘモグロビン（Hb）を重合して得た微粒子の表面にヒト血清アルブミン（HSA）を結合したコア-シェル型のヒトヘモグロビンナノ粒子（HbNP、粒径約 100 nm）を合成し、その構造と酸素結合能を明らかにした。HbNP は赤血球よりも高い酸素親和性を有するため、出血性ショック状態における低酸素組織への酸素輸送に優れている。一方、Hb の β 鎖ヘムポケット内の遠位アミノ酸である Leu-β28 を Phe に置換した組換えヒトヘモグロビン rHb(βL28F)は、酸素親和性が低下することが報告されている [1]（Fig. 1A）。rHb(βL28F)と組換えアルブミン（rHSA）を用いて酸素親和性を適度に下げた組換えヒトヘモグロビンナノ粒子（rHb(βL28F)NP）を合成することができれば、通常状態においても酸素運搬効率の高い人工酸素運搬体になると考えられる。本研究は rHb(X)NP（X= wt, βL28F）を合成し、その構造と酸素結合能を明らかにすることを目的とした。

Pichia 酵母を宿主として産生した rHb(X)に *N*-Succinimidyl 3-maleimidopropionate（SMP）を反応させ、マレイミド活性化 rHb(X)（MA-rHb(X)）を調製した（Fig. 1B）。両末端にスルフヒドリル基を有する架橋剤 Dithiothreitol で MA-rHb(X)を重合し、得られた微粒子の表面に残ったマレイミド基と rHSA の Cys-34 を結合することにより rHb(X)NP を合成した。動的光散乱法を用いた粒径測定および走査型電子顕微鏡観察より、粒径約 100 nm の均一な球状構造を確認した。

続いて、酸素親和性の指標である P_{50} を測定し、酸素結合能を評価した。rHb(βL28F)NP の P_{50} は 12 Torr であり、rHb(wt)NP（8 Torr）より 1.5 倍高い値を示した（酸素親和性は約 2/3 に低下した）。これは、ヘム近傍にある βL28F の立体障害によって酸素の結合が抑制されたためと考えられる。肺（P_{O_2}=100 Torr）と末梢組織（P_{O_2}=40 Torr）間における酸素運搬効率は 11%であり、rHb(wt)NP（7%）と比較して約 1.6 倍に増大した。rHb(βL28F)を用いることにより、酸素親和性の制御が可能となることが明らかとなった。rHb(X)NP は、原料に血液を必要としない完全合成型の人工酸素運搬体であり、今後幅広い応用が期待される。

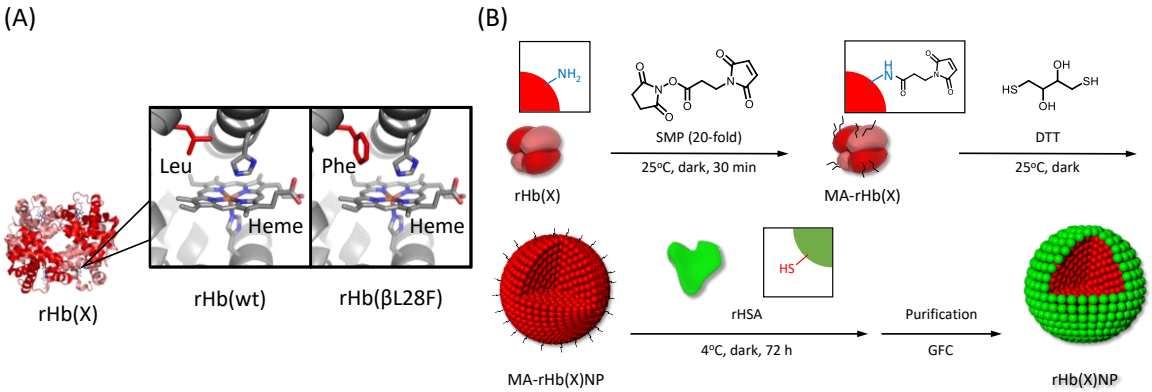


Fig. 1 (A) Structure of rHb(X)（X= wt, βL28F）. (B) Synthesis of rHb(X)NP.

1) C. Ho, *et al*., *Biochemistry*, **2005**, *44*, 7207.

©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

タンパク質分子針の末端設計による動的集合パターン制御

○菊池幸祐[1]・福山達也[2]・内橋貴之[3]・古田忠臣[1]・前多裕介[2]・上野隆史[1]（[1]東工大生命、[2]九大理、[3]名大理）

Controlling the dynamic assembly of the β-helical protein needle by tip engineering (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology[1], Department of Physics, Kyusyu University[2], Department of Physics, Nogoya University[3]) KIKUCHI, Kosuke[1]; FUKUYAMA, Tatsuya[2]; UCHIHASHI, Takayuki[3]; FURUTA, Tadaomi[1]; MAEDA, T. Yusuke[2]; UENO, Takafumi[1]

タンパク質は自己集合によって多様なユニット構造を形成し，その集積によって線維，シート，結晶等の秩序集合体を構築可能である．近年では構造解析技術と計算科学手法の発展により，タンパク質ユニット構造や分子間相互作用の精密設計も実現されてきた．しかしながらこれらの手法では厳密な設計を必要とし，多様なパターン構造を共通の分子骨格を利用して構築する設計指針は確立されてこなかった．

そこで本研究では，バクテリオファージ T4 由来の人工タンパク質分子針（protein needle, PN）に着目した．PN は三本鎖 β ヘリックス，フォールドン，His-tag からなるホモトライマーダイマー六量体タンパク質であり，長さ約 16 nm，幅 2.4 nm の針状構造を有する（**Fig 1a**）[1]．先行研究から PN はその両 C 末端構造を変化させても針状構造を保持すると明らかになっているため[2], 両末端での分子間結合を制御することによって β ヘリックス分子を骨格とした集合構造構築が可能になると考えた．さらに，β シートとマイカ基板との相互作用を利用して分子集積方向を制限することにより，テンプレート指向型の二次元集合パターン制御が実現可能になると考えた（**Fig 1b, 1c**）．

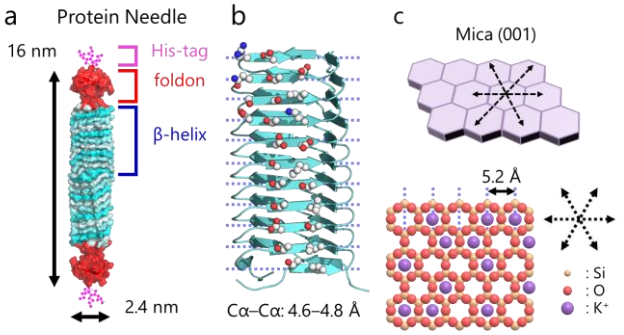


Fig 1. (**a**) Artificial protein needle (PN). Both the PN β-helix (**b**) and the mica (**c**) has hydrophilic and ordered lattices.

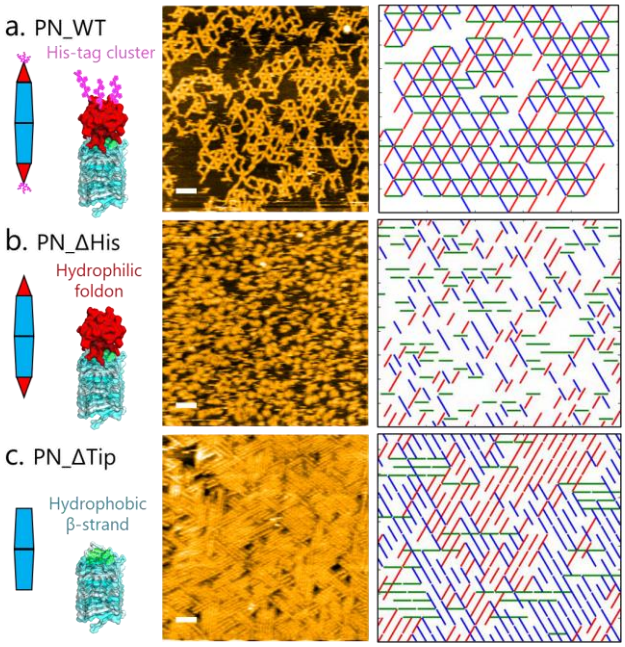


Figure 2 | The two-dimensional assembly patterns of PNs. (**a**) **PN_WT** formed triangle lattice. (**b**) **PN_ΔHis** showed nematic alignments. (**c**) **PN_ΔTip** formed straight fibers. The HS-AFM observation results (middle column) and MC simulation results (right column) showed good agreements. Scale bars are 50 nm (middle).

本稿では，PN の両 C 末端構造の設計によるマイカ上二次元集合パターン制御を高速原子間力顕微鏡（high-speed AFM, HS-AFM）によって観察した（**Fig 2**）．さらに，観察された動的挙動にもとづいて数理モデルを構築し，モンテカルロ（Monte Carlo, MC）シミュレーションによる集合挙動分析をおこなった．HS-AFM 観察と MC シミュレーションより，剛直で異方構造を有する PN が動的集団運動によって秩序構造を形成する機構が明らかとなった．

[1] Yokoi, N. *et al.*, *Small* **2010**, 6, 1873–1879, [2] Inaba, H. *et al.*, *Mol. Biosyst.* **2015**, 11, 3111–3118

培養液中の組換えタンパク質が検出可能な蛍光免疫センサの構築

○寧せつじょう・安田貴信・朱 博・北口哲也・上田 宏

Construction of fluorescent immunosensor for detecting recombinant proteins produced in bioprocess

(Graduate School of Life Science and Technology[1], Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology[2]) NING, Xuerao[1]; YASUDA, Takanobu[1]; ZHU, Bo[2]; KITAGUCHI, Tetsuya[2]; UEDA, Hiroshi[2]

Recently, many useful substances are produced in the form of recombinant proteins through bioprocess. This overcomes the limitation of extraction from natural sources. As people become increasingly aware that the monitoring and control of this process are very important for obtaining high-quality products, a variety of sensor systems have been developed. However, most of these sensor technologies target environmental variables such as temperature, dissolved oxygen/carbon dioxide, and so on. For the analysis of target products, time-consuming and laborious purification and concentration steps are still required. In addition, most of the recombinant proteins have His tag. It is an affinity tag that allows the target protein to be purified through immobilized metal affinity chromatography (IMAC) so that people can obtain high-purity protein products under a mild condition. In these circumstances, a sensor that can quickly detect His-tagged recombinant protein in bioprocess is believed attractive.

Therefore, a sensor using Quenchbody (Q-body) technology, which can detect antigen simply and rapidly, was tried to be developed. Q-body is a kind of fluorescent antibody probe[1]. It is generated by fluorescent dye site-specifically labeled at the N-terminus of antibody fragments such as scFv or Fab. The fluorescent dye is quenched by tryptophan (Trp) residues inside the antibody, or another dye, due to the photoinduced electron transfer effect. When the antigen binds to a Q-body, the quenching effect becomes interrupted, resulting in a fluorescence increase.

In this study, based on an anti-His antibody[2], a Fab-type Q-body that can detect C-terminally His-tagged recombinant protein in 50% culture medium was constructed[3]. It displayed His tag-dependent fluorescence response, and it can also be used for simple quantitative determination in bioprocess. This feature is expected to contribute to the monitoring of His-tagged recombinant products in both academic research and industrial bioprocess. Moreover, through the mutation of aromatic amino acids in V_H-CDR1 region, Q-body's antigen affinity and detection sensitivity were improved. This can provide useful ideas for designing other effective Q-bodies in future.

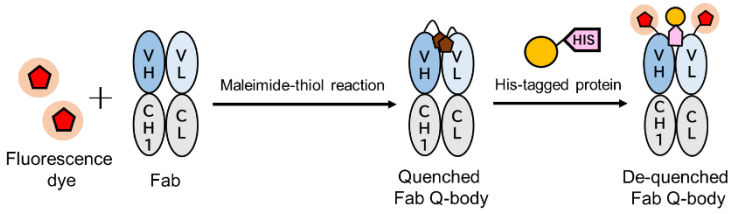


Fig. 1. Construction and reaction of Fab-type His Q-body

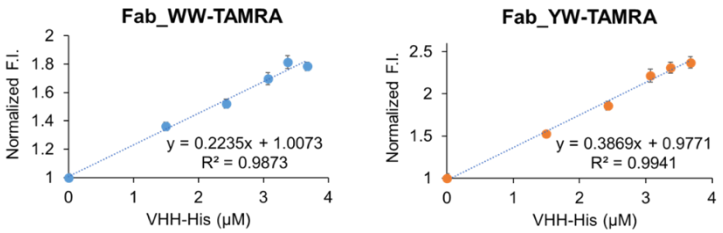


Fig. 2. Correlation between the signal of TAMRA-labeled Fab Q-body and the concentration of secreted anti-SARS-CoV-2 V_{HH}-His in *Brevibaccillus* bioprocess.

1) R. Abe, T. Hohsaka, H. Ueda et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 17388-17394 (2011)
2) M. Kaufmann, A. Plückthun, M.G. Grütter et al., **318**, 135-147 (2002)
3) X. Ning, T. Yasuda, T. Kitaguchi, H. Ueda. *Sensors*, **21**, 4993 (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

人工脂質修飾タンパク質の相分離脂質膜ドメインへの選択的アンカリングと局在挙動の評価

○内田 和希[1]・大林 洋貴[1]・南畑 孝介[1]・若林 里衣[1]・後藤 雅宏[1]・下川 直史[2]・高木 昌宏[2]・神谷 典穂[1]（[1]九大院工、[2]北陸先端大）

Selective Anchoring of Artificial Lipid-modified Proteins to Membrane Domain and Evaluation of Localization Behavior ([1]Graduate School of Engineering, Kyushu University, [2]JAIST) UCHIDA, Kazuki[1]; OBAYASHI, Hiroki[1]; MINAMIHATA, Kosuke[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; GOTO, Masahiro[1]; SHIMOKAWA, Naofumi[2]; TAKAGI Masahiro[2]; KAMIYA, Noriho[1])

生体内でアシル化やGPIアンカー付加などの脂質修飾を受けたタンパク質は、細胞膜上のラフトと呼ばれる機能性ドメインに局在し、シグナル伝達機構に関与すると考えられている[1]。本研究では、酵素反応を利用してタンパク質を人工的に脂質修飾し、Giant Unilamellar Vesicle (GUV) 上の相分離脂質膜ドメインへの選択的アンカリングと局在挙動の評価を試みた。

微生物由来トランスグルタミナーゼが触媒する架橋反応を利用し、緑色蛍光タンパク質EGFPのC末端にLQ-tag (配列: LLQG) を融合したEGFP-LQと、脂質導入基質ペプチドPalmitoyl-G$_3$SRHKもしくはOleyl-G$_3$SRHKを架橋し、EGFP-Pal、EGFP-Oleを得た。これをRhodamine標識相分離GUV ([DOPC]:[DPPC]:[Cholesterol]=4:4:2) 分散溶液に添加し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて脂質ドメインおよびEGFP由来の蛍光を観察した。CLSM観察の結果、EGFP-Palはラフトモデル相であるLiquid ordered (Lo) 相に、EGFP-Oleは非ラフト相モデルであるLiquid disordered (Ld) 相に選択的に局在した (**Fig. 1a**)。これらの局在には、Lo相を構成する飽和脂質DPPC、CholesterolとEGFP-Palの親和性、Ld相を構成する不飽和脂質DOPCとEGFP-Oleの親和性が寄与していると考察された。次に、EGFP-Palが局在しているleafletの同定を行った。EGFP-Pal添加後のGUV溶液にTrypsinを加えると、Trypsin消化に伴いEGFP由来の蛍光が消失した (**Fig. 1b**)。外部から添加されたTrypsinは脂質二分子膜を透過できないため、EGFP-PalはGUVのOuter leafletにアンカリングしたと考えられる。最後に、ドメインの消失と生成に伴う、脂質膜上におけるEGFP-Palの局在挙動を観察した。相転移温度以下では、EGFP-PalはLo相に局在した (**Fig. 1c, ⅰ, ⅵ**)。次に、加熱により相転移温度を超えると、各ドメインを構成する脂質は混ざり合い、相分離構造の消失に伴いEGFP-Palも膜全体に拡散した (**Fig. 1c, ⅲ, ⅷ**)。その後、再び相転移温度以下となり、GUV上にドメインが生成されると、EGFP-Palは再びLo相に局在化した (**Fig. 1c, ⅴ, ⅹ**)。以上の結果から、EGFP-Palは、脂質間相互作用に基づき、GUV上の各相に安定に局在することが確認された。

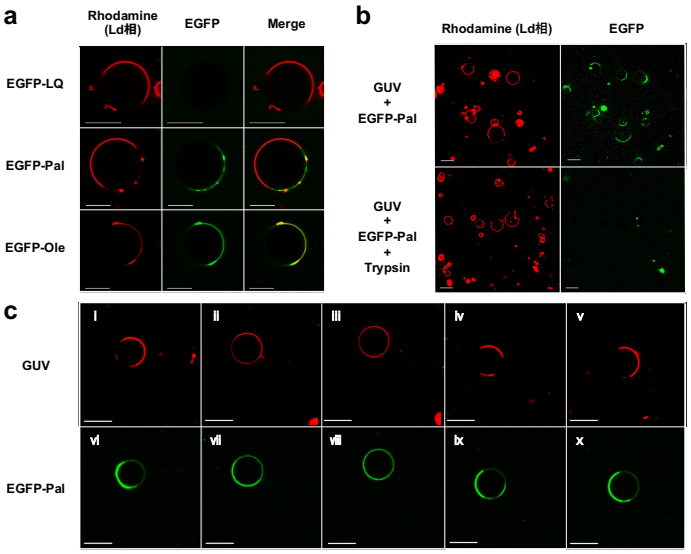


Fig. 1 CLSM images of GUVs added with EGFP-LQ or EGFP-lipids. **(a)** EGFP-LQ, EGFP-Pal, and EGFP-Ole added to GUVs; **(b)** EGFP-Pal added to GUVs before and after the addition of Trypsin; **(c)** Lateral diffusion of EGFP-Pal on GUVs in response to temperature rise (ⅰ→ⅲ, ⅴ→ⅶ) and fall (ⅲ→ⅴ, ⅶ→ⅹ) (bars: 10 μm)

1) K. Simons *et al.*, *Nature*, **387**, 569–572 (1997)

©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

配位ケモジェネティクスを用いた class A GPCR adenosine A_{2A} 受容体の活性制御

○菅原巧人[1]・辻川宗男[2]・三浦裕太[1]・妹尾暁暢[1]・浜地格[2]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]京大院工）

Activation of adenosine A2A receptor from class A GPCR utilizing coordination chemogenetics (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2]) SUGAWARA, Takuto[1]; TSUJIKAWA, Muneo[2]; MIURA, D, Yuta[1]; SENOO, Akinobu[1]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

細胞外からのシグナルを細胞内に伝達する役割をもつ細胞膜受容体は、特に脳神経領域において緻密な活性制御が行われている。それらを人為的に制御する手法を開発できれば未だ知られていない脳機能の解明や精神疾患のメカニズム解明につながると考えられている。近年我々は細胞膜受容体の中でも G タンパク質共役型受容体（GPCR）に着目し、配位ケモジェネティクス法を用いて class C GPCR に属する代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）の活性制御に成功している。[1)] この研究では class C GPCR に特徴的な細胞外のリガンド結合部位（LBD）近傍に配位性アミノ酸を変異導入することで、金属イオンの配位により LBD の構造変化を人為的に惹起して活性制御を実現した。同様の手法を用いて、これまでに同じ class C に属する $GABA_B$ 受容体の活性制御にも成功している。

本研究では class C 以外の GPCR にも広く適用可能な活性制御法を開発するため、新たな変異導入位置の模索を行った。今回、我々は全ての GPCR に共通する構造である 7 回膜貫通領域（TMD : TM1-TM7）に着目した。近年の X 線結晶構造解析や CryoEM 構造解析によって、GPCR の中でも class A に属する受容体の構造変化メカニズムは特に詳細に議論されている。我々はその中でも構造解析が進んでいる adenosine A_{2A} 受容体を標的とした。近年の構造的知見に基づき、受容体の活性化に伴い大きく配向が変化する TM5 と TM6 に金属イオンの配位サイトを導入し、各種金属イオンに対する応答を評価した。その結果、内在性のリガンドであるアデノシンとの親和性を保ちつつ、新たに Cu(II)の配位によって活性化する変異体の取得に成功した。

1) S. Kiyonaka, R. Kubota, Y. Michibata, M. Sakakura, H. Takahashi, T. Numata, R. Inoue, M. Yuzaki & I. Hamachi, *Nature Chem*. **8**, 958-967 (2016)

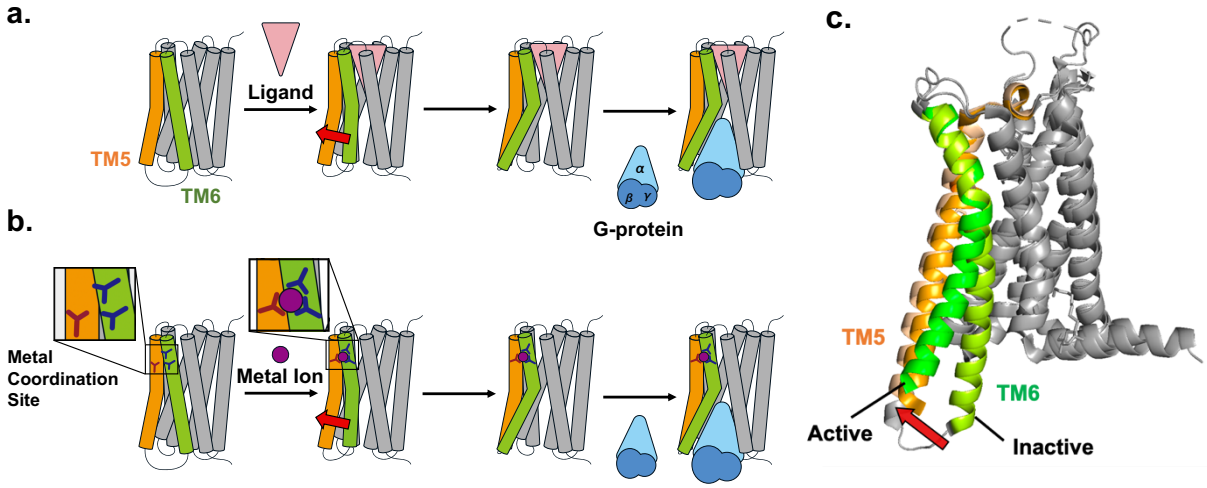


Fig 1. Schematic illustration of activation of A_{2A} receptor by endogenous ligand (**a**) and chemogenetic activation of A_{2A} receptor mutant by Cu(II) (**b**). (**c**) Conformational change associated with receptor activation. (PDB IDs : 3RFM, 5G53)

©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

P450BM3 近縁種発現細菌の基質誤認識に基づく非天然反応

○伊藤史哉・有安真也・唐澤昌之・Joshua Kyle Stanfield・横山侑弥・笠井千枝・愛場雄一郎・荘司長三（名大院理）

Non-Native Reactions Based on Substrate Misrecognition System in Bacteria Expressing Homologs of P450BM3 (Graduate School of Science, Nagoya University) ITO, Fumiya; ARIYASU, Shinya; KARASAWA, Masayuki; STANFIELD, Joshua Kyle; YOKOYAMA, Yuya; KASAI Chie; AIBA, Yuichiro; SHOJI, Osami

Bacillus megaterium 由来のシトクロム P450BM3（CYP102A1）は、長鎖脂肪酸の亜末端を高効率に水酸化するヘム酵素であり、酸化触媒としての応用が期待されている。しかし、長鎖脂肪酸以外には活性を示さない基質特異性の高さが問題であった。そこで当研究室では、長鎖脂肪酸を模倣した擬似基質（デコイ分子）を用いた「基質誤認識システム」を開発し、ベンゼンなどの非天然基質水酸化を達成してきた（Fig. 1）[1]。また、P450BM3 の近縁種である *Bacillus cereus* 由来の CYP102A5 や *Bacillus licheniformis* 由来の CYP102A7 についても同様に非天然反応を達成している。さらに、*B. megaterium* や P450BM3 を過剰発現した大腸菌そのものに対してデコイ分子と非天然基質を添加することで非天然水酸化反応を達成し、基質誤認識システムが菌体反応へ適用可能であることも明らかとなった[2]。ただし、これまで CYP102A5 または A7 に対して菌体反応が達成されておらず、本研究では *B. cereus* および *B. licheniformis* による非天然菌体反応の実現を目指した（Fig. 2）。これらの反応が達成されれば、基質誤認識システムに基づく菌体反応の多様な菌種への展開が期待できる。

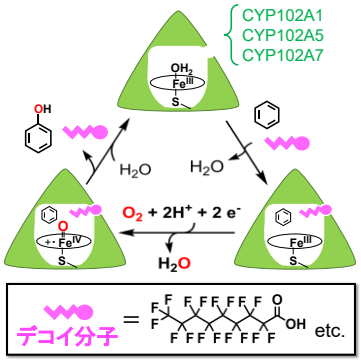


Fig. 1　基質誤認識システム.

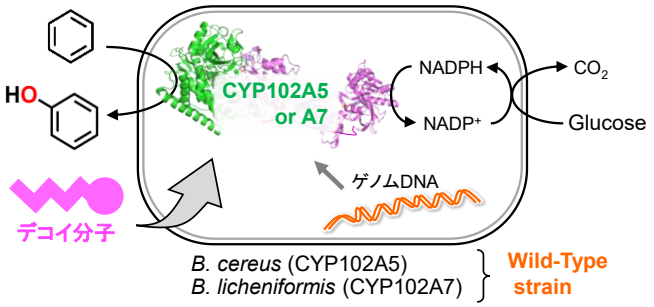


Fig. 2　*B. cereus* および *B. licheniformis* による菌体反応概念図.

B. cereus ATCC 14579 および *B. licheniformis* ATCC 14580 を遺伝子操作せずに用い、デコイ分子と非天然基質であるベンゼンを添加して水酸化反応を行った。活性は 4-アミノアンチピリン（4-AAP）によるフェノール類呈色反応および GC/MS 分析により評価した。

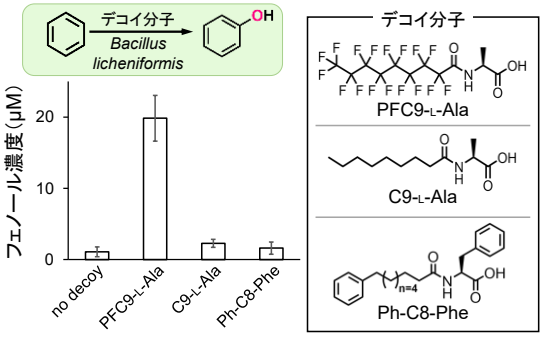


Fig. 3　*B. licheniformis* によるベンゼン水酸化反応.

B. cereus による菌体反応では、特定のデコイ分子存在下で 4-AAP による呈色が見られ、フェノール類の生成が示唆された。しかし、GC/MS 分析ではフェノールが観測されず、さらにベンゼン非添加の菌体反応においても同様に呈色し、ベンゼン水酸化ではない未知菌体反応の進行が示唆された。一方、*B. licheniformis* による菌体反応では、デコイ分子 PFC9-L-Ala に対しフェノールを生成することが GC/MS 分析から確認された（Fig. 3）。この反応性は精製 CYP102A7 の傾向と類似しており、菌体内に発現している CYP102A7 がデコイ分子に応答してベンゼンを水酸化している可能性がある。現在、*B. cereus* で得られた未知生成物の同定や CYP102A7 遺伝子ノックアウトによる酵素特定に取り組んでいる。

1)　O. Shoji *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 6606-6610 (2013).
2)　M. Karasawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 12264-12269 (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

C 末端配列改変による人工抗体 Monobody の可溶性向上
—SARS-CoV-2 中和抗体医薬への応用を指向して—

○梅本駿[1]・齊木輝[1]・近藤太志[1]・藤野公茂[1]・林剛介[1]・村上裕[1,2]（[1]名大院工、[2]名大ナノライフ）

Enhancing the Solubility of Monobody by Optimizing C-terminal Sequence − Toward Development of SARS-CoV-2 Neutralizing Proteins (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University[2].) UMEMOTO, Shun[1]; SAIKI, Hikaru[1]; KONDO, Taishi[1]; FUJINO, Tomoshige[1]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1,2]

COVID-19の原因であるSARS-CoV-2は、ウイルス表面にあるSpike proteinを用いてヒトの細胞表面にあるACE2 (Angiotensin-Converting Enzyme 2)と結合することでヒト細胞に感染する。Spike proteinに対して高い親和性を持つ抗体は、研究ツールや治療薬として有用であり、当研究室では昨年、TRAP提示法を用いて、10^{13}の多様性を持つライブラリの中からSpike proteinに対して高い親和性 (K_D = 0.42 nM)を持つ人工抗体Monobodyを選択することに成功した[1]。また、そのMonobodyがSARS-CoV-2のヒト細胞への感染に対して高い中和活性を持つことが明らかになり、中和抗体医薬への応用の可能性が示唆された。

Monobodyを可溶性画分に発現するためにはNus-tagのような可溶性タンパク質の融合が必要である。しかし、Monobody の中和抗体としての応用を考えた際、このような大きな融合タンパク質はヒトに対して抗原性を示す可能性が高い。本研究では、活性を保ったままMonobodyを融合タンパク質なしで可溶性画分に発現させることを目指した。新たな設計では、過去にMonobodyの安定性を向上させるとの報告があった配列を参考にし、Monobodyの基の骨格であるヒトフィブロネクチン由来の配列をC末端に付加した。大腸菌にて発現・精製した結果、C末端に配列4残基(EIDK)を付加した場合において大幅な可溶性の向上が確認された(図1)。

次に、ヒトへの抗原性を小さくするために、Monobody に導入していた可溶性向上アミノ酸点変異をヒト由来のアミノ酸に戻し、C 末端に 4 残基 (EIDK)を付加した。これを大腸菌で発現・精製した結果、EIDK を付加しても可溶性が低く精製時に多量体化が見られた（図 2 左）。そこでさらに C 末端を 3 残基伸ばして 7 残基(EIDKPSQ)を付加すると、精製の際の溶出ピークが単一となり、多量体化が抑制されていることが分かった （図 2 右）。さらに精製した Monobody の S1 subunit への結合解離測定を行った結果、その解離定数も Nus-tag 融合 Monobody と同程度であった。以上の結果から、EIDKPSQ を C 末端に付加することで、Monobody の活性を保ちながら、その可溶性を大幅に向上させることができることが分かった。本成果により、今後、Monobody の中和抗体としての応用が進むものと期待される。

1) Kondo, T., et al, *Sci. Adv*. 2020, 6 (42), eabd3916.

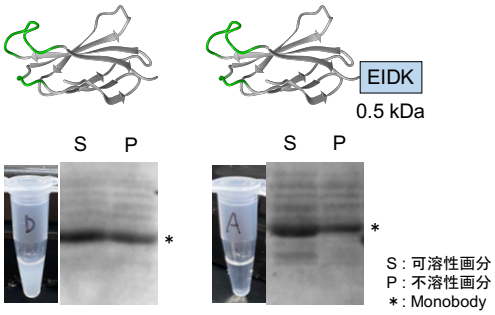


図1 C末端配列4残基分(EIDK)の付加による人工抗体Monobodyの可溶性の比較

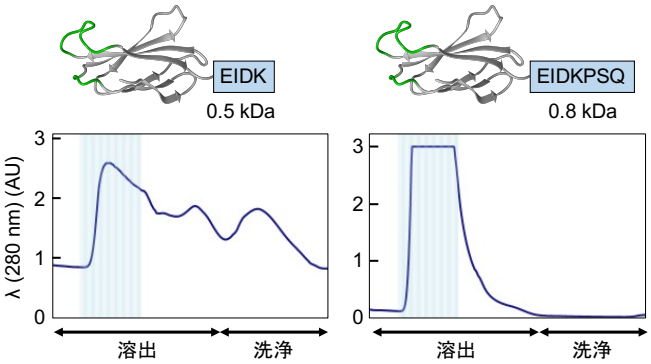


図2 C末端配列4残基分(EIDK)あるいは7残基分(EIDKPSQ)の付加による人工抗体Monobodyの精製クロマトグラム

©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

細胞膜シグナル制御のための汎用的な化学遺伝学ツールの開発

○鈴木祥央[1]・波多野結香[1]・中村彰伸[2]・吉川優[1]・吉井達之[3]・青木一洋[2]・築地真也[1]（[1]名工大院工、[2]自然科学研究機構基生研、[3]京大 CiRA）

A Chemogenetic Platform for Manipulating Plasma Membrane Signaling (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology[1], National Institute for Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences[2], Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University[3]) SUZUKI, Sachio[1]; HATANO, Yuka[1]; NAKAMURA, Akinobu[2]; YOSHIKAWA, Masaru[1]; YOSHII, Tatsuyuki[3]; AOKI, Kazuhiro[2]; TSUKIJI, Shinya[1]

細胞は外界からの刺激を細胞膜上で受け取り、細胞内へ情報を伝搬する。この際、さまざまなシグナル分子が細胞質から細胞膜の内側（インナーリーフレット）に集まり、種々のシグナル伝達プロセスを引き起こす。したがって、任意のシグナルタンパク質を細胞膜へ人為的に誘導する技術は、細胞膜を起点としたシグナル伝達の人工制御や解析のための強力なツールになるものと期待される。

我々はこれまでに、局在性リガンドを利用した細胞膜特異的タンパク質局在移行システムを開発した[1–3]。そのシステムでは、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素（eDHFR）の N 末端に 6 個の Lys 残基を付加した「K6-eDHFR」をタグとして標的タンパク質の N 末端に融合する。それを細胞質に発現後、ミリスチン酸-D-システインを連結した TMP リガンド（m^{D}cTMP、**図 1a**）を培養液に添加することで、K6-eDHFR 融合タンパク質を細胞質から細胞膜へ特異的に移行させることができる。一方、K6-eDHFR タグを標的タンパク質の C 末端に融合すると、細胞膜に対する特異性が失われることが判明した。

本研究ではまず、対象タンパク質の N 末端、C 末端、さらにはドメイン間などに融合しても細胞膜特異的な局在移行を実現する汎用的なタンパク質タグを開発することを目指した。m^{D}cTMP/eDHFR 複合体の膜上での分子配向に着目し、eDHFR のループ領域に Lys 残基の 6 回繰り返し配列を挿入した「^{iK6}DHFR」を作製した（**図 1b**）[4,5]。この ^{iK6}DHFR タグは標的タンパク質の N 末端、C 末端、ドメイン間に融合することができ、m^{D}cTMP に応答して細胞膜に特異的に移行することを確認した。本システムは、Raf/ERK 経路、Ca^{2+}、cAMP シグナルなど、細胞膜を起点としたさまざまなシグナル伝達を制御できることも実証した。また、^{iK6}DHFR と TMP との結合の可逆性を利用して、シグナルタンパク質の局在と活性を繰り返し操作することにも成功した（**図 1c**）。本発表では、ループ改変型 eDHFR タグと m^{D}cTMP のペアからなる高汎用的な細胞膜シグナル制御システムの詳細について報告する。

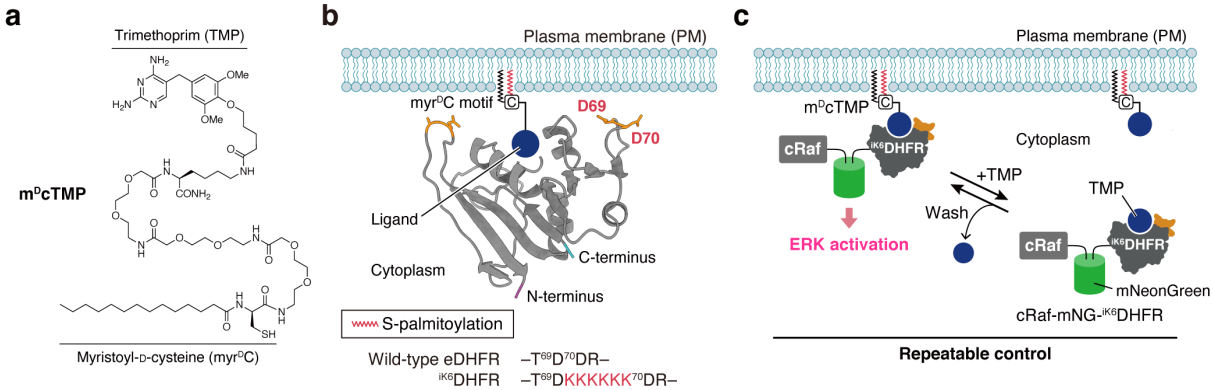


図 1（**a**）m^{D}cTMP の化学構造。（**b**）細胞膜上での分子配向に基づいた ^{iK6}DHFR の設計。
（**c**）m^{D}cTMP/^{iK6}DHFR システムによる Raf/ERK シグナルの繰り返し制御。

1) M. Ishida *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 12684 (2013) 2) A. Nakamura *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **15**, 837 (2020) 3) A. Nakamura *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **15**, 1004 (2020) 4) S. Suzuki *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, **2312**, 237 (2021) 5) Y. Hatano *et al.*, *bioRxiv*, DOI: 10.1101/2021.03.16.435568

©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

立体分岐型マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の開発

○吉岡紗穂・石井俊宏・松本隆聖・丸毛智史・藤枝伸宇（阪府大院生命）

Development of artificial metalloenzymes toward stereodivergent Michael addition reactions (Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University) YOSHIOKA, Saho; ISHII, Toshihiro; 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。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、高効率かつ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る。一方で、当研究室では超好熱菌由来の TM1459 タンパク質[2]を用い（図 1）、このタンパク質が持つ４つのヒスチジン残基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、第一配位圏にある４つのヒスチジン残基のうち１つまたは２つをアラニンに変異させた変異体(H52A, H54A, H58A, H92, H52A/H54A, H52A/H58A, H54A/H58A, H58A/H92A)を構築し、硫酸銅を導入することで立体選択的なマイケル付加反応のスクリーニングを行なった。

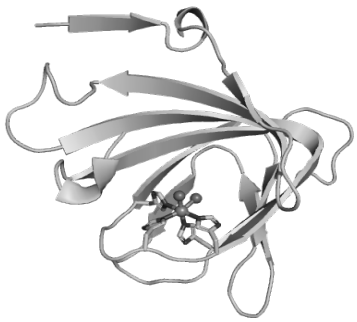


Fig 1. Cupin-type protein (TM1459)

モデル反応として、2-アザカルコンをアクセプター、ジメチルマロン酸とアセト酢酸メチルをドナーとして用い反応（図 2）を行なった結果とそのファインチューニングについて発表する。アクセプターとしてジメチルマロン酸を用いた反応では、野生型を用いた場合には選択性を示さなかった。一方で構築した変異体をライブラリーとしてスクリーニングしたところ、銅イオンとともに H52A、H92A、H54A/H58A 変異体を添加した際に鏡像体過剰率が 86, 58, 80 を示し、立体選択性が見られた。更に H52A では H92A、H54A/H58A とは反転した鏡像体が得られた。さらに、アクセプターとしてアセト酢酸メチルを用いた場合にも立体選択性が見られた。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ライブラリーの拡充について議論する。

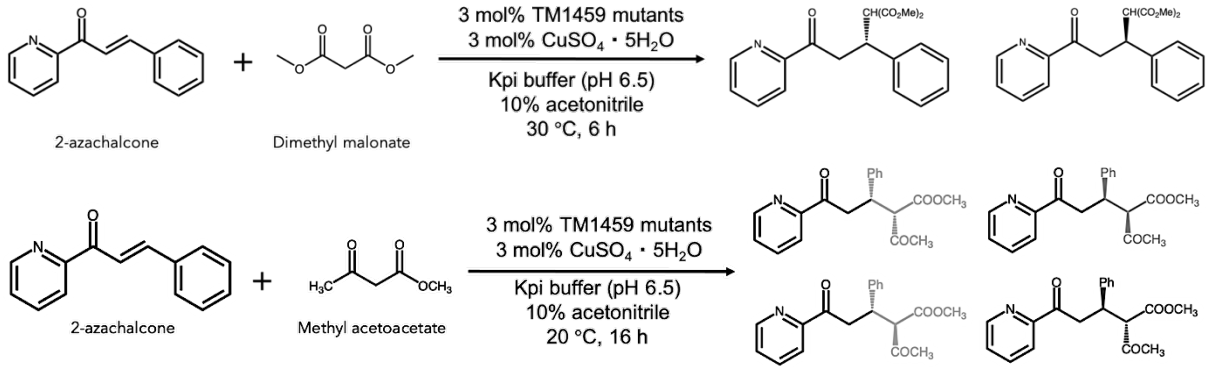


Fig 2. Model reactions employed in this study

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.

光駆動近接ラベリングによるシナプス間隙タンパク質の網羅的同定

○宇都宮　颯汰[1]・高遠　美貴子[1]・田村　朋則[1]・Radu Aricescu[2]・柚﨑　通介[3,4]・浜地　格[1,4]
（[1]京大院工、[2]MRC LMB、[3]慶應大医、[4]JST ERATO）
Identification of synaptic cleft-resident proteins with photo-proximity labeling (Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge[2], Keio University School of Medicine[3], *ERATO, JST*[4])　UTSUNOMIYA, Hayata[1]; TAKATO, Mikiko[1]; TAMURA, Tomonori[1]; RADU, Aricescu[2]; YUZAKI, Michisuke[3,4]; HAMACHI, Itaru[1,4]

神経細胞間の接合部位であるシナプス間隙には、受容体をはじめ接着因子やシナプスオーガナイザーなど様々なタンパク質が存在し、その種類、発現量、相互作用が神経伝達に大きく影響する。従って、脳神経機能の解明や精神疾患の診断・治療においては、シナプス間隙タンパク質を網羅解析するためのプロテオミクス技術が必要不可欠である。近年、HRPやBioID/TurboIDを用いたProximity labeling法によってシナプス間隙タンパク質の網羅的同定が盛んに進められている。[1,2]しかし、これらの手法では外因性酵素をシナプス間隙に発現させる必要があるため、遺伝子的にintactなサンプルへの適用は困難である。また、マウス個体内での適用に唯一成功しているin vivo-BioID法ではビオチンを 7 日間投与する必要があり、解析の時間分解能が低いといった問題も指摘されている。[3]

このような背景から、本研究では当研究室で開発された光駆動近接ラベリング法[4]を基盤に、高い時空間分解能でシナプス間隙プロテオーム解析を可能にする方法論の確立を目指した。本手法では、(1)シナプス間隙に局在する光増感剤と、(2)一重項酸素によって酸化されたタンパク質をビオチン化するための標識試薬を用いる(Figure 1)。シナプス間隙に局在させた光増感剤に可視光を照射すると局所的に一重項酸素が生じ、その周辺のタンパク質が酸化される。この酸化タンパク質をビオチン標識し、LC-MSMS解析することでシナプス間隙選択的かつ網羅的なプロテオーム解析が可能になると期待される。

本研究では、光増感剤をシナプス間隙に局在させるために、ポストシナプスに局在する受容体(GluD2、$GABA_AR$)に対するナノボディに光増感剤を化学修飾した。HEK293T細胞に受容体を発現させ、光駆動近接ラベリングを行った結果、受容体が発現した細胞膜上でのみ特異的にビオチン標識反応が進行することが確かめられた。また、マウス小脳スライスにおいて同様に光駆動近接ラベリングを行い、ビオチン化タンパク質のLC-MSMS解析を行ったところ、対応する受容体が発現するシナプス間隙に局在することが既知のタンパク質を複数同定できた。以上の結果から、本手法がシナプス間隙プロテオミクスに適用可能であることが実証された。

1) K. H. Loh, A. Y. Ting, et al., *Cell*, **2016**, 166(5), 1295-1307
2) T. C. Branon, A. Y. Ting, et al., *Nat. Biotech.*, **2018**, 36, 880-887
3) T. Takano, S. H. Soderling, *Nature*, **2020**, 588, 296-302
4) T. Tamura, M. Takato, K. Shiono, I. Hamachi, *Chem.Lett.*, **2020**, 49(2), 145-148

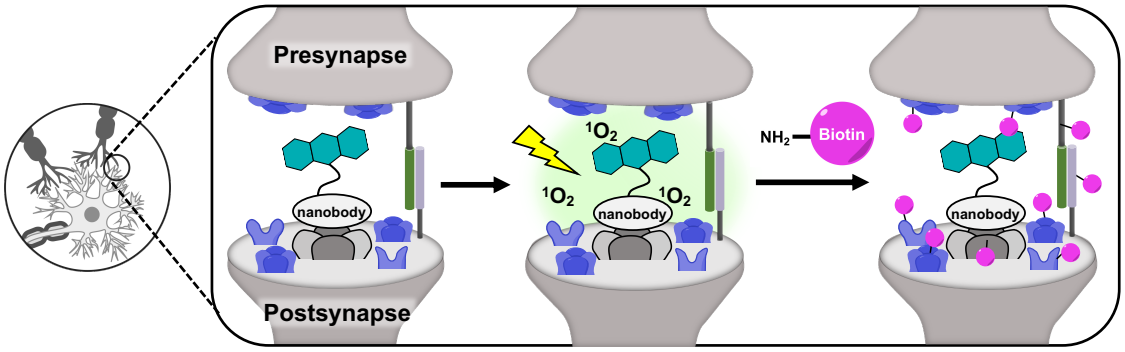


Fig. 1 Scheme of photo-proximity labeling in synaptic clefts

分子動力学計算に基づいた高接着タンパク質の材料表面との相互作用解析

○笹原 純[1]・鈴木淳巨[1]・藤本和士[1]・岡崎 進[2]・堀 克敏[1]
（[1]名大院工、[2]東大院新領域）

Analysis of Interaction of a Highly Adhesive Protein to Material Surfaces by Molecular Dynamics Calculation (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo[2]) SASAHARA, Jun[1]; SUZUKI, Atsuo[1]; FUJIMOTO, Kazushi[1]; OKAZAKI, Susumu[2]; HORI, Katsutoshi[1]

当研究室で発見された高接着ナノファイバータンパク質 AtaA はポリスチレンなどの疎水性表面や、ガラスなどの親水性表面、ステンレス鋼などの金属表面といった様々な材料表面に対して水中で高い接着性を示す[1]。しかしながら、現時点において接着タンパク質 AtaA の各材料表面への接着メカニズムは未解明であった。接着メカニズムの解明のためには、タンパク質の材料表面への接着過程を分子レベルで理解する必要があるが、高い時間分解能/空間分解能を必要とするため測定手法が限られている。そこで本研究では、分子動力学(MD)計算を用いることによって接着タンパク質の水中接着現象を原子レベルで明らかにすることを目指した。

ファイバータンパク質 AtaA の先端に位置するドメイン(Nhead)、材料表面、水分子、イオン(Na^+, Cl^-)を含む全原子計算系(~400,000 原子)を構築することにより、Nhead の水中接着現象を再現し MD 計算による解析を実施した(Fig. 1)。また、接着材料表面としては、これまで Nhead の接着評価試験によく使用されてきた疎水性のポリスチレン表面と親水性のシリカ表面を選択した。また、Nhead が材料表面に対してどのような配向で接着するか不明なため、材料表面に対して、横向きと縦向きで接着する場合を考慮した(Fig. 2)。各材料表面へ接着する際の接着自由エネルギーを熱力学積分法によって算出した。ポリスチレン表面に対して、横向き、縦向きいずれの配向であっても接着自由エネルギーが負であり、その接着自由エネルギー差は同程度であった。また、シリカ表面に対して横向き、縦向きで接着する場合も接着自由エネルギー差は同程度であった。これにより、Nhead は、ポリスチレン表面、シリカ表面に対し、いずれの配向であっても接着の起こりやすさは同程度であることが示唆された。本発表では、Nhead の異なる性質の材料表面に対して適応した相互作用について報告する。

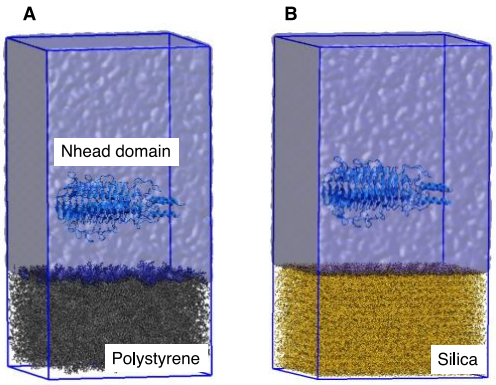


Fig. 1 Snapshots of computational systems. These systems were calculated to reproduce the phenomenon of adhesion in water. (A) Polystyrene. (B) Silica.

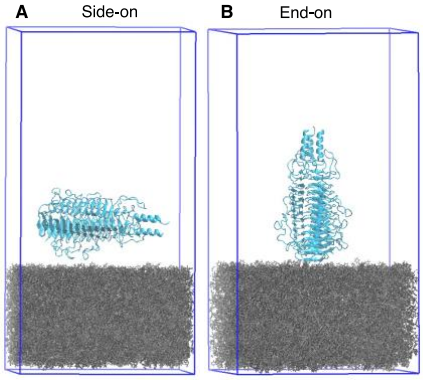


Fig. 2 Orientations of a protein. Water molecules and ions are not shown. (A) Side-on. (B) End-on.

1) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLoS ONE*, **7**, e48830 (2012)

内在性抗体をがん細胞に集積させ細胞傷害を誘導する がん免疫治療薬の開発

○田川寛[1]・岸村顕広[1,2]・森健[1,2]・片山佳樹[1,2]（[1]九大シス生、[2]九大院工）

The development of immunotherapeutics that redirect endogenous antibodies to cancer cells (Graduate School of System Life Science, Kyushu University[1], Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University[2]) Hiroshi Tagawa[1], Akihiro Kishimura[1,2], Takeshi Mori[1,2], Yoshiki Katayama[1,2]

抗体医薬はその高い抗原への特異性による副作用の低さ、長い血中半減期などの特徴をもつ、主要ながん治療医薬品のひとつであり、盛んに開発が行われている。抗体医薬は標的抗原に結合し中和効果や、Fcγ受容体（FcγR）と結合し抗体依存性細胞傷害（ADCC）などのエフェクター機能と呼ばれる効果を発揮し標的細胞の増殖阻害・傷害を誘起することが知られている（図 1: A）。しかし、抗体医薬は、高い薬価や抗体医薬に対する抗体が産生されることで治療効果が低減するという課題がある。これらの問題を解決する戦略として、抗体リクルート分子 （ARM）が提唱された（図 1: B）[1]。ARM は抗体結合領域よび標的抗原結合領域の２つの機能部位から構成される分子である。ARM は内在性抗体を標的がん細胞膜上に架橋し、標的がん細胞の成長を阻害する。しかし従来の ARM の戦略では内在性抗体の可変部を標的としており、結合可能な抗体の割合が低く、またポリクローナルであり結合力が一定ではないため、治療効果に不均一性が生じるという課題がある。

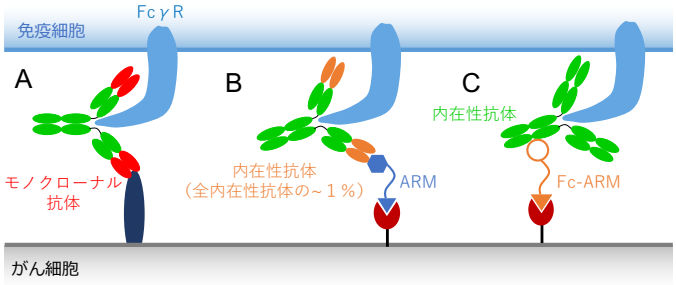


図１ がん細胞への抗体の集積モデル

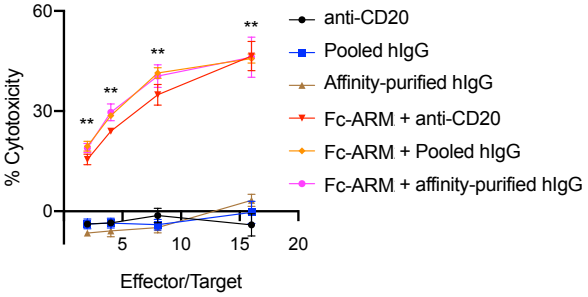


図２ ADCC 誘導能評価

我々は、従来の ARM の課題を解消すべく、抗体の Fc 領域を標的とした、Fc 結合性 ARM（Fc-ARM）を開発した（図 1: C）[2]。Fc 領域は抗体間で保存された領域であるため、Fc-ARM は血中に存在するほぼすべての IgG に均一の親和性で結合する。そのため、内在性抗体の多くを動員可能であり、また一定の親和性をもつため、従来の ARM の課題の解消が期待される。この戦略を実証すべく、抗体結合部位に Fc に高い親和性をもつ Fc-III4C ペプチド[3]、広範ながん細胞に過剰発現することが報告されている葉酸レセプターα（FR-α）に高い親和性をもつ葉酸（FA）を抗原結合部位としてもつ Fc-ARM を作製した。次いで in vitro において FR-α発現がん細胞への Fc-ARM および Fc-ARM を介した抗体の集積および免疫細胞を用いたエフェクター効果誘導能の評価を行った。その結果、ヒトモノ/ポリクローナル抗体を Fc-ARM を介してがん細胞膜上に集積し、免疫細胞の ADCC 誘導によるがん細胞の傷害に成功した（図 2）。また、担がんマウスモデルを用いた in vivo の系において、腫瘍特異的な Fc-ARM の集積および Fc-ARM を介したヒト抗体の集積が確認された。またヒト抗体の存在下において、未投与の系と比較して Fc-ARM の血中滞留性の向上が確認された。最後に Fc-ARM を介した腫瘍の成長抑制能を評価した。その結果、ネガティブコントロールと比較し有意な癌成長の抑制に成功した。今後の展望として、各結合部位の標的に対する親和性を向上させた分子へと置換し、治療効果の改善を目指す。

1) P. J. McEnaney, et al., *ACS Chem. Biol.* 2012, **7**, 1139-1151., 2) Y. Gong, et al., *Bioconjug. Chem.* 2016, **27**, 1569-1573., 3) K. Sasaki, et al., *Chem. Sci.*, 2020, **11**, 3208-3214

核移行シグナル含有ペプチドを鋳型とする金ナノリボン結晶の合成

○石田憲稔・富﨑欣也（龍谷大理工）

Synthesis of Ribbon-like Gold Nanocrystals Using A Nuclear Localization Signal Tethering Peptide as A Template (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) ISHIDA, Kazutoshi; TOMIZAKI, Kin-ya

金ナノ結晶特有のフォトサーマル効果や触媒能の利用は、医療分野における新たな治療方法として期待されている。本研究室では、金ナノ結晶の特性を体内で最大限に活かすため、生体適合性の高いペプチドと金ナノ結晶を複合化したドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発を行っている。しかし、効率よく標的細胞内に金ナノ結晶を送達するための課題として、金ナノ結晶を細胞取り込み可能なサイズに調節する必要がある。一方、当研究室では、薬剤送達のキャリアである Cap-p (Fig. 1 (a)) の集合体内部に金イオンを取り込み還元することで金 - ペプチド複合体の合成に成功している [1] 。Cap-p の設計では、まず、π - π スタッキングおよび疎水性相互作用による自己集合化能の向上と金イオン還元の電子ソースとして 2-ナフチルアラニンを配置した。その疎水性面に $AuCl_4^-$の取り込みを期待してリシンを配置した。また、親水性面に水溶性及び $AuCl_4^-$との相互作用向上を目的としてリシンを配置することで両親媒性とした。これらのメカニズムを細胞内で実行するためには、Cap-p のみでは細胞膜透過能が低いことが挙げられることから、Cap-p の N 末端に細胞膜透過能を有する核移行シグナル (NLS) を修飾した NLS-p (Fig.1 (b)) を金ナノ結晶合成の鋳型とすることで、細胞膜透過能の向上に期待した。本研究では、細胞膜透過能を向上させた Cap-p/NLS-p 集合体を鋳型ペプチドとする、金 - ペプチド複合体の合成を試みた。

(a) Cap-p : Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-A-I-A-NH_2

(b) NLS-p : Ac-P-K-K-K-R-K-V-G-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-A-I-A-NH_2

Fig. 1. 自己集合化ペプチドの配列 (2-Naf : 2-Naphtylalanine) (a) Cap-p (b) NLS-p

ペプチドは Fmoc 固相合成法によって合成した。ペプチドモノマーを超純水で溶かし、50 ℃のウォーターバスで 15 分加温し、超音波処理を 2 分行った。溶液終濃度が各々50 μM になるように、$HAuCl_4$ 水溶液を加えた。40 ℃でインキュベーションを行ったのち、UV-vis スペクトル測定によって金 - ペプチド複合体の合成評価を行った。

Cap-p/金複合体 (NLS-p , 0%) では、金ナノ結晶の表面プラズモン共鳴に由来する 510 nm 付近に吸収ピークが確認された (Fig. 2) 。しかし、NLS-p の含有率増加に伴い、吸収ピークが低下していった。これは、NLS-p が豊富にカチオンを有する塩基性のペプチドであることから、$AuCl_4^-$がペプチド複合体内に濃縮されにくいことが考えられる。そこで、NLS-p を低濃度化させたところ、金 - ペプチド複合体の吸収スペクトルは、NLS-p 濃度が 1%以下において比較的大きな吸収ピークが確認された。よって、低濃度の核移行シグナルを有するペプチドを用いることで金ナノ結晶の合成に成功したと考えられる。今後は、細胞内での金ナノ結晶合成を試みる。

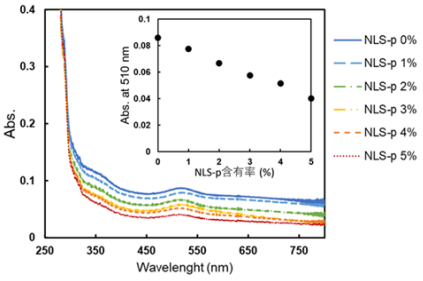


Fig. 2 NLS-p 割合 0%~5%における複合体の吸収スペクトル

本研究の一部は、科研費 (基盤 C : 20K057130002) の支援により実施された。

［1］K.-Y. Tomizaki, et. aL. Langmuir **2014**, *30*, 846−856

鉄コロール錯体を含む再構成ミオグロビンの指向性進化をめざした新規ハイスループットスクリーニング系の構築

○竹内 康基・加藤 俊介・林 高史（阪大院工）

Development of a High-throughput Screening Platform for Directed Evolution of Myoglobin Reconstituted with an Iron Corrole Complex (Graduate School of Engineering, Osaka University) TAKEUCHI, Koki; KATO, Shunsuke; HAYASHI, Takashi

非天然の遷移金属錯体を補因子とする人工金属酵素は、従来の生体触媒の有用性を拡張する新たな触媒として近年注目されている。特に、人工金属酵素の魅力的な特徴として、金属錯体の化学合成的な設計と、タンパク質反応場の遺伝子工学的な設計の両アプローチから、触媒活性を制御できることが挙げられる。我々はこれまでに、化学合成的設計の観点からポルフィリンの類縁体であるコロールに着目し、ミオグロビン（Mb）の本来の補因子であるヘムを鉄コロール錯体 **1** に置換した人工金属酵素（Mb-**1**）を創製した（Fig 1）[1]。我々のグループの以前の研究から、トリアニオン性配位子であるコロールは、反応中間体の高原子価鉄–オキソ種を安定化するため、Mb-**1** は過酸化水素を用いたフェノール系化合物の酸化反応に対して優れた触媒活性を示すことが明らかとなっている。したがって本研究では、この Mb-**1** の触媒活性の更なる向上をめざし、次にタンパク質反応場の遺伝子工学的な再設計、特に指向性進化法を駆使した Mb の改変に着手した。本発表では、Mb-**1** の指向性進化にむけて、人工金属酵素のハイスループットスクリーニング（HTS）系を開発したので報告する。

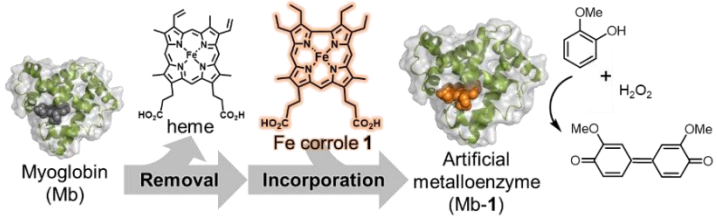


Fig 1. Preparation of artificial metalloenzyme using hemoprotein

人工金属酵素の指向性進化法への応用は、非天然の金属錯体を補因子とするため難しく、大腸菌細胞内で発現する Mb 変異体に対して、高効率かつ高選択的に錯体 **1** を導入する HTS 系の開発が必須となる。そこで我々は、マルトース結合タンパク質（MBP）タグと、スターチ–アガロースレジン [2] という独自のクロマトグラフィー担体を組み合わせた HTS 系を構築した（Fig 2）。具体的には、MBP タグを Mb の N 末端に連結した融合タンパク質（mbpMb）を調製し、アポ体として発現させた mbpMb をスターチ–アガロースレジンを用いて精製した。その後、調製した mbpMb に対して錯体 **1** を導入することで、細胞夾雑物の影響を受けない精製条件下において、人工金属酵素を高効率で調製することが可能となった。今後、本 HTS 系を用いて鉄コロール錯体を補因子とする人工金属酵素の指向性進化を実施する。

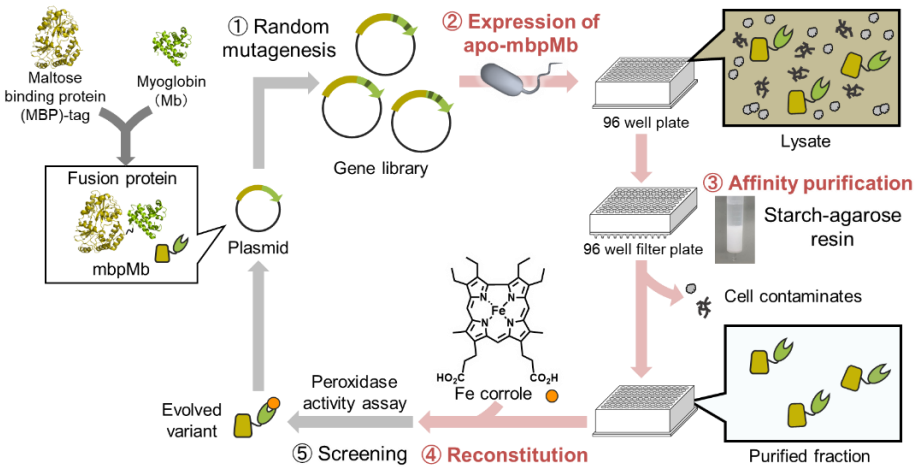


Fig 2. High-throughput screening platform that involves an affinity purification step

1) T. Hayashi *et al., J. Am. Chem. Soc.,* **2009**, *131*, 15124, 2) T. Hayashi *et al., ChemBioChem*, **2021**, *22*, 679

N 末端にアジド基を導入したコイルドコイルペプチド三量体を構成要素とするハイドロゲルの調製

○池田 拓未・大洞 光司・林 高史（阪大院工）

Construction of Hydrogel Containing Trimeric Coiled-coil Peptides with Azido Groups at N-terminal Sites

(Graduate School of Engineering, Osaka University) IKEDA Takumi; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

ハイドロゲルは、高分子鎖の架橋により形成された三次元網目構造の中に水を取り込んだソフトな材料である。これらは高い親水性や容易な機能拡張性からマテリアルとして広く用いられている。特に、外部刺激に応じて体積や物性を変化させる刺激応答性ゲルは、センサーやアクチュエーターに応用可能な材料として盛んに研究されている。刺激応答性ゲルを作成する方法の一つとして、ゲルに刺激応答性を付与する機能性分子を高分子鎖と反応させ、ゲルを構成する高分子構造内部に取り込む手法が挙げられる。タンパク質がその機能性分子として注目されており [1]、基質分子や温度、pH に応答して構造や物性を変化させる多様な刺激応答性を有するため、タンパク質を分子構造内部に有するゲルは特有の刺激応答性や機能の発現が期待される。そこで我々は、ゲルの架橋ユニットとして三量体コイルドコイルペプチドに着目した。コイルドコイルとは、二本以上のαヘリックス分子鎖同士がロープのように絡み合って出来る構造であり、αヘリックス分子鎖表面の疎水性アミノ酸側鎖の疎水効果により安定化される。またこの構造は、温度や pH、塩濃度等の外部環境に依存して安定性が変化し、構造変化を起こすことが知られている [2]。このコイルドコイルペプチドの性質を活かした刺激応答性ゲルを目指し、コイルドコイルペプチド三量体を構成要素とするハイドロゲルの調製を試みた（Fig. 1）。

本研究で用いるペプチド三量体は、既報 [2] の配列を参考にして設計した。この三量体は、結晶構造が明らかにされているが、非常に不安定であったため、αヘリックス構造を持つ三つのペプチドモノマーをベンゼン環を中心に共有結合で連結し、構造の安定化を試みた。まず高分子との反応点となるアジド基を N 末端に導入し、C 末端側に Cys 残基を有する 15 残基のアミノ酸から構成されるペプチドモノマーを固相合成法により調製した。続いて、得られたペプチドモノマーの Cys 残基と 1,3,5-Tris(bromomethyl)benzene を反応させ、ペプチド三量体を得た。CD スペクトルから、得られたペプチド三量体が安定なコイルドコイル構造を有することを確認した。また、ペプチド三量体溶液をグアニジン存在下で加熱すると、ヘリックスバンドル構造に由来する 222 nm の吸収が消失した。このことから、コイルドコイルの崩壊による三量体ペプチドの構造変化が示唆された。次に、ペプチド三量体とアルキン修飾四分岐 PEG を銅触媒存在下で混合し、クリック反応を行ったところ、ハイドロゲルが得られた。本発表では、三量体ペプチドの構造とハイドロゲルの物性の相関について報告する予定である。

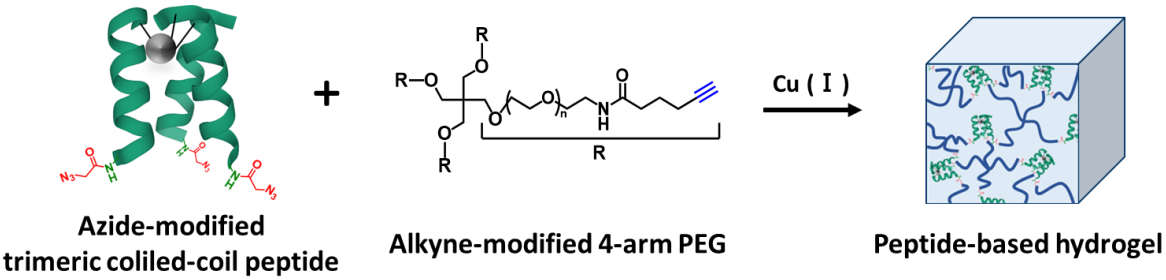


Fig 1. Schematic representation of the preparation for hydrogel cross-linked by trimeric coiled-coil peptides.

1) D. Pochan *et al*., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3528–3540.
2) A. Lustig *et al*., *J. Mol. Biol.* **2002,** 318, 901-910.

化学的手法を用いた新規ゲノムスケール DNA 合成技術の開発

○野村浩平[1]・恩田馨[1]・Gao Yiuno[1]・村瀬裕貴[1]・中本航介[1]・稲垣雅仁[1]・平岡陽花[1]・阿部奈保子[1]・橋谷文貴[2]・木村康明[1]・阿部洋[1,3,4]（[1]名古屋大学大学院理学研究科、[2]名古屋大学物質科学国際センター、[3]CREST,国立研究開発法人科学技術振興機構、[4]糖鎖生命コア研究拠点）

Development of novel genome-scale DNA synthesis technology using chemical methods (Graduate School of Science, Nagoya University[1], Research Center for Material Science, Nagoya University[2], CREST, Japan Science and Technology Agency[3], Institute for Glyco-core Research (iGCORE)[4]) NOMURA, Kohei[1]; ONDA Kaoru[1], GAO Yiuno[1], MURASE Hirotaka[1], NAKAMOTO Kosuke[1], INAGAKI Masahito[1], HIRAOKA Haruka[1], ABE Naoko[1], HASHIYA Fumitaka[2], KIMURA Yasuaki[1], ABE Hiroshi[1,3,4]

近年、人工的に遺伝子を設計・合成することで、産業への応用に有効な遺伝子を持つ新たな生物の創生を行う、ゲノム合成が注目されている。ゲノムの構成成分となる二本鎖 DNA を調製する方法として PCR 法が挙げられるが、PCR 法で作成できる DNA の長さは数万 bp 程度が限界である。そのため、数万 bp を超えるゲノムスケールの DNA を合成する際には、複数の PCR 産物を、DNA 連結技術を用いて繋げることが必要になる (図 1)。既存の DNA 連結技術の代表例として Golden Gate assembly 法や Gibson assembly 法が挙げられる。これらの手法では、酵素による接着末端の形成が共通の戦略であり、操作が簡便で温和な条件で行うことができる点で優れている。しかしながら、配列に制限があること、接着末端の突出塩基配列が短いこと、連結部位の DNA 配列に変異が生じやすい等の課題が指摘されており、ゲノムスケール DNA の合成に用いるには課題がある。そのため、正確かつ自由な接着末端の作成を可能とする新たな手法の開発が求められている。

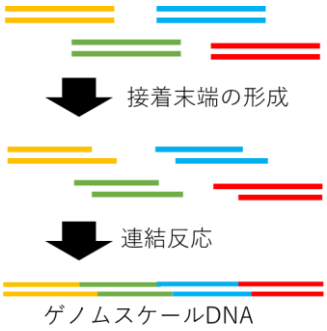


図 1 ゲノムスケール DNA の合成法

本研究では、化学的な手法を用いて接着末端の形成を目指し、リン酸部に光分解性保護基を導入した核酸誘導体を開発した。DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長反応において、この修飾核酸を導入した鋳型鎖を用いた場合、鎖伸長反応が保護基導入部位手前で停止することが明らかとなった (図 2)。これは保護基の立体障害により、ポリメラーゼの鎖伸長反応が阻害されるためだと考えられる。この現象を利用し、PCR プライマーにこの保護基を導入し PCR を行うことで、任意の配列の接着末端を作成可能であると考えた。PCR 後に光照射により保護基を除去することで天然型の DNA 断片を調製できる。この化学的 DNA 鎖伸長停止法を用いることで、従来の酵素法では困難であった自由な長さ・配列の接着末端設計が可能となり、DNA 連結効率の飛躍的向上が期待される。

本発表では、光分解性保護基を有する核酸誘導体の合成、脱保護条件の検討、そして鎖伸長停止能の評価について発表する。

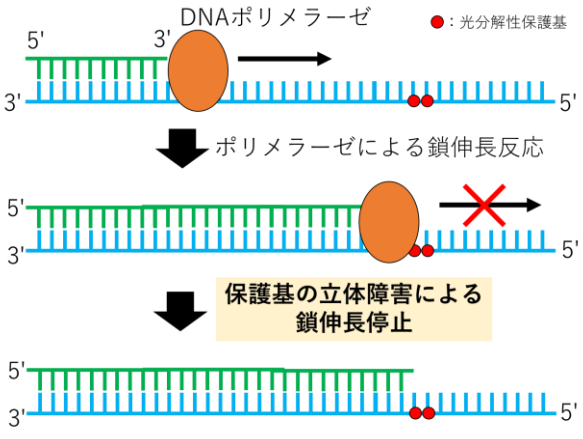


図 2 化学修飾の導入によるポリメラーゼによる DNA 鎖伸長の停止

Non-canonical rule により形成された Non-canonical structure の発見

○松本理緒[1]・勝田陽介[1]・佐藤慎一[2]・北村裕介[1]・萩原正規[3]・上杉志成[2]・井原敏博[1]（[1]熊本大学院先端科学研究部、[2]京都大学化学研究所、[3]弘前大学理工学部）

Discovery of non-canonical structures formed by non-canonical rules. (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University[1]; Institute for Chemical Research, Kyoto University[2]; Faculty of Science and Technology, Hirosaki University[3]) MATSUMOTO, Rio[1]; KATSUDA, Yousuke[1]; SATO, Shin-ichi[2]; KITAMURA, Yusuke[1]; HAGIHARA, Masaki[3]; UESUGI, Motonari[2]; IHARA, Toshihiro[1]

非標準構造 RNA G-quadruplex (RGq)は、$G_{3\sim}N_{1\sim7}\,G_{3\sim}N_{1\sim7}\,G_{3\sim}N_{1\sim7}\,G_{3\sim}$（N=A, U, G, C）およびこのルールから発展したものを利用して細胞内における存在位置の同定が試みられてきた。その結果、がん関連遺伝子の 5'UTR などの位置における RGq 構造が同定され、タンパク質翻訳制御への関与など細胞内における本構造の機能が解明されるに至っている。しかし、細胞は夾雑環境でありチャネル等の介在により細胞内塩濃度は一定状態にはならない。常に変動する環境下の細胞に対して一義的な法則で RGq を探索することは困難かつ不十分であろう。

そこで我々のグループでは法則ではなく、タンパク質発現量変化に基づいた実験的な RGq の探索法の開発に取り組んできた。

この方法は RGq 選択的安定化化合物 RGB-1 の有無によるタンパク質発現量を網羅的に評価するもので、既存法とは全く異なるアプローチでの RGq 探索が可能となる。

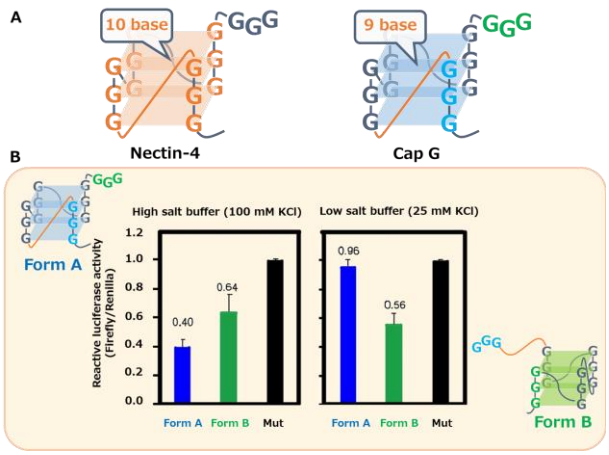


Fig.1 (A) RGq formation of Nectin-4 and CapG by Non-canonical rule. **(B)** Effects of KCl concentration on translation.

実際に本手法により乳がん細胞株である MCF7 細胞において構築される RGq 構造の探索を試みたところ Nectin-4 及び CapG の mRNA 上に同構造が存在していることが明らかになった。驚くべきことにこれらの遺伝子で構築される RGq は、最近接したグアニン繰り返し配列（G tract）ではなく、離れた位置にある G tract を利用していることも明らかになった（**Fig.1 A**）。さらに、CapG 上の RGq はカリウムイオン濃度によって RGq 形成に必要な G tract を変え、それぞれ異なる度合いでタンパク質翻訳反応を制御していることが明らかになった（**Fig.1 B**）。

本発表においては、RGB-1 を用いた RGq 探索の具体的な方法や Nectin-4、CapG 上で形成された RGq の配列およびタンパク質発現制御について紹介する。

オリゴマー型リボザイム（リボザイム四次構造）の *in vitro* 進化を目指した液滴封入・選択的増幅システムの構築

○上田実怜[1]・松村茂祥[1, 2]・井川善也[1, 2]（[1]富山大院理工、[2]富山大院生命融合）

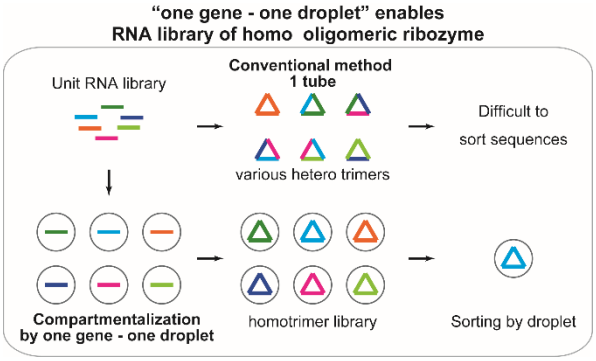
***In vitro* selection system of ribozymes adaptable to μ-droplet compartment: toward artificial evolution of ribozyme quaternary structures**

(Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama[1], Graduate School of Innovative Life Science, University of Toyama[2]) UEDA, Misato[1]; MATSUMURA, Shigeyoshi[1,2]; IKAWA, Yoshiya[1,2]

微小液滴による区画化は細胞様の“遺伝子型-表現型”の紐付けを可能にする有望な方法である。サイズが均一な微小液滴を高速で作成・スクリーニングできる droplet-μ-fluidic（dμf）デバイスを駆使すれば、多数の酵素変異体を各遺伝子単位で封入・発現させ、目的の触媒能力で選別することができる。RNA の *in vitro* 進化技術は新規リボザイムの開発に大きな成功を収めているが、dμf デバイスを用いれば *in vitro* リボザイム進化を単量体リボザイムからオリゴマー型リボザイムへと拡張できる。

環状多量体（多角形状）を主とする集積構造の形成に依存して触媒活性を示すオリゴマー型リボザイムが，グループ I リボザイムのモジュール工学により創成されている[1), 2)]。我々は dμf デバイスによる進化工学システムを駆使して、リボザイム環状多量体の *in vitro* 人工進化を目指している。

その最初の段階として、微小液滴内の等温条件下で活性種の選択的増幅が可能なグループ I リボザイムの *in vitro* 進化システムの構築を行っている。dμf デバイスでは蛍光強度を指標として液滴を高速選別（選択）するため、蛍光分子と消光分子をもつ FRAT 消光型の基質 RNA を用いれば、リボザイムの反応活性を基質の 5’断片がもつ蛍光分子による蛍光増加で追跡できる。さらに基質の 3’断片がタグ配列としてリボザイムの 3’末端に連結する反応を用い、活性なリボザイムの選択的な逆転写を可能とした。タグが付加された活性なリボザイム変異体は、等温 DNA/RNA 増幅システムによって増幅できる。本発表ではこの選択システムの各ステップの最適化の結果とその展望を報告する。



1) H. Oi *et al.*, *J. Biochem*, **161**, 451-462 (2017)
2) Y. Mori *et al.*, *ChemBioChem*, **22**, 2168-2176 (2021)

Poster(first day)

Wed. Sep 8, 2021 4:50 PM - 5:50 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 7:50 AM - 8:50 AM UTC | Second half number Zoom

Odd (1P-049~1P-093)

[1P-049] Metal-dependent activity regulation of a compact-sized DNAzyme containing an imidazole-4-carboxylate base pair

*Lingyun Hu[1], Yusuke Takezawa[1], Takahiro Nakama[1], Mitsuhiko Shionoya[1] (1. The University of Tokyo)

[1P-051] Development of weakly acidic environment-responsive unnatural nucleobase and its application to cancer cell-selective DNA aptamer

*Yui Nemoto[1], Kunihiko Morihiro[1], Akimitsu Okamoto[1,2] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo)

[1P-053] Development of pyrene aggregates using DNA backbone for high-brightness CPL expression

*Yuka Ito[1], Takahiro Kakuta[2], Tomoki Ogoshi[3], Hiroyuki Asanuma[1], Hiromu Kashida[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, 3. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-055] Development of oligonucleotide-based artificial partial agonists for a growth factor receptor and evaluation of their biological effects

*Momoko Akiyama[1], Masataka Yanagawa[2], Mitsuhiro Abe[2], Michio Hiroshima[2,3], Yasushi Sako[2], Ryosuke Ueki[1], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. RIKEN CPR, 3. RIKEN BDR)

[1P-057] Cancer-cell-selective toxicity of dicopper complexes: effect of linker size on DNA targeting enhancement of DAN cleavage activity and cytotoxicity

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

[1P-059] Enhanced Stability and Structural Changes of DNA Origami by Enzymatic Ligation

*Kirankumar Krishnamurthy[1], Arivazhagan Rajendran[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

[1P-061] Properties of DNAbinding proteins modified with solvatochromic fluorophore

*Mariko Aso[1], Kaori Tabata[1], Yukiko Abe[1], Yosuke Taniguchi[1], Shigeki Sasaki[2] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 2. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University)

[1P-063] Development of double-duplex invasion using ultrafast DNA photo-cross-linking

*Ami Shimabara[1], Ayumu Hirano[1], Shigetaka Nakamura[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute Science and Technology)

[1P-065] Detection of DNA and RNA by two peptide nucleic acids modified with a pyrene group.

*Koki Ishii[1], Sakura Tsuchitani[1], Miyu Toyama[1], Mizuki Kitamatsu[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University)

[1P-067] Evaluation of the effect of mechanical stress on cell arraying using Microcavity Array

*Chikara Suzuki[1], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Department of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[1P-069] Development of fluorescent chemical probes compatible with tissue-clearing, and their application for 3D imaging of tumor hypoxia

*Daichi Sakamoto[1], Tamura Iori[1], Bo Yi[1], Yutaro Saito[1], Naoki Yamada[1], Yoichi Takakusagi[2], Shimpei Kubota[3], Kazuki Tainaka[4], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, 3. Molecular Neuroimmunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, 4. Development of System Pathology for Neurological Disorders, Center for Bioresources, Brain Research Institute, Niigata University)

[1P-071] Rapid and precise antigen detection using Quenchbody by fluorescence polarization

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

[1P-073] Rapid Discrimination of Food-contaminated microorganisms based on Colony Fingerprinting using a Line Imaging Sensor

*Yusuke Tanaka[1], Hiroya Kohketsu[1], Yoshiaki Maeda[1], Tae-Kyu Lim[2], Manabu Harada[2], Tomoko Yoshino[1], Tadashi Matsunaga[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Department of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Malcom Co., Ltd)

[1P-075] Nucleolus Imaging in Plant Cells Using NIR-fluorescent Dyes Conjugated with a Cell Penetrating Peptide

*Yuki Sakai[1], Natsuki Nakashima[1], Takuya Nagae[1], Yoshikatsu Sato[2], Tetsuya Higashiyama[2,3], Masayasu Taki[2], Shigehiro Yamaguchi[1,2] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University, 3. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

[1P-077] Contribution of Tunneling Effect in Alkane Oxidation by Compound I Model Complex

*Yuma Morimoto[1], Kosuke Fukui[1], Hiroshi Fujii[2], Shinobu Itoh[1] (1. Osaka Univ., 2. Nara Women's Univ.)

[1P-079] Analysis of Structural Conversion of Bacteriochlorophyll *b* from the Purple Photosynthetic Bacterium *Blastochloris viridis*

*Yusuke Takashima[1], Shiori Nakagawa[1], Yoshitaka Saga[1] (1. Faculty of Science and Engineering, Kindai University)

[1P-081] Development of antioxidant nanozymes with numerous coordination sites similar to the active site of antioxidant enzyme Cu,Zn-SOD

*Hiroki Nakahara[1], Mami Okamura[1], Akiko Nomura[1], Masahito Kodera[1], Yutaka Hitomi[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[1P-083] Studies on association of a human catalytic antibody light chain taht oligomerizes

*Takahiro Sakai[1], Fitriana Wahyu[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Emi Hifumi[2], Taizo Uda[3], Shun Hirota[1] (1. Division of Materials science, Nara Institute of Science and Technology, 2. Research Promotion Institute, Oita University, 3. Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies)

[1P-085] Double Click Reagent Directed to Cell Surface

*Kohei Kitagawa[1], Moeka Yoshinaga[1], Masayuki Tera[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[1P-087] Invasion of enveloped artificial viral capsid into cells via membrane fusion

*Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Yoshihiro Sasaki[2], Kazunari Akiyoshi[2], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-089] Development of Perfluorocarbon-encapsulated Polymer Nanoparticle as ^{19}F MRI Contrast Agents

*Yuki Konishi[1], Fuminori Sugihara[2,3], Masafumi Minoshima[1], Wataru Nagaike[4], Takayuki Uchihashi[4], Kazuya Kikuchi[1,2,5] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ., 3. Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 4. Graduate School of Science, Nagoya University, 5. Center for Quantum Information and Quantum Biology, Osaka University)

[1P-091] Synthesis of Hemoglobin-Albumin Cluster Incorporating Antioxidant Reagents

*Marika Ishiamru[1], Taiga Yamada[1], Teruyuki Komatsu[1] (1. Faculty of Science and Engineering, Chuo University)

[1P-093] Analysis of circulating tumor cells in bloods derived from patients with urothelial carcinoma based on MCA/GCM method

*Kurumi Nakazawa[1], Ryo Negishi[1], Takatsugu Okegawa[2], Yu Nakamura[2], Mayumi Deki[2], Midori Watanabe[1], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Department of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Department of Urology, Kyorin University School of Medicine)

Metal-dependent activity regulation of a compact-sized DNAzyme containing an imidazole-4-carboxylate base pair

○胡 凌雲・竹澤 悠典・中間 貴寛・塩谷 光彦（東大院理）

Metal-dependent activity regulation of a compact-sized DNAzyme containing an imidazole-4-carboxylate base pair. (Graduate School of Science, The University of Tokyo) HU, Lingyun; TAKEZAWA, Yusuke; NAKAMA, Takahiro; SHIONOYA, Mitsuhiko

DNAzymes are functional DNA molecules that efficiently catalyze certain chemical reactions. To date, several structurally different DNAzymes have been created to cleave RNA substrates. We have previously succeeded in metal-dependent regulation of the activity of several RNA-cleaving DNAzymes by incorporating Cu^{II}-mediated artificial base pairs formed by coordination bonds between ligand-type nucleobase analogs and a Cu^{II} ion.[1] Among the various RNA-cleaving DNAzymes, the 8-17 DNAzyme stands out for its compact size and high catalytic capacity.[2] However, due to the compact size of the structure, it is difficult to undergo modification without affecting its activity. So far, we have constructed 8-17 DNAzymes modified with **T**–Hg^{II}–**T**, **C**–Ag^{I}–**C** and an artificial Cu^{II}-mediated hydroxypyridone base pair (**H**–Cu^{II}–**H**), but the metal-dependent regulation of activity has not been well demonstrated.[3]

In this study, a Cu^{II}-responsive DNAzyme was developed by incorporating a known Cu^{II}-mediated imidazole-4-carboxylate base pair (**Im^{C}**–Cu^{II}–**Im^{C}**)[1c,4] into the short stem of 8-17 DNAzyme (Fig. 1a). The modification sites were determined based on the crystal structure of the DNAzyme.[5] In the absence of Cu^{II} ions, the **Im^{C}**-modified DNAzyme showed low RNA-cleaving activity (Fig. 1b, gray). This indicates that the active structure of the catalytic region was distorted by the charge repulsion between mismatch bases of **Im^{C}**. The addition of 1 equiv. of Cu^{II} ion enhanced the activity of the DNAzyme (Fig. 1b, blue). This is probably due to the formation of **Im^{C}**–Cu^{II}–**Im^{C}**, which stabilizes the short stem. Overall, the activity of the **Im^{C}**–DNAzyme was increased 4.7-fold by the addition of equimolar Cu^{II} ion. This is more efficient than previous DNAzymes with different metal-mediated base pairs[3]. These results suggest that the **Im^{C}**–Cu^{II}–**Im^{C}** pair is useful in regulating the activity of DNAzymes of such compact size and provide prospects for the construction of future metal-responsive DNA devices.

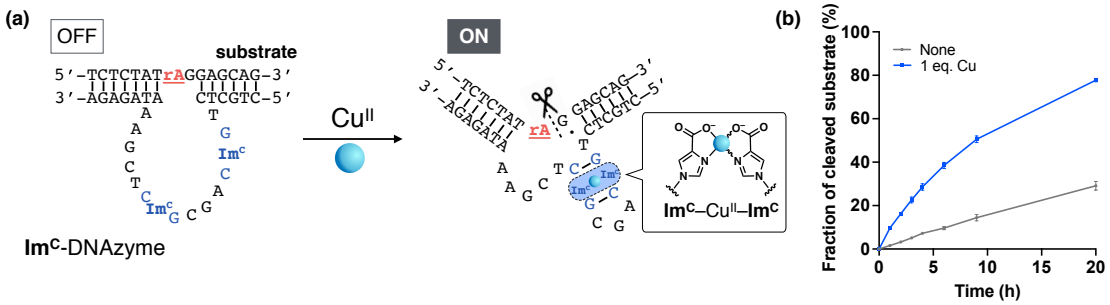


Fig. 1 (a) Design of Cu^{II}-responsive RNA-cleaving DNAzymes bearing an **Im^{C}**–Cu^{II}–**Im^{C}** base pair (**Im^{C}**-DNAzyme). rA: an adenosine ribonucleotide at the cleaving site. **(b)** RNA-cleavage reaction catalyzed by **Im^{C}**-DNAzyme in the presence (1 equiv.) and in the absence of the Cu^{II} ions. [DNAzyme] = 1.0 μM, [substrate] = 10 μM, [$CuSO_4$] = 0 or 1.0 μM in a reaction buffer (50 mM HEPES (pH 7.5) containing 100 mM NaCl and 10 μM $Pb(OAc)_2$) 25 °C. *N* = 3. Error bars: standard errors.

[1] (a) Y. Takezawa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 19342. (b) T. Nakama *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 10153. (c) Y. Takezawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 21488. (d) T. Nakama et al., *Chem. Commum.*, **2021**, *57*, 1392. [2] G. F. Joyce *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 4262. [3] L. Hu *et al.*, 第 14 回バイオ関連化学シンポジウム, **2020**, 1P-61. [4] N. Sandmann *et al.*, *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *191*, 85. [5] H. Liu *et al.*, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 2006.

©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

弱酸性環境応答性非天然核酸塩基の開発とがん選択的 DNA アプタマーへの応用

○根本祐衣[1]・森廣邦彦[1]・岡本晃充[1,2]（[1]東大院工、[2]東大先端研セ）

Development of weakly acidic environment-responsive unnatural nucleobase and its application to cancer cell-selective DNA aptamer (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo[2]) NEMOTO, Yui[1]; MORIHIRO, Kunihiko[1]; OKAMOTO, Akimitsu[1,2]

pH 変化などの外部刺激に応答する核酸分子は新たなドラッグデリバリーシステムや生体内センサーへの応用など様々な分野において研究が進められている。中でも、pH が 7.4 程度に保たれている正常細胞周辺と比較してがん細胞周辺の pH は約 6.2~6.9 と弱酸性に偏っていることから [1)]、pH 応答性核酸分子をがん治療薬に利用することでがん選択性を高め、患者への副作用を軽減できると期待されている。先行研究では、i-motif や三重鎖といった特殊な構造を用いた pH 応答性核酸の開発が報告されているが、これらの構造は塩基配列や配列の長さに制約が大きく、汎用性が低いという課題がある。そこで、がん細胞周辺の pH で性質が変化する非天然核酸塩基を用いて汎用性の高い二重鎖の形成に pH 応答性を持たせることができれば、様々な核酸医薬のがん細胞選択性を高めることが可能になると考えた。

非天然核酸塩基を設計するにあたって、アデノシンの 3 位窒素原子を炭素原子に置き換えることで pKa_H が 3.6 から 7.0 に上昇することに注目した [2)]。これを基に本研究室で以前開発された非天然核酸塩基 **An^C** は pKa_H が 5.9 を示すことが見出されており、がん細胞周辺の pH でプロトン化することでシトシンと可逆的に塩基対を形成することができると考えられる（Fig. 1）。本研究では、この非天然核酸塩基 **An^C** を用いてがん細胞への選択性を高めた核酸医薬を開発することを目的とする。

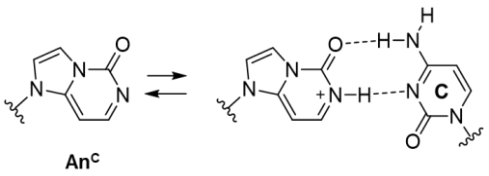


Fig 1. Protonation of **An^C**.

合成したオリゴヌクレオチドが相補鎖と形成する二重鎖の融解温度 (T_m値) を測定することにより、pH6.0 および pH7.5 の緩衝液中における **An^C**:C 塩基対の安定性を評価した。また、二重鎖の熱力学的パラメーターを解析することで pH 変化によって結合能が変化する原因を調べた（Table 1）。解析の結果、**An^C**:C 塩基対は弱酸性条件下で二重鎖形成によるエントロピー損失が減少することで安定化し、A:T 塩基対と同程度の安定性を示すことが分かった。

Table 1. T_m values and thermodynamic parameters of dsDNA containing A:T and **An^C**:C base pair.

5'-d(TACGCT**X**TCGCAT)-3'
3'-d(ATGCGA**Y**AGCGTA)-5'

X:Y	T_m [°C]		ΔH [kcal/mol]		ΔS [cal/(K・mol)]		ΔG [kcal/mol]	
	pH 7.5	pH 6.0	pH 7.5	pH 6.0	pH 7.5	pH 6.0	pH 7.5	pH 6.0
A:T	44	42	-85	-54	-242	-143	-10.3	-9.3
An^C:C	35	41	-110	-54	-328	-146	-8.0	-9.1

次に、**An^C** 塩基を DNA アプタマーに組み込むことにより、弱酸性環境応答性を付与することを検討した。アプタマーは、C-Met シグナル伝達を阻害しがん細胞の遊走を抑制することが報告されている C-Met 結合アプタマーSL1 [3)]を基に設計した。本発表では、ステム部分に 1 ～複数個の **An^C**:C 塩基対を組み込んだ C-Met 結合アプタマーの合成およびそれらの弱酸性環境応答性評価についても議論する予定である。

1) M.V. Shirmanova *et al*., *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.*, **1850,** 1905 (2015)
2) N. Minakawa, N. Kojima, A. Matsuda, *J. Org. Chem.,* **64,** 7158 (1999)
3) R. Ueki, S. Sando, *Chem. Commun*., **50,** 13131 (2014)

©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

高輝度 CPL 発現に適した DNA 導入ピレン会合体の探索

○伊藤有香[1]・角田貴洋[2]・生越友樹[3]・浅沼浩之[1]・樫田啓[1]（[1]名大院工、[2]金沢大院自然、[3]京大院工）

Development of pyrene aggregates using DNA backbone for high-brightness CPL expression (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University[2], Graduate School of Engineering, Kyoto University[3]) ITO, Yuka[1]; KAKUTA, Takahiro[2]; OGOSHI, Tomoki[3]; ASANUMA, Hiroyuki[1]; KASHIDA, Hiromu[1]

円偏光発光（Circularly Polarized Luminescence ; CPL）はキラルな蛍光分子を励起した際に生じる蛍光が円偏光する現象であり、近年非常に注目されている。これまでに、色素単量体や二量体が発する CPL に関する研究が多数報告されてきた。また、自己集合させた色素会合体が発する CPL についても研究が行われている。しかし、これらの系では色素の会合数や配向を変化させることが難しいという問題点があった。また、異なる種類の色素によるヘテロ会合体を調製することも困難である。そのため、色素会合形態が CPL 特性に及ぼす影響については未だ詳細が明らかとなっていなかった。

それに対し、我々は D-threoninol を利用して色素を DNA 二重鎖中で会合させる手法の開発に成功している[1]。この手法を用いれば、DNA 二重鎖中の任意の場所に色素を導入することができるため、色素の数や配向を厳密に制御することが可能である。また、他の手法では調製が困難なヘテロ会合体も容易に調製することが出来る。そこで本研究では、D-threoninol を利用して様々な会合形態の蛍光色素会合体を調製することで、色素の化学構造や会合数、色素配列が CPL 特性に及ぼす影響について検討を行った。CPL 発現に適した会合形態が明らかとなれば、新たな光学材料や生体プローブへの応用が期待できる。

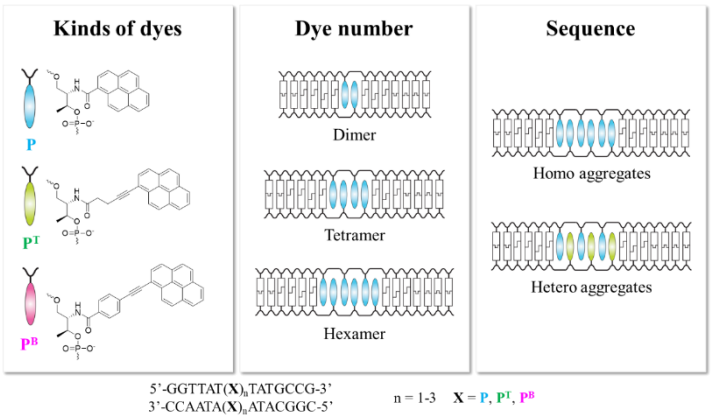


Fig. 1. Design of pyrene aggregates

具体的には、ピレンに着目した。ピレンは会合することでエキシマー発光を示し、また比較的強い CPL を発現することが報告されている[2]。そこで、D-threoninol を介して種々のピレン誘導体 (P, P^T, P^B) を DNA に導入した（Fig. 1）。それぞれの色素を 1 から 3 分子 DNA に導入し、二重鎖形成させることで色素数が 2，4，6 の会合体を調製した。また、異なる色素を含む配列を二重鎖形成させることで、ヘテロ会合体の調製も行った。調製した二重鎖について CPL 測定を行ったところ、P^T や P^B のホモ会合体よりも P のホモ会合体において、より強い CPL が観測されることが分かった。また、いずれの系においても会合数の増加ともに CPL の減少が確認された。このことは、色素数の少ない会合体の方が CPL 発現に適していることを示している。このように、D-threoninol を利用することで色素会合形態が CPL 特性に及ぼす影響を詳細に検討出来ることが分かった。

本発表では、様々なピレン導入会合体について得られた CPL 特性と、それらを CD スペクトルや吸収・蛍光スペクトルと比較した結果についてもあわせて報告する。

[1] H. Kashida, K. Sekiguchi, X. Liang, H. Asanuma, J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 6223-6230

[2] M. Nakamura, J. Suzuki, F. Ota, T. Takada, K. Akagi, K. Yamana, Chem. Eur. J. 2016, 22, 9121-9124.

DNA に基づく増殖因子受容体パーシャルアゴニストの開発および生理作用評価

○秋山 桃子[1]・柳川 正隆[2]・阿部 充宏[2]・廣島 通夫[2,3]・佐甲 靖志[2]・植木 亮介[1]・山東 信介[1]（[1]東大院工、[2]理化学研究所 CPR、[3]理化学研究所 BDR）

Development of oligonucleotide-based artificial partial agonists for a growth factor receptor and evaluation of their biological effects (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], RIKEN CPR [2], RIKEN BDR [3]) AKIYAMA, Momoko[1]; YANAGAWA, Masataka[2]; ABE, Mitsuhiro[2]; HIROSHIMA, Michio[2,3]; SAKO, Yasushi[2]; UEKI, Ryosuke[1]; SANDO, Shinsuke[1]

増殖因子は、特定の細胞膜受容体の二量化およびリン酸化を誘起することで、様々な細胞機能を制御している（Fig. a）。増殖因子は生体内において器官形成や創傷治癒を制御することから、再生医療や疾病治療への応用が期待されている一方、多面的な細胞機能を誘起するため、発がんやアレルギー反応などの望まない副作用を起こし得ることが知られている[1)]。そのため、受容体を活性化するリガンド分子（アゴニスト）としての増殖因子の医療応用は限られているのが現状である。

この問題を解決するため、近年、増殖因子受容体パーシャルアゴニストが注目を集めている。天然の増殖因子よりも低い最大受容体活性化量（E_{max}）を示すパーシャルアゴニストは、適切なレベルの受容体活性を引き起こすことが出来るため、副作用の少ない治療を可能にする分子基盤として期待されている（Fig. b）[2,3)]。そこで本研究では、増殖因子受容体パーシャルアゴニストの開発を目指した。本研究では、人工リガンド設計の基盤として、構造予測のしやすさや熱的な安定性から受容体結合性 DNA アプタマーに着目し、E_{max} の精密制御を実現するパーシャルアゴニストの設計指針を見出した[4)]。さらに本研究では、再生医療分野への応用において重要となる、細胞の増殖、遊走、血管新生などの細胞機能に着目し、開発したパーシャルアゴニストによって、これら細胞機能の精密制御が可能か検証を行なった。

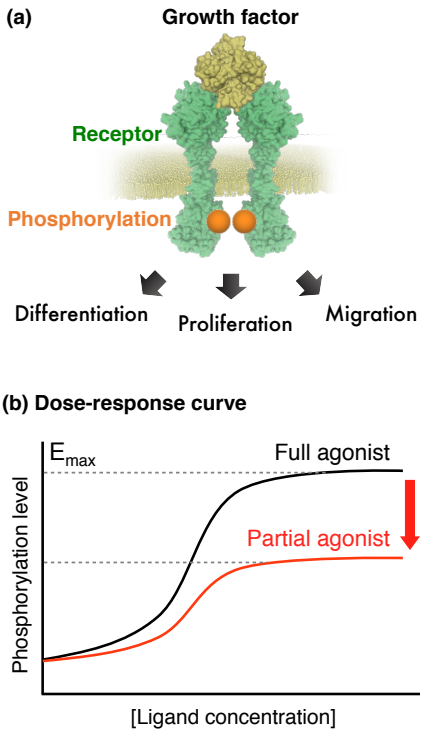


Figure. (a) 増殖因子によるシグナル伝達 (b) フルアゴニスト・パーシャルアゴニストによって誘起される増殖因子受容体リン酸化レベルに関する用量反応曲線

1）M. A. Lemmon and J. Schlessinger, *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
2）C. C. M. Ho, A. Chhabra, P. Starkl, P. J. Schnorr, S. Wilmes, I. Moraga, H. S. Kwon, N. Gaudenzio, R. Sibilano, T. S. Wehrman, M. Gakovic, J. T. Sockolosky, M. R. Tiffany, A. M. Ring, J. Piehler, I. L. Weissman, S. J. Galli, J. A. Shizuru and K. C. Garcia, *Cell* **168**, 1041–1052 (2017).
3）K. Mohan, G. Ueda, A. R. Kim, K. M. Jude, J. A. Fallas, Y. Guo, M. Hafer, Y. Miao, R. A. Saxton, J. Piehler, V. G. Sankaran, D. Baker and K. C. Garcia, *Science* **364**, eaav7532 (2019).
4）M. Akiyama, R. Ueki, M. Yanagawa, M. Abe, M. Hiroshima, Y. Sako and S. Sando, *Angew. Chem. Int. Ed. 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

二核銅錯体のがん細胞選択的毒性：DNA 標的部位導入による DNA 切断活性と細胞毒性の向上に及ぼすリンカーサイズの効果

○畑 真知・人見 穣・小寺 政人（同大院理工）

Cancer-cell-selective toxicity of dicopper complexes: effect of linker size on DNA targeting enhancement of DAN cleavage activity and cytotoxicity (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) HATA, Machi; HITOMI, Yutaka; KODERA, Masahito

抗がん剤として臨床利用されているブレオマイシンは DNA 標的部位をもち、投与後に Fe や Cu と錯形成して DNA 切断部位を形成する。DNA 標的部位と切断部位の組み合わせは、DNA 切断による細胞毒性の発現に効果的である。しかし、ブレオマイシンは副作用として肺毒性を伴う問題がある。この原因として、これらの抗がん剤は、がん細胞だけでなく正常細胞にも作用することが挙げられる。その為、副作用の軽減に向けて、がん細胞選択的に作用する抗がん剤の開発が求められる。

これまでに我々は、がん細胞の特異環境(低 pH，高い H_2O_2 濃度)を利用することにより、がん細胞選択的に毒性を示す二核銅錯体を開発してきた。その中で、二核銅錯体$[Cu_2(\mu\text{-OH})(bcamide)](ClO_4)_2$ (**4**) (Fig 1)が H_2O_2 濃度に比例して DNA 切断を促進することを見出した[2]。また、**4** は正常細胞よりもがん細胞に対して約 3 倍高い細胞毒性を示すことも見出した。しかし、がん細胞である HeLa 細胞に対する **4** の IC_{50} 値は 1,000 μM 以上であり、既存の抗がん剤に比べて毒性が低い。そこで、DNA 切断活性と細胞毒性を向上させることを目指し、ブレオマイシンの構造を模倣して DNA 標的部位を **4** に導入した二核銅錯体$[Cu_2(\mu\text{-OH})(bcamide\text{-}Pn\text{-}phen)](ClO_4)_2$ (n = 1 (**1**), n = 2 (**2**), n = 3 (**3**)) (Fig 1)を合成した。DNA 標的部位には、DNA インターカレーターであり、金属配位部位を持たないフェナントレンを選択した。これらの錯体はフェナントレンによる蛍光標識で、細胞内挙動を観察できる。また、DNA 標的部位と金属結合部位間の距離で DNA 切断活性と細胞毒性がどのように変化するかを調べる為に、リンカーの長さを変化させた。今回、長さの異なるリンカーによりフェナントレンを導入した新規二核銅錯体 **1**–**3** を合成し、DNA への結合定数、DNA 切断活性、細胞毒性を測定した。その結果、フェナントレンの導入による DNA 結合能の向上により、DNA 切断活性と細胞毒性が大きく向上することを見出した。また、リンカーの長さが短い程、これらの活性が高いこともわかった。さらに、**1**–**3** は **4** と共に比較的高いがん細胞選択性を示した。これらのことから、DNA 標的部位を導入すると、がん細胞選択性を高く維持したままで細胞毒性を向上さられることが明らかになった。

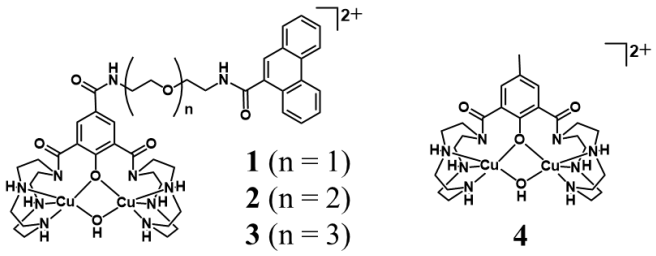


Fig 1. Chemical structures of **1**–**4**.

[1] Kadoya, Y.; Fukui, K.; Hata, M.; Miyano, R.; Hitomi, Y.; Yanagisawa, S.; Kubo, M.; Kodera, M. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 14294–14298.

Enhanced Stability and Structural Changes of DNA Origami by Enzymatic Ligation

(Institute of Advanced Energy, Kyoto University[1]) KRISHNAMURTHY, Kirankumar[1], RAJENDRAN, Arivazhagan[1], NAKATA, Eiji[1] and MORII, Takashi[1]

The structural DNA nanotechnology[1)] has attracted much attention during the past one and a half decades due to the addition of the scaffolded DNA origami method[2] to the field. Its versatility in designing complex and programmable constructs of two- (2D)[2)] and three-dimensional (3D)[3)] DNA origami has branched many functional applications as novel scaffolds for nanopatterning of various nanoparticles and quantum dots, attachment of carbon nanotubes, immobilization of biomolecules such as proteins[4)] and viral capsids, carriers of drugs, platform for the analysis of single molecular reactions and processes,[5)] and so on. Besides their advantages, one major issue with these nano-biomaterials is their unsatisfactory stability that prevents them from the applications in a wide range of conditions to withstand the thermal, mechanical, and chemical modifications. Most of the DNA nanotubes/tiles and the DNA origami structures melt below 60°C[6)] due to the presence of discontinuities in the phosphate backbone (i.e., nicks) of the staple strands. In molecular biology, enzymatic ligation is commonly used to seal the nicks in the duplex DNA. However, in DNA nanotechnology, the ligation procedures are neither optimized for the DNA origami nor routinely applied to link the nicks in it.

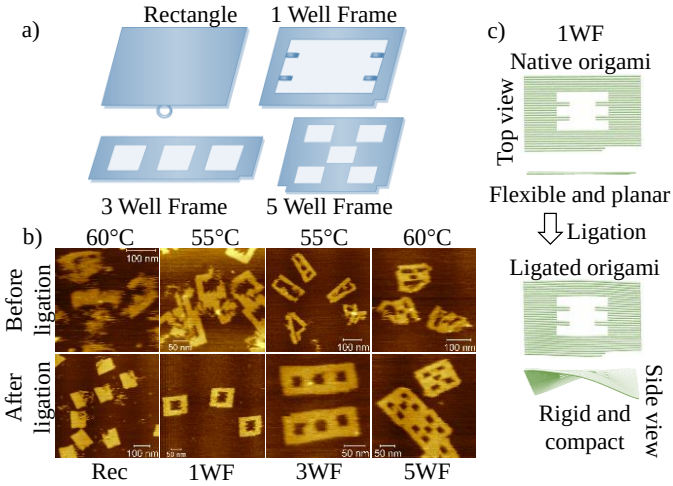


Fig 1. Schematic outline of a) four different 2D DNA origami, b) structural changes in 1WF DNA origami upon ligation. c) AFM images of native and enzyme ligated DNA origami at various temperatures.

In this study, a detailed analysis and optimized conditions for the enzymatic ligation of the staple strands in four types of 2D square lattice DNA origami is reported (Fig. 1a). Our results indicated that the ligation takes overnight, efficient at 37°C rather than the usual 16°C or room temperature, and requires higher concentration of 2400 U of T4 DNA ligase. Any further increase in the enzyme concentration had no significant changes. Under the optimized conditions, up to 10 staple ligations with a maximum ligation efficiency of 55% was achieved. Also, the ligation is found to increase the thermal stability of the origami as low as 5°C to as high as 20°C, depending on the structure as analyzed by AFM imaging (Fig. 1b). The melting curves of all the 4 types of DNA origami is obtained by UV-visible spectrophotometer exhibiting multiple melting transitions and hypochromicity for the ligated DNA origami. Further, gel electrophoretic mobility shift assay indicated that the ligation of the staple strands influences the globular structure/planarity of the DNA origami (Fig. 1c), and the origami is more compact when the staples are ligated, leading to a faster mobility with maximum mobility observed for the optimized conditions. The length distribution of the ligated staple strands is visualized by denaturing urea-PAGE. The globular structure of the native and ligated origami was also found to be altered dynamically and progressively upon ethidium bromide intercalation in a concentration-dependent manner. The access of the nick sites to the ligase enzyme and the ligation reaction in a tightly packed environment are also investigated.

References: 1) N.C. Seeman, *J. Theor. Biol.*, **99**, 237-247 (1982); 2) P.W.K. Rothemund, *Nature*, **440**, 297-302 (2006); 3) S.M. Douglas, *Nature*, **459**, 414-418 (2009).; 4) A. Rajendran, E. Nakata, S. Nakano, T. Morii, *ChemBioChem*, **18**, 696-716 (2017).; 5) A. Rajendran, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 874-890 (2012).; 6) A. Rajendran, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 14488-14491 (2011).

環境応答型 solvatochromic 蛍光分子で修飾した DNA 結合性蛋白質の評価

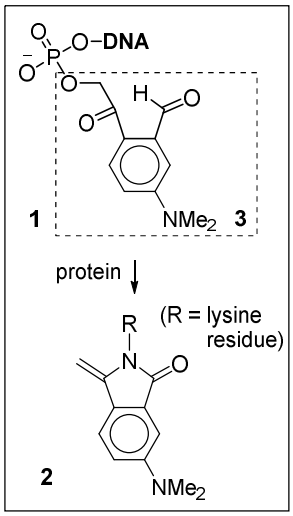
○麻生　真理子[1]・田畑　香織[1]・阿部　由紀子[1]・谷口　陽祐[1]・佐々木　茂貴[1,2]
（[1]九大院薬、[2]長崎国際大薬）

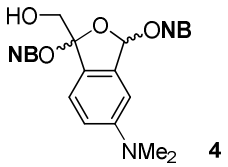
Properties of DNAbinding proteins modified with solvatochromic fluorophore (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyusyu University[1], Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University [2], Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University[2]) ASO, Mariko[1]; TABATA, Kaori[1]; ABE, Yukiko[1]; TANIGUCHI, Yosuke[1]; SASAKI, Shigeki[1, 2]

蛋白質の部位特異的蛍光修飾は蛋白質の構造、機能研究において有用な情報を提供する。我々は DNA 結合性蛋白質の部位特異的蛍光修飾を目的に反応性核酸 **1** を設計した。[1] 大腸菌複製開始に関わる蛋白質 DnaA の結合配列に反応性基 **3** を導入した反応性核酸は、DnaA へ結合後、近接するリジン残基を蛍光ソルバトクロミズムを示す環境応答型蛍光分子 **2** (dimethylamino-3-methyleneisoindolin-1-one) へ変換すると予想し、DnaA の DNA 結合ドメイン（Domain IV）の修飾反応を行った。また共存する核酸分子が修飾蛋白質の蛍光に与える影響を評価した。

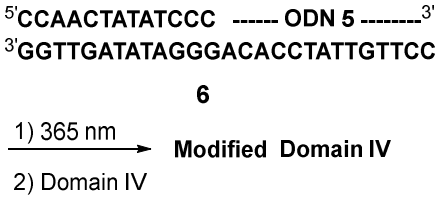
光照射により **3** を生成する、光反応性分子 **4** (**NB**OH = *o*-nitrobenzyl alcohol) を DnaA 結合配列に導入した前駆体 ODN **5** を合成した。次に、前駆体核酸 **5** を含む二本鎖 ODN **6** を調整し、LED 光源を用いて 365 nm の光を照射したのち、Domain IV と反応させた。蛋白質の蛍光修飾が反応液の HPLC 解析により確認された。反応液の蛍光スペクトルは 362 nm での励起により 500 nm 付近に極大を示した。

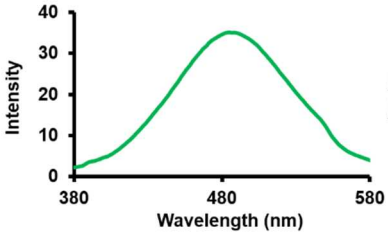
Domain IV の蛍光修飾に伴い、ODN **5** からは **3** が脱離した、5’末端にリン酸基をもつ 14-mer が生成する。これを含む二本鎖 ODN が修飾 Domain IV に結合していると予想された。反応液に DNase 1 を添加したところ、反応に用いた二本鎖 ODN が分解され、蛍光強度の変化が確認された。修飾蛋白質へ結合する DNA の有無が蛍光に影響を与える可能性が示唆された。また Domain IV と反応性核酸の複合体において、反応性基 **3** が近接するリジン残基をアラニンに置換した Domain IV 変異体を調整し、反応性核酸存在下での挙動を調べた。





5'-XTGTGGATAACAAGG-3'
ODN 5; X = 4





反応性核酸と Domain IV
反応液の蛍光スペクトル

参考文献 1) Gatanaga C., Yang B., Inadomi Y., Usui K., Ota C., Katayama T., Suemune H., Aso M. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 2216.

©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

超高速光架橋を用いた double-duplex インベージョン法の開発

○島原杏実・平野歩・中村重孝・藤本健造 （北陸先端大先端科学）

Development of double-duplex invasion using ultrafast DNA photo-cross-linking (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute Science and Technology) SHIMABARA, Ami; HIRANO, Ayumu; NAKAMURA, Shigetaka; FUJIMOTO, Kenzo:

Double duplex invasion (DDI)法はゲノム DNA に核酸プローブを結合させ、標的遺伝子の発現を抑制するアンチジーン法の一種である。DDI 法は二本鎖 DNA のそれぞれの鎖にプローブを割り込ませ結合させることで標的遺伝子の発現を抑制する。この方法はアンチジーン法以外にも核酸検出や人工制限酵素にも応用が可能であり、DNA 配列に影響を与えない新たなゲノム操作法として期待されている。DDI 構造を構築するためには安定な二本鎖 DNA にプローブを割り込ませるため、DNA とプローブの高い親和性が求められる。プローブ同士の結合を抑制する必要もあり、これまで、様々なプローブが開発されてきた。しかし、結合の安定性や標的配列の制限、生体内環境との親和性など課題が多く残っている[1,2]。我々はこれらの課題を克服し、光誘導型という従来にない特徴を有する DDI 構造構築の実現に最適な DNA プローブの開発を目指している。

当研究室で開発された光架橋性人工核酸 3-cyanovinylcarbazole nucleoside（^{CNV}K）は、385nm の光照射により相補鎖中のピリミジン塩基と共有結合を形成する[3]。形成される共有結合は熱的に不可逆であるため、従来法と比較すると、安定した photoinduced-DDI(pDDI)構造が形成されると考えられる。しかし、プローブ同士の二本鎖も安定させるため、プローブ同士の光架橋を抑制するために 5-cyanouracil(^{CN}U)を用いていた[4]。しかし、この ^{CN}U がプローブ同士の光架橋を抑制することは確認していたが、DDI 効率にどのような影響を与えるかは明らかになっていない。そこで、^{CN}U 同様光架橋を抑制すると考えられる Spacer(S)、dSpacer(dS)を組み込んだアンチジーンプローブを合成し、光架橋抑制効果を評価した。また、それらのプローブを用いた際の pDDI 効率を評価し、3 つの光架橋抑制素子および T の違いが DDI 効率にどのように影響するかを検証した。

1) J. Lohse, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, *96*, 11804.
2) S. P. Sau, T. S. Kumarb, P. J. Hrdlicka, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 2028.
3) Y. Yoshimura, K. Fujimoto , *Org. Lett.*, **2008**, *10* , 3227.
4) S. Nakamura, H. Kawabata, K. Fujimoto, *Chemical Communications*, **2017**, *53*, 7616 - 7619

2 つのピレン修飾ペプチド核酸を用いた核酸の検出

○石井康稀・土谷さくら・外山実侑・北松瑞生（近畿大院総合理工）

Detection of DNA and RNA by two peptide nucleic acids modified with a pyrene group (Graduate School of Science and Engineering, Kindai University) ISHII, Koki ; TSUCHITANI, Sakura; TOYAMA, Miyu; KITAMATSU, Mizuki

細胞内で特異的に発現量が増加･減少する RNA を検出することは、病気の診断に重要なことであり、その検出方法として蛍光プローブが用いられている。本研究では、ペプチド核酸（PNA）にピレンを修飾させた核酸検出のための蛍光プローブの開発について検討する。この蛍光プローブは Fig. 1 に示すように 2 種類の蛍光プローブ（PNA-Pyr および Pyr-PNA）を用いており、標的の RNA もしくは DNA とハイブリッドを形成したときにのみピレン由来のエキシマーが発光するように分子設計した。

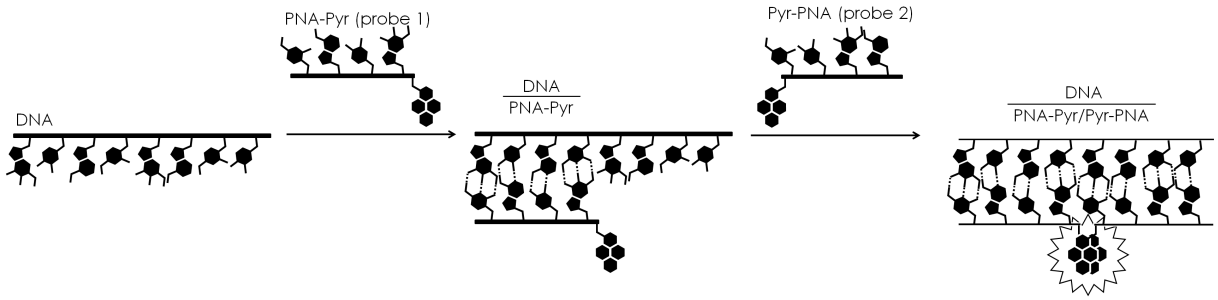


Fig.1. Schematic illustration of DNA and RNA detection by Pyr-modified PNA probes.

2 種類の PNA-Pyr と Pyr-PNA 蛍光プローブは、ペプチド固相法により合成し、逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-Tof Mass）で精製・同定を行った。これらの蛍光プローブをリン酸緩衝溶液（10 mM PBS; pH7.0）に溶解させた。これらの蛍光プローブの塩基配列に対して相補的な DNA または非相補な DNA を混合させて蛍光スペクトルを測定した（Fig. 2）。

相補的な DNA（cDNA）を含む 2 種類の蛍光プローブ水溶液では、480 nm 付近にピレン由来のエキシマー蛍光が現れた（Fig. 2 の実線）。一方で、非相補な DNA（ncDNA）を含む 2 種類の蛍光プローブ水溶液（Fig.2 の点線）や 2 種類の蛍光プローブのみの水溶液ではエキシマーの蛍光は確認されず、400 nm 付近のピレンのモノマー由来の蛍光のみが観測された。これは相補な DNA がテンプレートとなり、それぞれの蛍光プローブ PNA-Pyr と Pyr-PNA が DNA とハイブリッドを形成することで、それぞれのピレンが近接しエキシマーが形成されたことを示している。

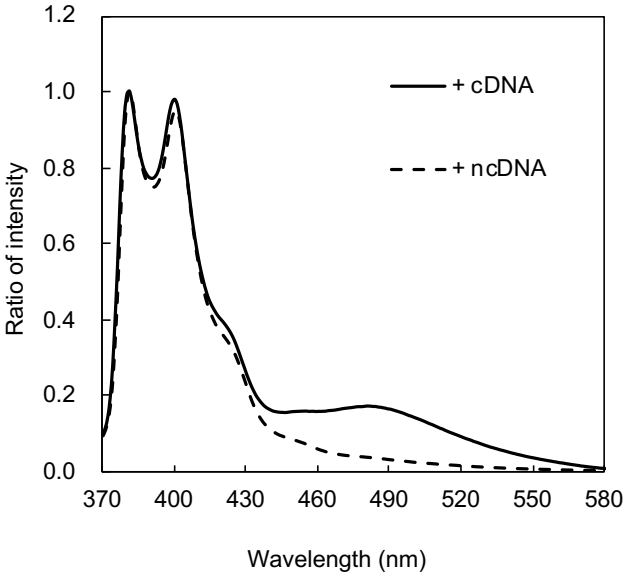


Fig. 2. Fluorescence spectra of two pyrene-modified PNA probes (PNA-Pyr and Pyr-PNA) with a complementary DNA (cDNA; solid line) and a non-complementary DNA (ncDNA; broken line) in PBS at room temperature. Each of Pyr-modified PNA concentration was 1 μM. The excitation wavelength was 350 nm.

Microcavity Array を用いた細胞アレイ化におけるメカニカルストレスの影響評価

○鈴木智加良[1]・田中剛[1]・吉野知子[1]（[1]東京農工大院工）

Evaluation of the effect of mechanical stress on cell arraying using Microcavity Array (Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology) SUZUKI, Chikara; TANAKA, Tuyoshi; YOSHINO, Tomoko

がんは疾患の進行とともに多くの変異を蓄積するため、遺伝子型・表現型ともに不均一な細胞集団である。近年、単一細胞分離技術の発展によりがん細胞の単一細胞解析が注目されている。当研究室で作成された Microcavity Array (MCA)は孔径数 μm の貫通孔を高密度にアレイ化したフィルター型の単一細胞分離デバイスであり、細胞のサイズや変形能に基づき微細貫通孔上に細胞を捕捉する技術である。これまでに MCA を用いてがん患者末梢血から血中循環腫瘍細胞の回収と単一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を行ってきた。しかし、MCA を用いた細胞の捕捉操作により細胞に対してせん断応力などのメカニカルストレスが加わり、ストレスに伴う遺伝子発現量が変化する可能性がある。本研究ではメカニカルストレスに応答し、発現量が変化することが確認されている yes-associated protein 1（YAP1）及びその関連遺伝子群の発現量の評価から MCA を用いた捕捉操作が細胞の遺伝子発現に与える影響の評価を試みた。

孔径 8 μm の微細貫通孔 (10^6 pores)を持つ MCA と PDMS 製の流路を統合し細胞捕捉用デバイスを構築した (Fig.1A)。変形能の異なるヒト乳腺がん細胞株 MCF-7 及び MDA-MB-231 (0.8～1 x 10^6 cells/ml)をそれぞれ細胞捕捉用デバイスに導入し、デバイスの下部から流速 0.2 ml/min で吸引することで微細貫通孔上に細胞を捕捉した (Fig.1B)。MCA 捕捉細胞から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により YAP1 及びその関連遺伝子 (ANKRD1、CTGF、CYR61、AMOTL2、ADRB2)をメカニカルストレスのマーカー遺伝子として、発現量評価を行った。また、メカニカルストレスのコントロールとして、シリンジを用いて細胞懸濁液のピペッティング処理を行い、同様にメカニカルストレスマーカー遺伝子の発現量を評価した。その結果、変形能が比較的低い乳腺がん細胞株 MCF-7 においては、ペッティング処理細胞で CTGF が約 5 倍、CYR61 が約 3 倍、ADRB2 が約 1.5 倍に発現量が増加し、メカニカルストレス応答が示された (Fig.2)。一方、MCA 捕捉細胞においては遺伝子の発現量の増加は確認されなかった。また、変形能の高い MDA-MB-231 においてもピペッティング処理では CTGF、ADRB2 の発現量が約 2.5 倍に増加した一方で、MCA 捕捉細胞では増加率は約 1.5 倍程度であった。以上の結果から MCA による細胞の捕捉操作ではメカニカルストレスに関連する遺伝子の発現に与える影響は少ないことが示された。よって、MCA を用いた細胞アレイ化及び単一細胞トランスクリプトーム解析への利用が可能であると結論付けた。

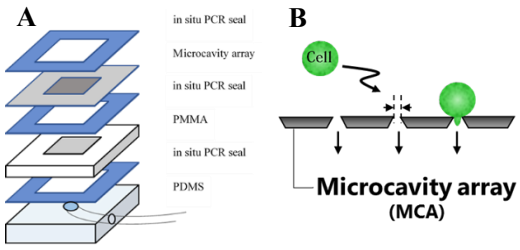


Fig. 1 Schematic diagram of Microcavity Array.
(A) Cell entrapment device
(B) Cell trapped on the MCA

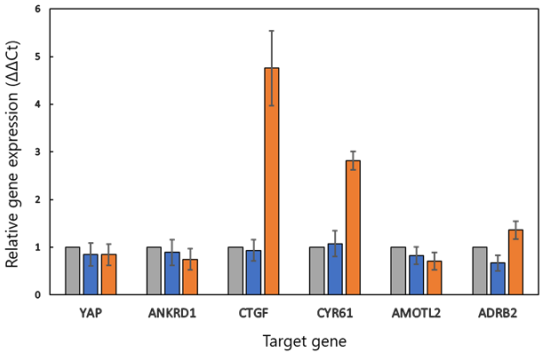


Fig. 2 Comparison of stress responding gene expression level in MCF-7 cells between several treatments; Non-treated cells (gray), cells trapped on MCA (blue), cells after pipetting process (orange).

組織透明化に応用可能な蛍光分子プローブの開発と腫瘍内低酸素環境の三次元観察

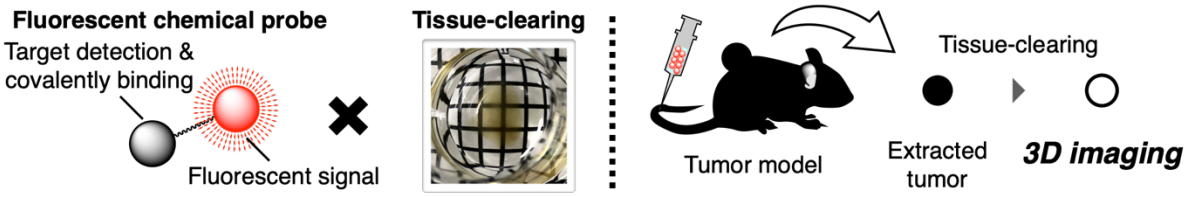
○坂本大地[1]・田村伊織[1]・伊博[1]・齋藤雄太朗[1]・山田直生[1]・高草木洋一[2]・久保田晋平[3]・田井中一貴[4]・山東信介[1]（[1]東大院工・[2]量研機構量子生命科学研究所・[3]北大遺伝子病制御研究所・[4]新大脳研究所）

Development of fluorescent chemical probes compatible with tissue-clearing, and their application for 3D imaging of tumor hypoxia (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology[2], Molecular Neuroimmunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University[3], Development of System Pathology for Neurological Disorders, Center for Bioresources, Brain Research Institute, Niigata University[4]) SAKAMOTO, Daichi[1]; TAMURA, Iori[1]; YI, Bo[1]; SAITO, Yutaro[1]; YAMADA, Naoki[1]; TAKAKUSAGI, Yoichi[2]; KUBOTA, Shimpei[3]; TAINAKA, Kazuki[4]; SANDO, Shinsuke[1]

生物個体の表現系として現れる生命現象は、細胞、組織、臓器、個体という多階層に張り巡らされた複雑な分子ネットワークによって織りなされる。その分子の局在・動態を、細胞・組織のレベルを越え、臓器・個体全身の中で包括的に捉えることができれば、様々な未知未踏の発見が得られると考えられる。

近年、生物個体全身・全臓器における蛍光標識された分子を１細胞解像度で包括的に定量解析するためのツールとして、生体組織の透明化技術が大きな注目を浴びている[1]。組織透明化では、標的分子のラベリングに蛍光タンパク質や蛍光色素結合抗体が広く用いられる。しかし、蛍光タンパク質では生体内反応の経時変化観察や内在性分子の蛍光標識に制限がある。また、抗体は分子サイズが大きいため、再現性良く全組織に浸透させることが困難である。一方で、有機化学的に設計・合成された低分子量の「蛍光分子プローブ」は、一般的に、内在性分子の活性や局在の直接的かつ経時的な検出が可能である。さらに、蛍光分子プローブは分子サイズの小ささから全身の標的を蛍光標識することが期待され、従来の問題点であった再現性の低さを克服できる可能性がある。しかし、既知の蛍光色素や標的検出分子は、透明化試薬との組み合わせ（相性）に依存して性能が大きく変わる。この原因に関する化学的知見は乏しく、組織透明化での蛍光分子プローブの活用は一般化されていないのが現状である。そこで、本研究では、組織透明化手法に応用可能な蛍光分子プローブの開発、および開発した蛍光分子プローブで標的をラベリングした透明化組織の丸ごと三次元イメージングの実証を目的とした。

本研究ではまず、組織透明化に応用可能な蛍光色素の検討を行った。続いて、得られた知見を基に生体内低酸素環境を検出する蛍光分子プローブの設計および開発を行った。そして、培養細胞およびモデル動物を用いて蛍光分子プローブの機能評価を行い、蛍光ラベリングされた腫瘍組織を実際に透明化し、腫瘍内低酸素環境の三次元イメージングを試みた。本発表では、これらの成果を報告する。



1）K. Tainaka, S. I. Kubota, T. Q. Suyama, E. A. Susaki, D. Perrin, M. Ukai-Tadenuma, H. Ukai, and H. R. Ueda, *Cell* **2014**, *159*, 911.

©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

クエンチ抗体と蛍光偏光法を用いた高速かつ高精度な抗原検出法

○安田貴信[1]・笹本佳那[1]・北口哲也[2]・上田宏[2]（[1]東工大院生命、[2]東工大化生研）

Rapid and precise antigen detection using Quenchbody by fluorescence polarization ([1]Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech., [2]CLS, IIR, Tokyo Tech.) YASUDA, Takanobu[1]; SASAMOTO, Kana[1]; KITAGUCHI, Tetsuya[2]; UEDA, Hiroshi[2]

Quenchbody (Q-body)は抗体の抗原結合部位近傍に蛍光色素を部位特異的に導入した蛍光標識抗体である。検体と混合してその蛍光強度を測定するだけで簡便かつ迅速に抗原の有無を判別可能であり、食品検査の高効率化や臨床即時検査への応用が期待されている。Q-body 中の蛍光色素は抗体内のトリプトファン(Trp)残基からの光誘起電子移動によって消光（クエンチ）状態となるが、抗原存在下では抗原抗体複合体の形成に伴って蛍光色素が抗体外に放出され、Trp 残基との相互作用が相対的に弱まり、クエンチが解除され蛍光輝度が上昇する（脱クエンチ）。しかし、抗体によって Trp の分布などの分子構造が異なる事から、この現象は必ずしも全ての抗体において有意に認められる訳ではない。

一方 Q-body では、抗原添加による脱クエンチ時に放出された色素の自由度が増大し、蛍光異方性 r が減少することが知られている [1)]。もし蛍光輝度変化が乏しい Q-body においても r あるいは 1/r の変化によって抗原を検出できれば、より多くの抗体を Q-body として活用できる可能性がある。

このため今回、蛍光色素 BODIPY-TMR で修飾した Q-body を調製した。骨代謝のマーカーとして知られる BGP を認識する一本鎖抗体 scFv の重鎖 N 末端に蛍光色素修飾用のシステインを含むタグ配列を有する遺伝子をコードするプラスミドベクターを用いて大腸菌 SHuffle T7 Express LysY を形質転換し、菌体培養とタンパク質の発現誘導を行い、金属アフィニティ精製を行った。精製されたタンパク質を BODIPY-TMR maleimide (BDP)で修飾し、FLAG タグを利用して精製を行い Q-body を得た。

まず、得られた ScFv 型 Q-body について、抗原有無での条件での蛍光偏光測定を行った。抗原として 1 μM の BGP の C 末 7 アミノ酸ペプチド(BGP-C7)を用いた結果、抗原の添加に伴う顕著な蛍光異方性の変化が確認された(Fig. 1A)。なお、図の縦軸としては自由度を反映する 1/r をとった。

続いて、最近当研究室で開発された Quenchprobe (Q-probe)[2)]を用い、BGP 認識 Fab 断片と抗原を添加した際の蛍光偏光度変化を調べた。Q-probe は、抗体の L 鎖結合タンパク質 Protein M の C 末端を蛍光修飾した蛍光プローブであり、抗体と混合し蛍光強度を測定することでその抗体が Q-body として有望かを簡便に判別可能である。結果、Fab の添加により 1/r の有意な減少が、抗原添加により 1/r の有意な上昇が確認された(Fig. 1B)。これにより、Q-probe を用いて蛍光偏光の顕著な変化を示す抗体と色素の選別が可能なことが示唆された。蛍光偏光測定はレシオ測定であるため、Q-body よりもプローブ濃度変化に寛容なより高精度な測定が可能となると期待される。

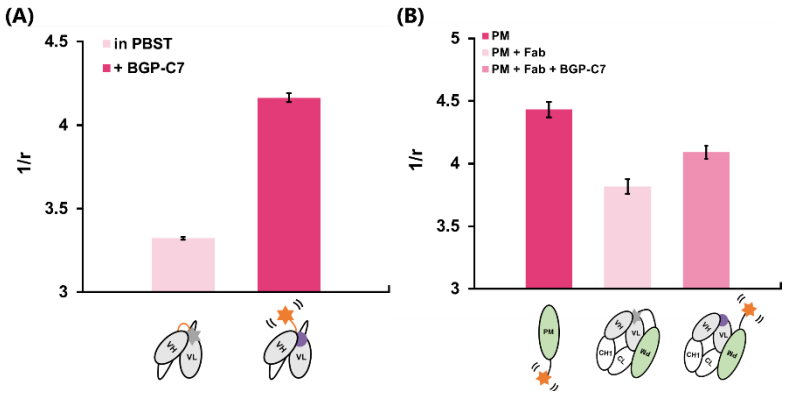


Fig. 1. (A) Antigen BGP-C7 dependent change in 1/r of BODIPY-TMR labeled scFv Q-body. (B) Change of 1/r of BODIPY-TMR labeled PM Q-probe upon adding X nM Fab and 1 μM BGP-C7 antigen.

1) H. Ohashi *et al.*, *Bioconj. Chem.* **27**, 2248-2253 (2016)
2) J. Dong *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* **165**, 112425 (2020)

©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

ラインイメージングセンサを用いたコロニーフィンガープリント法による食品混入微生物の迅速判別

○田中雄介[1]・纐纈宏也[1]・前田義昌[1]・林 泰圭[2]・原田 学[2]・吉野知子[1]・松永 是[1]・田中 剛[1]（[1]東京農工大院工、[2]株式会社マルコム）

Rapid Discrimination of Food-contaminated microorganisms based on Colony Fingerprinting using a Line Imaging Sensor (Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology [1], Malcom Co., Ltd [2])
TANAKA, Yusuke[1]; KOHKETSU, Hiroya[1]; MAEDA, Yoshiaki[1]; LIM, Tae-Kyu[2]; HARADA, Manabu[2]; YOSHINO, Tomoko[1]; MATSUNAGA, Tadashi[1]; TANAKA, Tsuyoshi[1]

混入微生物の迅速な菌種判別は、飲食品の製造過程において重要な技術である。サルモネラ菌(*Salmonella enterica*)や黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)などの食品媒介病原菌は腹痛や嘔吐などの食中毒症状を引き起こす。そのため、汚染原因・感染経路の特定に菌種の迅速な判別は重要である。しかし、従来の判別方法は、数日の培養期間および熟練したオペレータを必要とするため、迅速・簡便に可能な菌種判別法の開発が求められている。当研究室では、イメージングセンサを用いて微生物コロニーを撮像して得られたコロニーの光学パターン画像 (コロニーフィンガープリント:CFP)から画像特徴量を抽出し、その機械学習から菌種判別を行うコロニーフィンガープリンティングを開発してきた[1)] (Fig. 1)。本研究では、培養シャーレ全面を高分解能に撮像可能な新規ラインイメージングセンサを開発し、食品混入微生物の属、種および株レベルの判別を行うことを目的とした。

本研究では、1 次元フォトセンサであるラインイメージングセンサと温度調節可能なインキュベーターを搭載した CFP 撮像装置 (CMOS センサ、ピクセルサイズ 3.52 μm)を開発した。シャーレ画像 1 枚の撮像に要する時間は約 5 秒であり、撮像と同時にシャーレ上に存在する全コロニーの CFP を取得可能であるため、高いスループット性が示された。

次に本装置を用いて、複数の食品混入微生物の判別を行った。標準寒天培地に播種した各菌体の培養とコロニーの経時的な撮像を行うことで各菌種の CFP を取得した。菌体によって培養時間が異なり、最長 36 時間必要であった。また、コロニー面積が 1 mm^2 に最も近い CFP から、輝度値や形状等に基づく画像特徴量を算出し機械学習法の一つであるランダムフォレストによる判別分析を行った。その結果、従来の質量分析による微生物判別法と同等の精度で食品混入微生物を属、種レベルおよび株レベルで判別できることが示された。

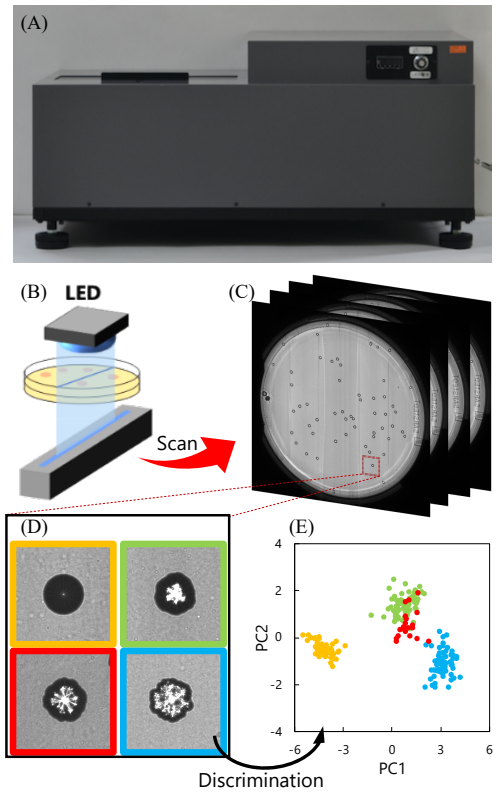


Fig. 1 Colony fingerprinting based bacteria discrimination. (A) Photograph of imaging system, (B) schematic illustration of the imaging system, (C) entire culture plate images (D) on CFPs, (E) Principal component analysis of features extracted from CFPs.

1) Y. Maeda, Y. Sugiyama, A. Kogiso, T. K. Lim, M. Harada, T. Yoshino, T. Matsunaga, T. Tanaka, *Sensors*, **18**, 9 (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

膜透過性ペプチドが連結した近赤外蛍光色素による植物細胞の核小体イメージング

○酒井佑基[1]・中島菜月[1]・長江拓也[1]・佐藤良勝[2]・東山哲也[2,3]・多喜正泰[2]・山口茂弘[1,2]（[1]名大院理、[2]名大 ITbM、[3]東大院理）

Nucleolus Imaging in Plant Cells Using NIR-fluorescent Dyes Conjugated with a Cell Penetrating Peptide

(Graduate School of Science, Nagoya University[1], Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University[2], Graduate School of Science, The University of Tokyo[3]) SAKAI, Yuki[1]; NAKASHIMA, Natsuki[1]; NAGAE, Takuya[1]; SATO, Yoshikatsu[2]; HIGASHIYAMA, Tetsuya[2,3]; TAKI, Masayasu[2]; YAMAGUCHI, Shigehiro[1,2]

これまで数多くのオルガネラ蛍光標識剤が開発されているが、植物細胞で機能するものは限られている。細胞壁を有する植物細胞は、動物細胞に比べて有機化合物の膜透過性が低いことが主な要因であるが、分子構造と膜透過性との相関性については未だ明らかになっていない[1)]。また、植物細胞はクロロフィル由来の強い自家蛍光を示すため、赤色の波長域は利用しにくく、適用可能な色素の選択肢を狭くしている。そこで本研究では、植物イメージングに向けたオルガネラ選択的な蛍光標識剤として、Fig 1 に示す二官能性ホスファローダミン色素 BP100-PREX710-CCH を設計した[2)]。BP100 は植物細胞用に開発された膜透過性ペプチドである。また、エチニル基にはクリック反応を介して任意のオルガネラ局在性官能基を導入することができる。検討を進める中で、エチニル基を有する BP100-PREX710-CCH そのものが、タバコ培養細胞 BY-2 の核小体を効率よく染色できることを見出した。

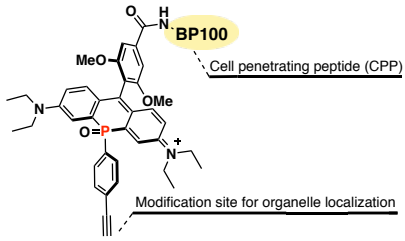


Fig 1. Structure of BP100-PREX710-CCH.

まず、BP100 が膜透過性に与える影響について検証するため、BY-2 およびシロイヌナズナの花粉管を用いて、BP100 の有無による染色効率の違いを比較した。BP100 を有していない場合は、いずれの場合も細胞内からの蛍光シグナルが観測されなかったが、BP100-PREX710 を含む培地中で観察した場合は、膜透過性の向上に伴う蛍光増大が両者から認められた。したがって、BP100 を連結させた場合は、細胞種を問わず色素に高い膜透過性を付与できるペプチドであるといえる。BY-2 が染色される様子をタイムラプスで追跡したところ、本色素は 6 時間程度かけて徐々に液胞選択的に集積していく様子が認められた。

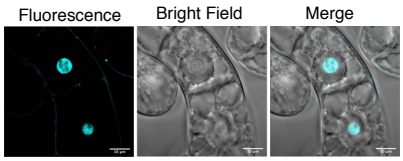


Fig 2. Fluorescence microscopy images of BY-2 cells incubated with BP100-PREX710-CCH.

一方、エチニル基を有する BP100-PREX710-CCH を用いて同様の検証を行ったところ、まず色素添加から 1.5 時間以内に BY-2 の核小体から強い蛍光が検出され (Fig 2)、その後徐々に液胞が染色される様子が観察された。1 時間毎のタイムラプス観察から、核小体と液胞の染色速度には大きな差があり、色素は核小体に対して 2 倍以上早く集積していることがわかった (Fig 3)。一旦核小体に取り込まれた色素は、細胞分裂後も核小体に保持されたままであったことから、色素はオルガネラ間で移動しないものと考えられる。これらの結果は、細胞への取り込み段階においてエチニル基が重要な機能を果たしていることを示唆しており、現在、その役割について検証を進めている。

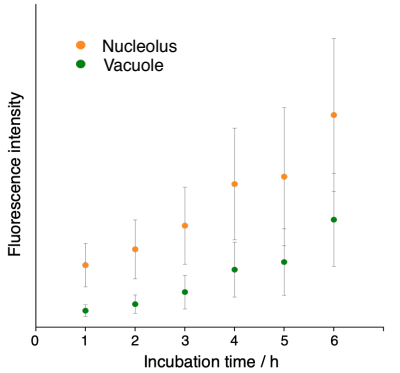


Fig 3. Comparison of time variation of fluorescence intensity in nucleolus (orange) and vacuole (green) of BY-2 cells incubated with BP100-PREX710-CCH.

1) W. B. Frommer, M. Nakamura et al., *The Plant Cell*, **2020**, *32*, 3081-3094
2) H. Ogasawara, S. Yamaguchi et al., *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 7902-7907

©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

Compound I モデル錯体を用いたアルカンの酸化過程における トンネル効果の寄与

○森本祐麻[1]・福井晃佑[1]・藤井　浩[2]・伊東　忍[1]（[1]阪大院工、[2]奈良女子大院自然科学）

Contribution of Tunneling Effect in Alkane Oxidation by Compound I Model Complex (Graduate School of Engineering, Osaka University[1], Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University[2]) MORIMOTO, Yuma[1]; FUKUI, Kosuke[1]; FUJII, Hiroshi[2]; ITOH Shinobu[1]

シトクロム P450 は、生理活性物質の合成や毒物の分解を担う酸素添加酵素である。その活性種、鉄(IV)オキシドポルフィリンパイカチオン錯体 (Compound I) は、室温条件においてもアルカン類を容易に酸化する活性を有する。Compound I によるアルカン酸化反応は、基質の C–H 結合の均等開裂より開始されるが、これは一般には大きな活性化エネルギーを要求する反応素過程である。Compound I が基質から水素を引き抜く過程について理解が進めば、バルクケミカル変換プロセスの効率化や、新たなファインケミカル変換法の創出に向けた基盤となる。これまでの Compound I による sp^3-C–H 結合からの水素引き抜き過程についての検討では、10 を超える比較的大きな速度論的重水素同位体効果 (KIE) の発現が報告されている。古典的な反応理論において予想される KIE の最大値は 7 程度であるが、それを大きく上回る KIE が観測される理由は反応の律速過程において水素原子がトンネル現象を経由するパスが関与しているためと考察されている (図 1)。活性化障壁を二次関数で近似する Bell のモデルをアレニウスプロットの解析に適用することで、活性化障壁の高さと厚みを解析する方法が報告されており、アルキルベンゼン系の基質の反応が良好に説明されている[1]。一方で我々は、活性が高く非常に不安定な Compound I モデル錯体 $Fe^{IV}(O)(Cl)(\mathbf{L_1}^{\bullet+})$ ($\mathbf{L_1}$ = 5,10,15,20-tetramesitylporphyrin dianion) の寿命を大きく伸ばすことのできる実験系を確立しており、これを用いることで単純アルカン類の酸化反応の直接観測に成功している[2]。またこの系を発展させ、非常に酸化活性の高い $Fe^{IV}(O)(Cl)(\mathbf{L_n}^{\bullet+})$ ($\mathbf{L_2}$ = 5,10,15,20-tetradichlorophenylporphyrin dianion, $\mathbf{L_3}$ = 5,10,15,20-tetratrichlorophenylporphyrin dianion) を観測できる実験系を確立した。

本研究ではこの反応系を利用して、シクロヘキサンの水酸化反応を紫外可視吸収分光法により直接追跡し、反応速度定数を決定した。続いて速度定数の温度依存性を解析し、トンネル効果を利用した反応経路と、古典的な反応経路の速度差を検討した。解析の結果、反応速度定数の小さい Compound I モデル錯体ほどトンネル効果を利用した反応の割合が大きくなる傾向が見られ、最も反応性の低い $Fe^{IV}(O)(Cl)(\mathbf{L_1}^{\bullet+})$ とシクロヘキサンの反応では水素引き抜き過程の 74%がトンネル効果を経由していることが分かった。本発表では、解析手法とその結果について詳細を議論する。

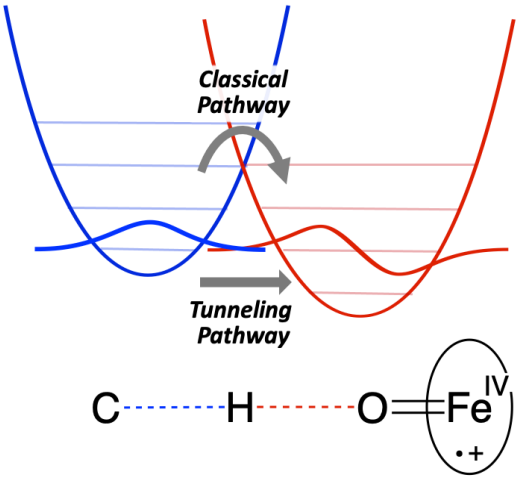


Figure 1. Two-reaction pathways in hydrogen atom transfer from substrate to compound I model complex. Blue and red parabolic curves stand for potential energy curves for substrate C–H bond and product H–O bond.

1) Z. Cong, H. Kinemuchi, T. Kurahashi, H. Fujii, *Inorg. Chem*. **2014**, *53*, 10632.
2) Y. Morimoto, Y. Shimaoka, Y. Ishimizu, H. Fujii, S. Itoh, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2019**, *58*, 10863.

©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

紅色光合成細菌 *Blastochloris viridis* のバクテリオクロロフィル *b* の構造変換反応の解析

○高島佑介・中川支央里・佐賀佳央（近畿大院総合理工）

Analysis of Structural Conversion of Bacteriochlorophyll *b* from the Purple Photosynthetic Bacterium *Blastochloris viridis* (*Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Kindai University*) TAKASHIMA, Yusuke; NAKAGAWA, Shiori; SAGA, Yoshitaka

バクテリオクロロフィル(BChl) *b* はバクテリオクロリン環の8位に特徴的なエチリデン基を有しており(Fig.1)、天然に存在するクロロフィル類では最も長波長側に Q_y 吸収帯を示す。BChl *b* をもつ光合成反応中心タンパク質(RC)は、4分子の BChl *b* と2分子のバクテリオフェオフィチン(BPhe) *b* 分子で電荷分離系を形成している。この RC タンパク質は光捕集コアタンパク質である LH1 タンパク質に囲まれ、光捕集-反応中心複合体(LH1-RC)を形成している。LH1-RC 複合体の中では安定に存在している BChl *b* であるが、BChl *b* や BPhe *b* は容易にクロリン骨格に変換されることが知られている。しかし、両者の反応特性を直接的に比較した研究はない。そこで本研究では、BChl *b* と BPhe *b* の酸性条件下での分子構造変換の反応性を速度論的に明らかにすることを目的にするとともに、LH1-RC 複合体に結合する BChl *b* の構造変換についても検討した。

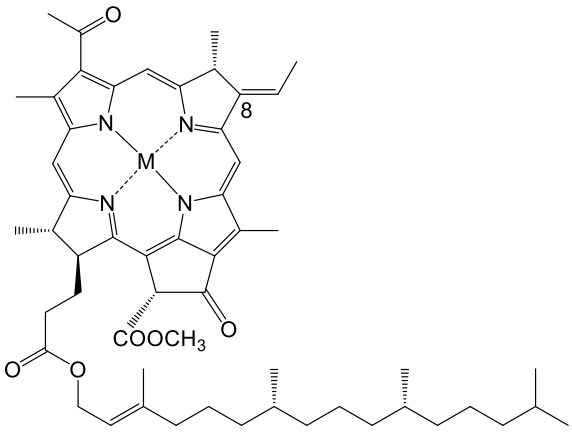


Fig.1. Molecular structures of BChl *b* (M=Mg) and BPhe *b* (M=2H) in purple photosynthetic bacteria.

BChl *b* は近赤外領域に大きな Q_y 帯（794 nm）、可視領域に小さい Q_x 帯(582 nm)、紫外領域に大きなソーレー帯（369 nm）がみられた（Fig.2 実線）。それに対して、BPhe *b* は Q_y 帯（776 nm）と Q_x 帯（527 nm）が短波長側にシフトしたスペクトルを示した（Fig.2 点線）。これらの色素を用いて弱酸性条件下でのクロリン骨格への変換を誘起した。両者の弱酸性条件下でのスペクトル変化から、BChl *b* のほうが BPhe *b* と比べてクロリン環への異性化反応がはるかに速いことが明らかになった。本発表ではあわせて、紅色光合成細菌 *Blastochloris* (*Blc.*) *viridis* から単離した LH1-RC 複合体(Fig.3)に結合する BChl *b* の弱酸性条件下での構造変換についても報告する。

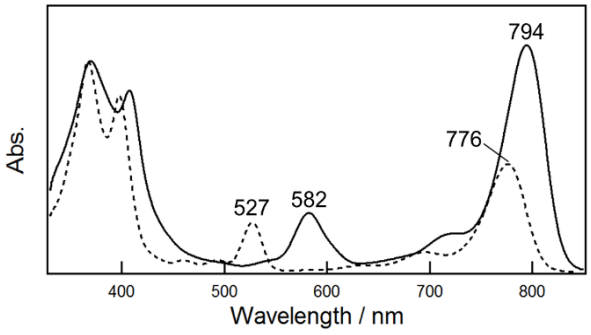


Fig.2. Electronic absorption spectra of BChl *b* (solid curve) and BPhe *b* (broken curve).

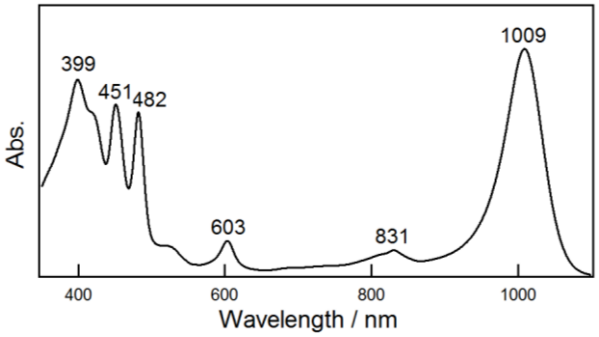


Fig.3. Electronic absorption spectrum of LH1-RC complex of *Blc. viridis*.

抗酸化酵素 Cu, Zn-SOD の活性部位に類似した構造を多数有する抗酸化ナノザイムの開発

○中原寛樹・岡村麻美・野村章子・小寺政人・人見穣（同志社大院理工）

Development of antioxidant nanozymes with numerous coordination sites similar to the active site of antioxidant enzyme Cu,Zn-SOD (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) NAKAHARA, Hiroki; OKAMURA, Mami; NOMURA, Akiko; KODERA, Masahito; HITOMI, Yutaka

スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)は，スーパーオキシドアニオンラジカルを不均化($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$)し，抗酸化防御に重要な役割を果たす金属酵素である．SOD の投与は酸化ストレスを抑制し，消化器疾患や神経疾患などの緩和に利用される．しかし，SOD の安定性は低く，臨床利用が進んでいない．そのため，SOD 機能モデル錯体が広く研究されてきた．しかし，これまでの SOD 機能モデル錯体の活性は，SOD 酵素に比べて低い．

一つのナノ粒子内に多数の SOD 活性部位を導入できれば，全体として優れた SOD 活性を示すと考えた．本研究では，2-メチルイミダゾールと亜鉛イオンから構成される金属有機構造体 ZIF-8 の亜鉛イオンの一部を銅イオンで置換した Cu-doped ZIF-8 に着目した[1]．2 つの亜鉛イオンがアニオン状態にある 2-メチルイミダゾレートによって架橋されることで形成される ZIF-8 の亜鉛イオンの一部を銅イオンに置換することで，酵素 SOD の中でも最も活性な Cu,Zn-SOD の活性中心と類似の構造となる(Fig. 1)．また，ZIF-8 は多孔質材料であることから，スーパーオキシドアニオンラジカルが Cu-doped ZIF-8 内部にも拡散することが期待できる．

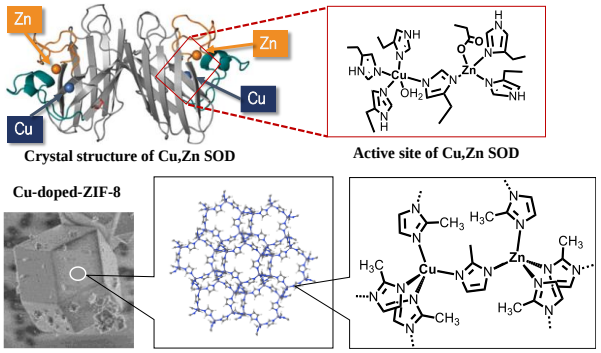


Figure 1. Comparison of the active sites of Cu,Zn SOD, and Cu-doped-ZIF-8.

0:100 から 50:50 までの任意のモル比の酢酸銅と硝酸亜鉛を含むメタノール溶液と 2-メチルイミダゾールのメタノール溶液を 50 度で混合静置し，6 時間後，濾過により生成した固体を回収した．SEM, XRD により ZIF-8 微粒子の合成を確認した．また，銅イオンの置換率を，ICP-AES により評価した．次に，キサンチンオキシダーゼ/キサンチン系で生成される O_2^-によってシトクロム *c* が還元されるシトクロム *c* 法を用いて SOD 活性を評価した．

ICP-AES 測定の結果，仕込んだモル比を反映した割合で，銅イオンを含む，Cu-doped ZIF-8 が合成できることが判明した．SOD 活性を評価した結果，期待通り，Cu-doped ZIF-8 ナノ粒子は SOD 活性を示した．Cu の割合の増加とともに活性が向上したことから，期待した通りに Cu サイトが O_2^-の不均化に働いていると言える．粒子単位の Cu-doped ZIF-8 の SOD 活性と 1 分子の SOD の活性を比較すると，Cu-doped ZIF-8 の方が格段に優れていることが分かった．また，SOD 活性は Cu-doped ZIF-8 の粒子径に依存しなかった．これは，ZIF-8 が有する多孔性のために，O_2^-がナノ粒子内を十分に拡散できるためだと考えている．

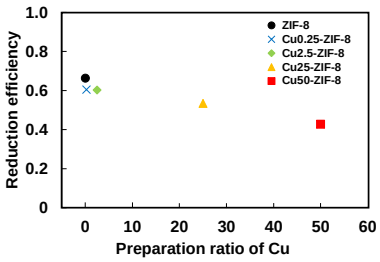


Figure 2. Inhibition of the cytochrome *c* reduction in the presence of ZIF-8 and Cu-doped ZIF-8 prepared with various Cu/Zn ratio. The X-axis stands for the Cu ratio used for the preparation of the ZIF-8 derivatives.

1) N. Nagarjun and A. Dhakshinamoorthy, *New J. Chem.*, **2019**, 43, 18702.

©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

多量化するヒト触媒抗体軽鎖の会合挙動

○酒井 隆裕[1]・Wahyu Fitriana[1]・真島 剛史[1]・小林 直也[1]・一二三 恵美[2]・宇田泰三[3]・廣田 俊[1]（[1]奈良先端大先端科技物質、[2]大分大全学研究推進機構、[3]九州先端研ナノテク）

Studies on association of a human catalytic antibody light chain that oligomerizes (Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology[1], Research Promotion Institute, Oita University[2], Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies[3]) SAKAI, Takahiro[1]; WAHYU, Fitriana[1]; MASHIMA, Tsuyoshi[1]; KOBAYASHI, Naoya[1]; HIFUMI, Emi[2]; UDA, Taizo[3]; HIROTA, Shun[1]

抗体の中には分子認識能に加え、酵素のように抗原を分解する触媒能を有している抗体酵素が存在する。抗体酵素は、酵素と抗体の利点を併せ持つ新規生体触媒として活用が期待されているが、酵素に比べて触媒能が低いという問題がある。抗体酵素の触媒能の改善を試みた研究として、軽鎖部分のみで高い触媒活性を示すものや[1]、軽鎖部分が多量化することで触媒活性が向上したもの[2]が報告されている。一方、酵素活性を有すると考えられているヒト抗体酵素軽鎖#4 は多量化することが示唆されている (Fig 1) 。そこで本研究では、抗体軽鎖#4 の多量化機構の解明を目指し、重鎖の Cys 残基とジスルフィド結合を形成する Cys 残基を Ala に置換した抗体軽鎖#4C220A を調製し、その多量化会合挙動を調べた。

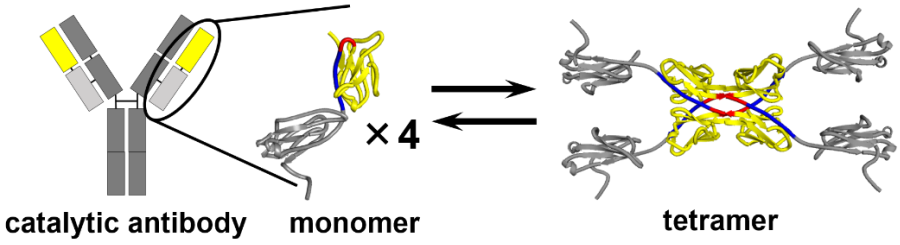


Fig 1. Scheme diagram of equilibrium between monomeric and tetrameric forms of catalytic antibody light chain #4C220A.

抗体軽鎖#4C220A は組み換え大腸菌を用いて発現させ、Ni NTA アフィニティーカラムクロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）で精製した。SEC による分析より、25 °C で抗体軽鎖#4C220A の濃度が 300 μM のとき 4 量体と単量体間の比率が 96:4 で a、溶液を希釈して濃度を 6 μM にすると 4 量体と単量体の比率が 41:59 となった。6 μM の溶液を再度 300 μM に濃縮すると 4 量体と単量体の比率が 96:4 となり、4 量体と単量体間で平衡が成り立つことが明らかになった。25 °C で 4 量体から単量体への解離平衡定数を求めると、2.8×10^{-16} (M^3) と算出された。

次に、4～45°C での抗体軽鎖の解離平衡定数の変化より、熱力学的パラメーターを算出した[3]。温度上昇に伴い、4 量体から単量体へ解離する際の標準エンタルピー変化量が増大し (Fig 2) 、抗体軽鎖#4C220A は疎水的相互作用により 4 量体を形成することが示唆された。また、4 量体から単量体への解離速度は、温度が上昇するにつれて速くなった。一方、いずれの温度においても通常のタンパク質複合体と比較して解離速度が非常に遅かったことから、4 量体の解離は大きな構造変化を伴って起こることが示唆された。

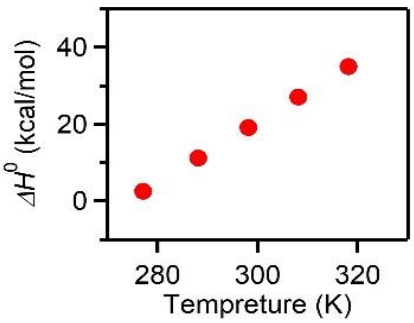


Fig 2. Plots of $\Delta H°$ vs. temperature for the dissociation of #4C220A tetramer to monomers.

1) E. Hifumi, Y. Okamoto, T. Uda, *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *88*, 323-327.
2) V. Sharma, W. Heriot, K. Trisler, V. Smider, *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33079-33087.
3) W. Wilcox and D. Eisenberg, *Protein Sci*. **1992,** *1* 641-653.

細胞表面指向型ダブルクリック試薬の開発

○北川浩平[1]・吉永萌華[1]・寺正行[1]（[1]東農工大院工）

Double Click Reagent Directed to Cell Surface (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1]) KITAGAWA, Kohei[1]; YOSHINAGA, Moeka[1]; TERA, Masayuki[1]

生体直交反応の一つである歪み促進型アジド–アルキン付加環化反応 (SPAAC) は、生体分子の化学修飾に用いられる。生体直交反応では、低濃度の標的分子を短時間で修飾する必要があるため高い反応速度が求められ、SPAAC においては歪みアルキンの環構造や電子状態に着目した構造展開が行われてきた。しかし、歪みアルキンの反応性の高さは基質の安定性や化学選択性とトレードオフであり、例えばチオール-イン反応[1)]との競合がしばしば問題となる。一方、修飾分子の分子量を低下させ反応効率を上昇する方法として、2 価の歪みアルキンであるジベンゾシクロオクタジイン (CODY) を用いた、アジド 2 分子の連結反応が報告されている[2)]。CODY による 2 段階のアジド連結反応は k_{1st} が律速であり、k_{2nd} は非常に大きいという特徴をもつ[3)] (Fig. 1A)。しかし本手法は、CODY 自体の化学的安定性および水溶性が低いことが生体分子への応用において課題となっていた。当研究室ではこれまで、CODY にエーテル基を介して様々な極性官能基を導入し水溶性を向上した WS-CODY 誘導体を合成しており、これらはチオール存在下でも副反応を惹起しないことを報告している[4)]。そこで本研究では、WS-CODY の側鎖に標的に対する親和性を付与することで、基質の安定性を保持し、k_{1st} を向上させることを試みた。

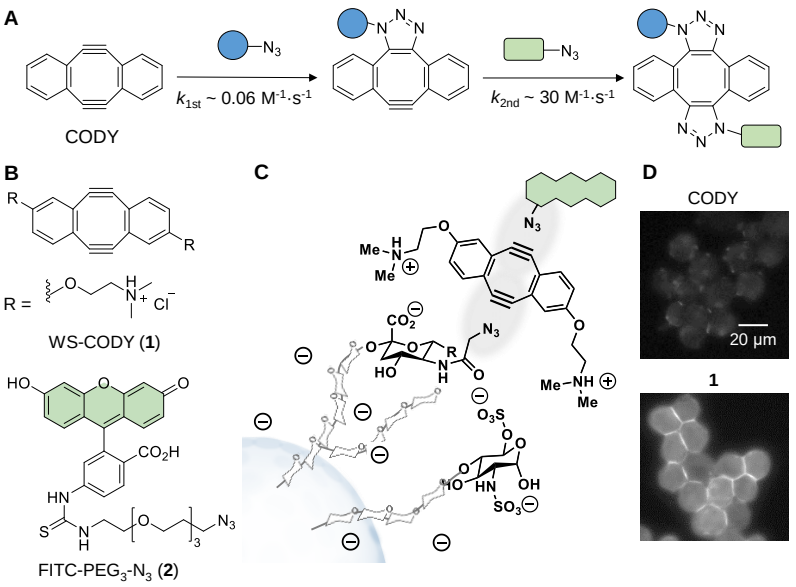


Fig. 1 (A) Double SPAAC reaction by CODY. (B) Chemical structure of WS-CODY (**1**) and FITC-PEG$_3$-N$_3$ (**2**). (C) Schematic illustration of cell-surface directing click reaction. (D) Fluorescent imaging of azido labelled PC-9 cells stained with CODY or **1** and **2**.

細胞表面の化学修飾は、細胞治療における疾患部位指向性の向上や、再生医療における細胞接着技術への応用が期待できる。細胞表面にはシアル酸やヘパラン硫酸が多く負に帯電しており、その対イオンとなる、カチオン性側鎖を有する WS-CODY (**1**) を設計、合成した (Fig.1 B, C)。アジド化糖（Ac$_4$ManNAz）をヒト肺癌由来細胞株である PC-9 に添加培養し、細胞表面糖鎖をアジド基で代謝的ラベル化した[5)]。アジド標識した PC-9 細胞に対し、CODY または **1** を作用させ、FITC-PEG$_3$-N$_3$ (**2**) を逐次的に作用させたところ、特に **1** を用いた時に細胞表面に強い蛍光が観察された (Fig.1 D)。これは静電相互作用により **1** の細胞表面に対する k_{1st} が大幅に向上したためだと考えた。そこで、**1** と **2** をアジド標識 PC-9 細胞に対して同時に作用させたところ、2 分以内での細胞表面修飾に成功した。

1) R. Van Geel, G. J. M. Pruijn, F. L. Van Delft, W. C. Boelens, *Bioconjug. Chem.*, **23**, 392–398 (2012)
2) I. Kii, A. Shiraishi, T. Hiramatsu, T. Matsushita, H. Uekusa, S. Yoshida, M. Yamamoto, A. Kudo, M. Hagiwara, T. Hosoya, *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 4051–4055 (2010)
3) D. A. Sutton, V. V Popik, *J. Org. Chem.*, **81**, 8850–8857 (2016)
4) M. Tera, Z. Harati Taji, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 15405–15409 (2018)
5) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science*, **287**, 2007–2010 (2000)

©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

膜融合によるエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの細胞内侵入

○古川寛人[1]・稲葉央[1]・佐々木善浩[2]・秋吉一成[2]・松浦和則[1]（[1]鳥取大院工、[2]京大院工）

Invasion of enveloped artificial viral capsid into cells via membrane fusion (Graduate School of Engineering, Tottori University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2]) FURUKAWA, Hiroto[1]; INABA, Hiroshi[1]; SASAKI, Yoshihiro[2]; AKIYOSHI, Kazunari[2]; MATSUURA, Kazunori[1]

コロナウイルス・HIV などのエンベロープ型ウイルスは、ヌクレオキャプシドがエンベロープと呼ばれる脂質二分子膜に覆われた構造をとる。また、HIV は宿主細胞内へ膜融合を介して侵入することが知られている。一方当研究室では、トマトブッシースタントウイルスの正 12 面体内部骨格形成に関与する 24 残基β-Annulus ペプチド(INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS)が水中で自発的に自己集合し、30-50 nm の中空ペプチドナノカプセル(人工ウイルスキャプシド)を形成することを見出している[1)]。また、人工ウイルスキャプシド内部へのゲスト分子の内包や、機能性分子の表面修飾にも成功している[2)]。最近我々は、アニオン性表面を有する人工ウイルスキャプシドとカチオン性脂質を含む脂質二分子膜の複合化により、エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの構築に成功した[3)]。本研究では、エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの細胞内取込挙動を検討した。

キャプシド部分を TAMRA、DOTAP/DOPC からなる脂質二分子膜部分を NBD で蛍光修飾したエンベロープ型人工ウイルスキャプシドを構築した。これをヒト肝癌由来細胞 HepG2 細胞へ導入し、CLSM 観察した結果、キャプシド単体や DOPC のみで複合化させたエンベロープ型キャプシドに比べ、細胞導入効率の大幅な向上が確認された(Fig. 3A)。また、細胞内取込の経時変化及び蛍光プロファイルにより、DOTAP/DOPC で被覆されたエンベロープ型キャプシドは膜融合を介して、ペプチド部分のみが細胞内部に取り込まれる興味深い現象が観察された(Fig. 3B,C)。これらの結果は、エンベロープ型人工ウイルスキャプシドが HIV と同様の細胞内侵入挙動を示し、DDS 材料として応用できることを示唆している。

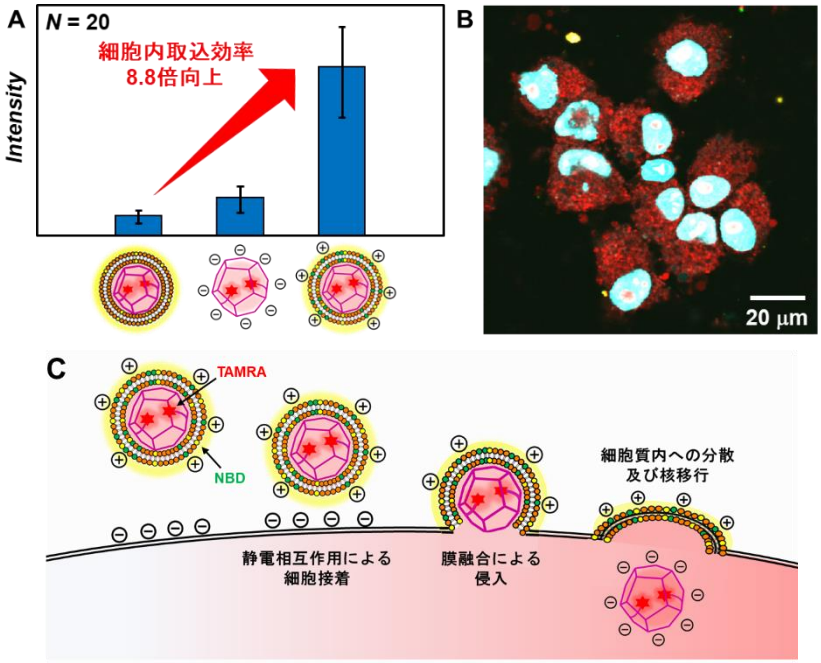


Fig 3. 蛍光修飾エンベロープ型キャプシドの(A)細胞内取込評価及び(B) CLSM 像、(C)膜融合を介した細胞内部への取込過程の模式図

1) K. Matsuura, K. Watanabe, K. Sakurai, T. Matsuzaki, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9662 (2010)
2) K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **54**, 8944 (2018)
3) H. Furukawa, H. Inaba, F. Inoue, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **56**, 7092 (2020)

©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

ポリマー被覆したパーフルオロカーボン内包ナノ粒子型 ^{19}F MRI 造影剤の開発

○小西祐輝[1)]、杉原文徳[2、3)]、蓑島維文[1)]、長池航[4)]、内橋貴之[4)]、菊地和也[1、2、5)]（[1)] 阪大院工、[2)] 阪大 IFReC、[3)] 阪大微研、[4)] 名大院理、[5)] 阪大 QIQB）

Development of Perfluorocarbon-encapsulated Polymer Nanoparticle as ^{19}F MRI Contrast Agents

(Graduate School of Engineering[1], Immunology Frontier Research Center[2], Research Institute for Microbial Diseases[3], Osaka University, Graduate School of Science, Nagoya University[4], Center for Quantum Information and Quantum Biology[5], Osaka University) KONISHI Yuki[1]; SUGIHARA Fuminori[2, 3]; MINOSHIMA Masafumi[1]; NAGAIKE Wataru[4]; UCHIHASHI Takayuki[4]; KIKUCHI Kazuya[1, 2, 5]

MRI は核磁気共鳴現象を利用した画像化法で生体深部を非侵襲的に画像化することができる。中でも ^{19}F MRI は高感度の NMR 測定が可能で、生体内にほとんど存在しない ^{19}F を観測核種としている。そのため、水や脂肪などの生体分子由来のシグナルの影響を受けず、^{19}F MRI 造影剤の局在をイメージングすることができる。我々はこれまでに ^{19}F MRI 造影剤としてパーフルオロカーボン内包シリカナノ粒子を開発してきた[1]。このシリカナノ粒子は生体内でも高い感度を示し、その局在を ^{19}F MRI によって検出することが可能である。しかし、シリカナノ粒子をマウスに投与すると、目的組織ではない肝臓や脾臓から ^{19}F MRI シグナルが 2 週間以上にわたって観察され、ナノ粒子が体内に蓄積していると考えられた。長期間の蓄積は慢性的な炎症や発がんなどの副作用を引き起こす危険性がある。近年、ポリマーソームやナノゲルなどソフトなナノ粒子はがん組織での透過性が高いことが報告されており[2]、他の組織においても組織透過性が高いことが期待される。そこで本研究では、長期間の蓄積を抑制するため、シリカではなくソフトな材料であるポリマーで表面を被覆したナノ粒子（ポリマーナノ粒子）型 ^{19}F MRI 造影剤の開発を行った。

パーフルオロカーボンである PFCE を内包したミセル表面をポリアクリル酸で被覆し、水和径 160 nm 程度のポリマーナノ粒子型造影剤を作製した。^{19}F NMR を用い、溶液状態の PFCE と粒子に内包された PFCE の横緩和時間（T_2）を比較した。その結果、粒子内の PFCE は流動性を保持していることが分かった。また、高速 AFM（Atomic Force Microscopy）を用いた測定の結果、ポリマーナノ粒子は柔らかく、弾性を有していることが分かった。

今回開発したポリマーナノ粒子と従来のシリカナノ粒子の肝臓への蓄積量を同一個体のマウスで比較するためにマルチカラー^{19}F MRI[3]を行った。ポリマーナノ粒子由来のシグナルを赤色、シリカナノ粒子由来のシグナルを青色でそれぞれ示した（右図）。肝臓におけるシリカナノ粒子の蓄積量は投与後 2 週間でもほとんど変化が見られなかった。一方、ポリマーナノ粒子では投与後 1 週間で、肝臓からのシグナル強度が 10% 程度まで減少した。これにより、ナノ粒子型造影剤における体内への長期間にわたる蓄積を抑制することができた。

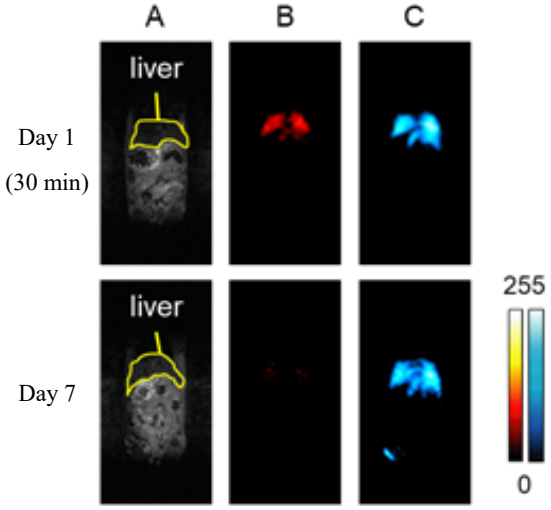


図 造影剤を投与したマウスの MR 像
A: ^{1}H MRI, B: ^{19}F MRI (ポリマーナノ粒子),
C: ^{19}F MRI (シリカナノ粒子)

【参考文献】[1] H. Matsushita *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2014**, *53*, 1008. [2] Y. Hui *et al*, *ACS Nano.,* **2018**, *12*, 2846. [3] K. Akazawa *et al*, *Angew. Chem*. *Int. Ed.*, **2018**, *57*, 16742.

抗酸化剤を結合した(ヘモグロビン–アルブミン)クラスターの合成

○石丸真里花・山田大雅・小松晃之（中央大理工）

Synthesis of Hemoglobin-Albumin Cluster Incorporating Antioxidant Reagents (Faculty of Science and Engineering, Chuo University) ISHIMARU, Marika; YAMADA, Taiga; KOMATSU, Teruyuki

少子高齢化に伴う献血者層人口の減少により、輸血液不足が懸念され始めている。当研究室では、酸素輸送タンパク質であるヘモグロビン(Hb)の分子表面に血漿タンパク質であるヒト血清アルブミン(HSA)を結合した(ヘモグロビン–アルブミン)クラスター(Hb-HSA_3)を合成し、それが生体内で酸素輸送のできる人工酸素運搬体(赤血球代替物)として機能することを明らかにした[1]。しかし、人工酸素運搬体の Hb 部位は生体内で徐々に自動酸化し、酸素輸送能を失う。一方、HSA は様々な疎水性物質を貯蔵・運搬する多分子結合能を持つ。もし、Hb-HSA_3 の HSA 部位に抗酸化剤を結合できれば、長時間の酸素輸送が可能な人工酸素運搬体となる。本研究は、Hb-HSA_3 に抗酸化能を有する Fe(III) protoporphyrin(FePP)、bilirubin(BR)、α-tocopherol(TOC)を担持した Hb-$(HSA\text{-}X)_3$［X = FePP, BR, TOC］を合成し、その酸素錯体安定性を明らかにすることを目的とした。

Hb 溶液に架橋剤 *N*-succinimidyl 3-maleimidopropionate(SMP)を反応させ、ゲルろ過クロマトグラフィーにより未反応の SMP を除去した後、HSA と結合させることで Hb-HSA_3 を合成した。陰イオン交換クロマトグラフィーにより未反応の HSA を除去し、Hb-HSA_3 を単離した。次に、Hb-HSA_3 に 3 倍モル量の FePP を滴下し、Hb-$(HSA\text{-}FePP)_3$ を調製した(Fig. 1)。FePP 結合前後の差スペクトル(UV-vis.スペクトル)が HSA-FePP と一致したことから、Hb-HSA_3 の HSA 部位に FePP が結合していることを明らかにした。同様に Hb-$(HSA\text{-}BR)_3$、Hb-$(HSA\text{-}TOC)_3$ を調製し、HSA 部位への結合を確認した。

過酸化水素(H_2O_2)を含むリン酸緩衝生理食塩水中(pH 7.4, 25 °C)における Hb-$(HSA\text{-}X)_3$ の酸素錯体安定性を測定した。生体内の H_2O_2 濃度は 0～35 μM であるため[2]、10 μM H_2O_2 水溶液中における酸素錯体安定性を評価した。Hb-$(HSA\text{-}FePP)_3$ の Hb 酸化率(metHb 率、2 hr 後)は 19%であり、Hb の酸化率(38%)の 1/2、Hb-HSA_3 の酸化率(30%)の 2/3 に減少した(Fig. 2)。一方、Hb-$(HSA\text{-}BR)_3$ と Hb-$(HSA\text{-}TOC)_3$ の酸素錯体安定性は Hb-HSA_3 と変わらなかった。HSA-FePP は H_2O_2 不均化触媒として機能することから、Hb-$(HSA\text{-}FePP)_3$ の $(HSA\text{-}FePP)_3$ 部位が中心 Hb の酸化を抑制していると考えられる。以上の結果から、Hb-$(HSA\text{-}FePP)_3$ が抗酸化能を有する人工酸素運搬体となることを明らかにした。

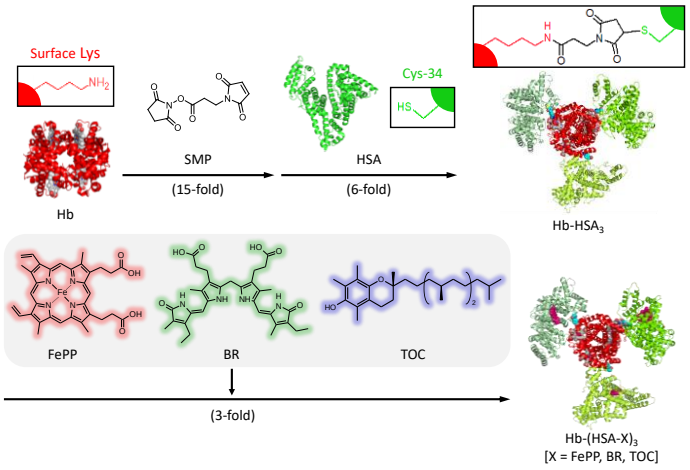


Fig. 1 Synthetic scheme of Hb-$(HSA\text{-}X)_3$ [X = FePP, BR, TOC].

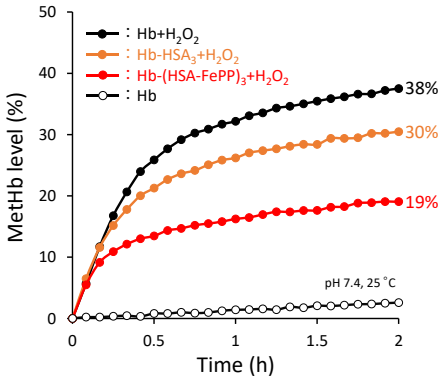


Fig. 2 Time course of metHb level of Hb-$(HSA\text{-}FePP)_3$ ([Hb]=10 μM, pH7.4, 25°C).

1） T. Komatsu *et al.*, *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 1139.
2） B. Haliwell *et al.*, *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 10.

MCA/GCM 法に基づく尿路上皮がん由来の血中循環腫瘍細胞の解析

○中澤胡桃[1]・根岸諒[1]・桶川隆嗣[2]・中村雄[2]・出来真弓[2]・渡邊碧[1]・田中剛[1]・吉野知子[1]
（[1]東京農工大院工、[2]杏林大医学部付属病院泌尿器科）

Analysis of circulating tumor cells in bloods derived from patients with urothelial carcinoma based on MCA/GCM method (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1], Department of Urology, Kyorin University School of Medicine[2]) NAKAZAWA, Kurumi[1]; NEGISHI, Ryo[1]; OKEGAWA Takatsugu[2] NAKAMURA Yu[2]; DEKI Mayumi[2]; WATANABE Midori[1]; TANAKA Tsuyoshi[1]; YOSHINO Yomoko[1]

尿路上皮がんは患者間・腫瘍間での不均一性が高く、再発が多いことから死亡率の高いがん種である。近年、がん組織の遺伝子変異解析が薬剤選択に有用であることが示され、低侵襲に採取可能な組織代替試料として、血液中に存在する血中循環腫瘍細胞 (CTC) が期待されている。一方で、尿路上皮がんは従来法である CellSearch System による CTC の検出率が低く、他がん種と比較して CTC の遺伝的特徴に関する知見が得られていない。当研究室では細胞サイズ・変形能に基づく CTC 濃縮・検出技術として Microcavity array (MCA)法と単一細胞をハイドロゲルに包埋することで迅速かつ簡便に分離可能な Gel-based cell manipulation (GCM)法を開発してきた [1)]。本研究では、尿路上皮がん患者を対象に MCA/GCM 法により末梢血中の CTC を濃縮・検出及び単一細胞の分離を行い、CTC の遺伝子変異解析への利用性を検討した。

モデルサンプルとしてヒト尿路上皮がん由来細胞(T24)を健常者血液 1 ml に懸濁したもの、臨床サンプルとして尿路上皮がん患者血液を使用した。当研究室で開発した MCA を用いて血液サンプル (1 ml)をフィルトレーションし、細胞を MCA 上に捕捉した後、捕捉した細胞を DAPI、抗サイトケラチン (CK)抗体、及び抗 CD45 抗体にて染色した。蛍光顕微鏡にて観察を行った結果、蛍光パターンにより CTC (DAPI+、CK+、CD45-)と白血球(DAPI+、CK-、CD45+)を識別することが可能であった (Fig. 1)。また、転移症例を中心に CTC と白血球が複数凝集したクラスターも検出された。転移症例においては全ての症例で CTC またはクラスターが検出されており、検出率は従来法を用いた過去の報告例と比較して高かった。さらに、近年の膵臓がん症例にて報告されている CD45 陽性及び CK 陽性の CTC も検出された (Fig. 1)。以上のことから、MCA 法が尿路上皮がん CTC の検出に有効であることが示された。次に、検出された MCA 上の CTC に対し、GCM 法による単一細胞分離を行った。分離した細胞に対して全ゲノム増幅を行った後、細胞株では T24 細胞株特有の遺伝子変異 (*TP53* c.378 C>G)を単一細胞レベルで確認することが出来た。また、CTC では尿路上皮がん組織にみられる 14 遺伝子変異解析を実施した。以上より、MCA/GCM 法を用いて転移性及び非転移性の尿路上皮がん患者から CTC の検出と遺伝子変異解析が可能であった。

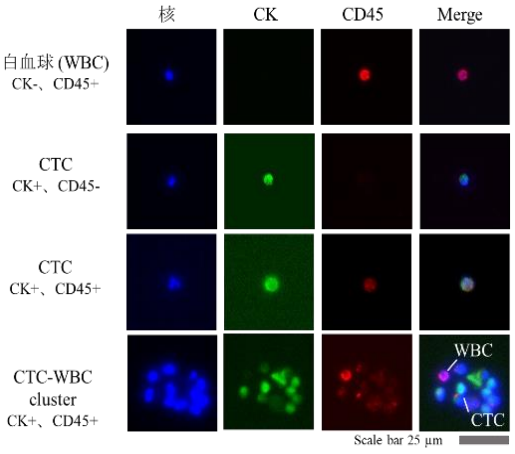


Fig. 1 Fluorescent images of antibody-labeled single WBC, CTC (CD45-), CTC (CD45+) and cluster entrapped on the MCA from whole blood in an urothelial carcinoma patient.

1) T. Yoshino et al., *Anal. Chem.*, 88, 7230-7237 (2016)

©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

Poster(first day)

Wed. Sep 8, 2021 5:50 PM - 6:50 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 8:50 AM - 9:50 AM UTC | First half number Zoom

Even (1P-002~1P-048)

[1P-002] Development of CpG methylation level measurement system using Methyl-CpG-binding domain fused luciferase

*Ayano Goto[1], Wataru Yoshida[1] (1. Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology)

[1P-004] In Cell analysis of protein-protein interaction accompanied by cluster formation by Yn-designed peptides

*Masahiro Hashimoto[1], Takayuki Miki[1], Taichi Nakai[1], Hisakazu Mihara[1] (1. Tokyo Institute of Technology, School of Life Science and Technology)

[1P-006] *In silico* design of growth factors with modulated agonistic activity

*Hanrui Liu[1], Daisuke Kuroda[1], Ryosuke Ueki[1], Shinsuke Sando[1] (1. The University of Tokyo)

[1P-008] Development of antimicrobial peptide foldamers introducing non-proteinogenic amino acids

*Motoharu Hirano[1,2], Chihiro Saito[3], Ryuji Kawano[3], Takashi Misawa[2], Yosuke Demizu[1,2] (1. Grad. Sch. Med. Life. Sci., Yokohama city Univ., 2. NIHS, 3. Dept. Biotech. Life Sci., Tokyo Univ. Agr. Tech.)

[1P-010] Structural stabilization of microtubules by photocrosslinking of a Tau-derived peptide

*Soei Watari[1], Hiroshi Inaba[1], Arif Md. Rashedul Kabir[2], Akira Kakugo[2], Kazuki Sada[2], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Science, Hokkaido University)

[1P-012] Extended JAZ degron sequence for plant hormone binding in jasmonate co-receptor of tomato

*Misuzu Nakayama[1], Rina Saito[2], Kengo Hayashi[1], Haruna Nomoto[1], Yousuke Takaoka[1], Hiroaki Saito[3], Souhei Yamagami [2], Toshiya Muto[1], Minoru Ueda[1,2] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University)

[1P-014] Structure analysis of intrinsically disordered protein using in vivo protein crystal

*Mariko Kojima[1], Satoshi Abe[1], Takafumi Ueno[1] (1. Life science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[1P-016] Development of lasso grafted Venus-based CD24—Siglec-10 immune checkpoint inhibitor

*Wei-En Huang[1], Naohiro Terasaka[1], Hiroaki Suga[1] (1. Faculty of Science, The University of Tokyo)

[1P-018] Analysis of interaction site between Dicer-PAZ/Platform and dsRNA by using photo crosslink reaction

*Shunya Suzuki[1], Noriko Yokota[1], Hiroki Tsuda[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Engineering of Biomolecular, Nagoya University)

[1P-020] Control the AMPA-Type Glutamate Receptor Activity Utilizing the Molecular Stopper Approach

*Yuta Deen Miura[1], Kento Ojima[2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-022] Directed Evolution and Structure Analysis of P450BM3 Utilizing Natural Products as Decoy Molecules

*Yuya Yokoyama[1], Masayuki Karasawa[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Hiroshi Sugimoto[2,3], Osami Shoji[1,2] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. JST CREST, 3. RIKEN Spring-8)

[1P-024] Structural Effects of Conjugation between Thiol and Functional Groups on Accelerating Oxidative Protein Folding

*Shunsuke Okada[1], Motonori Matsusaki[2], Masaki Okumura[3], Takahiro Muraoka[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. IAMS, Tokushima University, 3. FRIS, Tohoku University, 4. GIR, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[1P-026] Improvement of the translation efficiency with a Ser/Leu-swapped genetic code by using native and *in vitro* transcribed tRNAs

*Tomoshige Fujino[1], Masahiro Tozaki[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[1P-028] Reversible control of lipid metabolism in living cells by chemogenetic membrane contact manipulation

*Masaru Yoshikawa[1], Moeka Ajiki[2], Fubito Nakatsu[3], Shinya Tsukiji[1] (1. Department of Nanopharmaceutical science, Nagoya Institute of Technology, 2. Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 3. Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University)

[1P-030] Development of Fixation-driven Chemical Crosslinking Probes for Pharmacokine- tic Analysis in Brain

*Akihiro Tsushima[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[1P-032] Construction of a fusion protein consisting of a PET hydrolase and an adhesive protein

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

[1P-034] Development of inkjet system-based intracellular delivery technology using cell-penetrating peptides

*Mika Omura[1], Ikuhiko Nakase[1,2] (1. College of Life, Environment, and Advanced Sciences, Osaka Prefecture University, 2. Graduate School of Science, Osaka Prefecture University)

[1P-036] Synthesis of A Peptide-Based Drug Carrier for Facilitating Endosomal Escape by Fusogenic Sequence

*Shogo Hirota[1], Takahito Imai[1], Yamasaki Masayuki[1], Tomizaki Kin-ya[1] (1. Ryukoku University)

[1P-038] Synthesis of Gold Nanorods Modified with Mitochondrial Targeting Signal Peptides

*Shoya Nakamura[1], Takahito Imai[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[1P-040] Preparation of Hydrogel Containing a Protein Unit Modified by Two Different Fluorophores

*Hiroki Innami[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[1P-042] Condensation of Antibodies and Macromolecule Delivery Peptides into Liquid Droplets by Liquid-Liquid Phase Separation and Intracellular Delivery of Antibodies

*Takahiro Iwata[1], Hisaaki Hirose[1], Kentarou Sakamoto[1], Yusuke Hirai[1], Jan Vincent V. Arafiles[1], Misao Akishiba[1], Miki Imanisi[1], Shiroh Futaki[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[1P-044] Mechanistic Study of Irreversible Inhibition of Reverse Transcriptase with 2'-β-propargyl-seleno Nucleoside Analogue

*Yuki Yoshida[1], Yushi Nimi[1], Daichi Fushihara[1], Hirotaka Murase[1], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,2,3] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University, 2. JST CREST, 3. iGCORE)

[1P-046] Pursuit of shorten and stability of Staple oligomer for application to a nucleic acid medicine

*Tomoki Kida[1], Yousuke Katsuda[1], Takuto Kamura[1], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[2], Shin-ichi Sato[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[1P-048] Improvement of the method for preparing super-giant liposomes to construct a giant artificial cell capable of efficient gene expression in the interior

*Hajime TAKAHASHI[1], Atsushi OGAWA[1] (1. Proteo-Science Center, Ehime University)

Methyl-CpG-binding domain 融合 Luciferase を用いた CpG 特異的メチル化レベル測定法の開発

○後藤 綾乃・吉田 亘（東京工科大院バイオニクス）

Development of CpG methylation level measurement system using Methyl-CpG-binding domain fused luciferase (Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology) GOTO, Ayano; YOSHIDA, Wataru

DNA メチル化とは主にシトシン・グアニン塩基(CpG)配列中のシトシンの 5 位がメチル化される反応であり、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている。正常な細胞では正常なメチル化パターンが形成されているが、がん細胞では異常なメチル化パターンが形成されているため、これはがんのバイオマーカーとして利用できる。がん細胞における異常なメチル化パターンの特徴として、①遺伝子特異的なメチル化状態の異常と、②ゲノム DNA 全体のメチル化レベルの低下があげられる。本研究室ではこれまでに、Methyl-CpG-binding domain (MBD)と Firefly Luciferase (Fluc)の融合蛋白質(MBD-Fluc)を構築し、これを用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法を開発した [1,2]。これは MBD-Fluc と DNA インターカレーターで起こる生物発光共鳴エネルギー移動を利用した方法である。そこで、本研究では MBD-Fluc を用いて遺伝子特異的なメチル化レベル測定法を開発することを目的とした(Fig.)。想定した原理を以下に示す。メチル化した一本鎖プローブ DNA を固相に固定化し、そこに標的遺伝子をハイブリダイゼーションさせる。標的遺伝子がメチル化されている場合は固相で形成される二本鎖 DNA は両鎖ともメチル化されたフルメチル化状態となる。一方、標的遺伝子がメチル化されていない場合は固相で形成される二本鎖 DNA はプローブ DNA のみメチル化されたヘミメチル化状態となる。MBD はフルメチル化 DNA に特異的に結合するため、結合した MBD-Fluc 量をルシフェラーゼの活性を指標に測定すれば標的遺伝子のメチル化レベルを測定できると想定した。

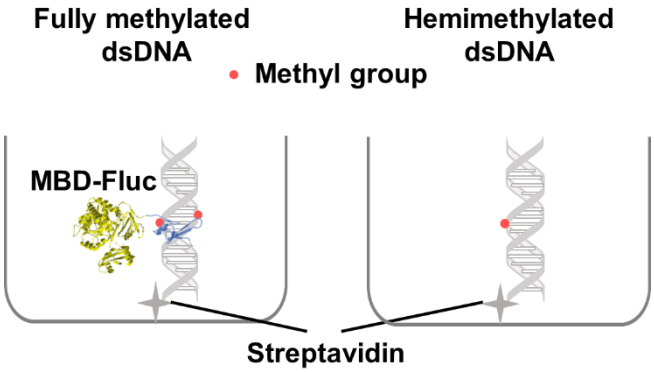


Fig. MBD-Fluc を用いた遺伝子特異的メチル化レベル測定法の原理図

本研究では結腸直腸癌で高度にメチル化されている *SEPT9* を標的遺伝子として用いた。pET30c-*StreptagII-MBD-Fluc* で形質転換した大腸菌 BL21 (DE3)を培養し、OD_{600} = 0.7 の時に 1.2 mM IPTG を添加し、MBD-Fluc の発現誘導を行った。得られた湿菌体を破砕し、水溶性画分を調製し、Strep-Tactin カラムを用いて MBD-Fluc を精製した。精製画分を SDS-PAGE により解析を行った結果、目的の位置付近にバンドが確認されたことから、MBD-Fluc を精製できたことが示された。次に、ビオチン修飾メチル化 *SEPT9* プローブ DNA をストレプトアビジンプレートに固定化した。化学合成したメチル化 *SEPT9* DNA または非メチル化 *SEPT9* DNA をそれぞれ添加し、ビオチン修飾メチル化 *SEPT9* プローブ DNA にハイブリダイゼーションさせた。そこに MBD-Fluc を添加し、洗浄後、発光基質であるルシフェリンを加えルシフェラーゼの活性を測定した。その結果、メチル化 *SEPT9* DNA を添加した場合において高い発光強度が観察された。つまり、本手法によりメチル化 *SEPT9* DNA を検出できることが示された。

1) W. Yoshida, Y. Baba, I. Karube, *Anal. Chem.*, **88**, 9264 (2016)
2) Y. Baba, I. Karube, W. Yoshida, *Anal. Lett.*, **52**, 754, (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

Yn 設計ペプチドによる細胞内でのクラスター形成を伴う蛋白質間相互作用解析

○橋本匡浩[1]・三木卓幸[1]・中井太一[1]・三原久和[1]（[1]東工大生命理工）

In Cell analysis of protein-protein interaction accompanied by cluster formation by Yn-designed peptides

(School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology[1]) HASHIMOTO, Masahiro[1]; MIKI, Takayuki[1]; NAKAI, Taichi[1]; MIHARA, Hisakazu[1]

細胞内のシグナル伝達や液-液相分離などの様々な生理イベントにおいて、蛋白質のクラスター化を契機として生じる蛋白質間相互作用がよく見られる。個々の蛋白質間の相互作用は弱いが、クラスター化により局所的に濃度が高まることで、パートナーと強く相互作用できる。このようなクラスター化と相互作用の関連を解析するためには、「細胞内で Bait 蛋白質を人工的に集積化し、その濃縮率を人為的に変化させ、Prey 蛋白質との結合を評価できる技術」が重要である。当研究室では、細胞内で蛋白質を集積化できる Y15 ペプチドタグ (YEYKYEYKYEYKYEY) を開発し、Y15 を融合した AzamiGreen (Y15-AG) が細胞内で顆粒状の集合体を形成することを見出している [1)]。さらに、Y15-AG の集合体をスキャホールドとし、そこに機能性の蛋白質を Y15 の融合により濃縮することができた。そこで我々は Y15 の鎖長を短縮して相互作用点を減らした 4 つのガイドタグを開発することで、Y15-AG スキャホールドに対するガイドタグ融合 Bait 蛋白質の濃縮率を制御し、Prey 蛋白質との結合を評価できると考えた (図 1)。

本研究では、まず鎖長の異なる 4 つの Yn ペプチド (9,11,13,15 残基) を mCherry に融合し、Y15-AG スキャホールドへの濃縮率を CLSM 観察により評価した。その結果、鎖長依存的に濃縮率が増大し、Yn ペプチドは濃縮率が制御可能なガイドタグとして機能した。また、沈降アッセイや蛍光異方性測定においても、Y15-AG と Yn-mCherry の共集合を示した。

次に、これらのガイドタグを用いて、アダプター蛋白質 Nck (Bait) を異なる濃縮率で集積化させ、その相互作用パートナーである N-WASP 蛋白質 (Prey) との相互作用を CLSM 観察により評価した (図 2A) 。その結果、Nck の濃縮率に比例して、N-WASP がリクルートされた (図 2B)。さらに、Nck の濃縮率が低い Y9 タグ融合 Nck の場合、N-WASP の濃縮率の方が高い傾向にあった (図 2C)。N-WASP がバルクに拡散した Nck よりも、クラスター化した Nck とより強く相互作用することが示された。

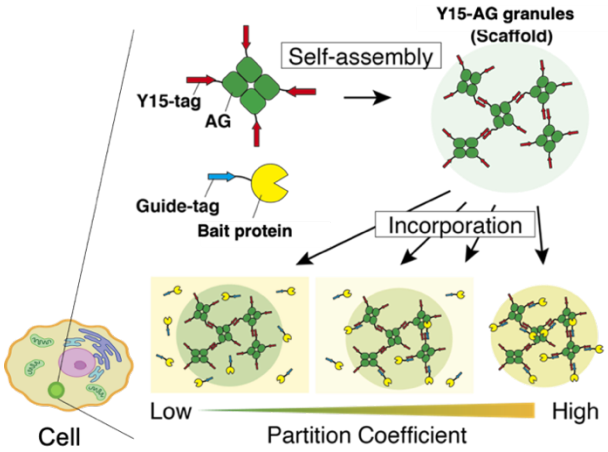


図 1. ガイドタグによる Bait 蛋白質の濃縮率制御の概要図

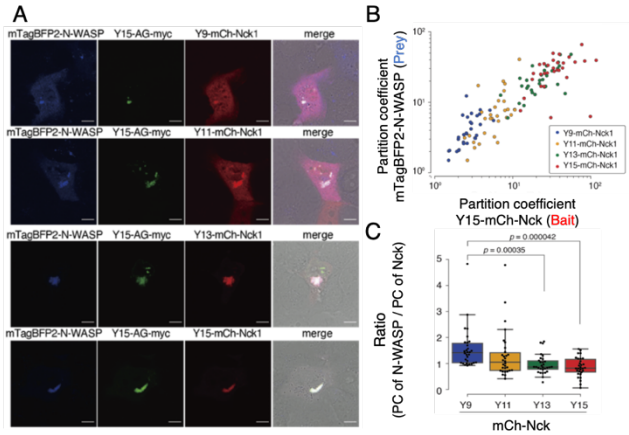


図 2. ガイドタグによる Nck (Bait) の濃縮および N-WASP (Prey) との相互作用解析 (A) Yn-mCh-Nck と mTagBFP2-N-WASP の CLSM 観察 (B) Nck と N-WASP それぞれの濃縮率 (C) Nck と N-WASP の濃縮率の比

[参考文献]
1) T. Miki, T. Nakai, M. Hashimoto, K. Kajiwara, H. Tsutsumi, H. Mihara, *Nat. Commun.*, **12**, 3412 (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

in silico 設計に基づく増殖因子のアゴニスト活性制御

○劉翰睿[1]・黒田大祐[1]・植木亮介[1]・山東信介[1]（[1]東大院工）

***In silico* design of growth factors with modulated agonistic activity** (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1]) LIU Hanrui[1]; KURODA Daisuke[1]; UEKI Ryosuke[1]; SANDO Shinsuke[1]

Cell surface receptors interact with various protein ligands such as growth factors, cytokines, and hormones. These soluble ligands induce or stabilize receptor dimerization, initiating intracellular signal transduction, which regulates various cellular functions like proliferation, differentiation, and immune responses. The cell signaling induced by these ligands plays an essential role in the development and maintenance of cellular activities.[1,2] On the other hand, most of these signaling pathways are also associated with cancer development and metastasis.[3] Therefore, protein ligands that can achieve a designated receptor activation level to lead a desired cellular phenotype hold great promise as safer therapeutics.[4] Approaches to obtain such protein ligands include site-directed mutagenesis and *in vitro* evolution, which were commonly used for altering binding affinity, increasing thermal stability, and improving protein expression level.[5] In recent years, computational methods have also been developed to predict optimal amino acid mutations for desired functions.[6]

In this research, we aim to establish a novel *in silico* design guideline for creating growth factors with controlled signal transduction intensity. To achieve this goal, we used Flex_ddG, one of the methods in the Rosetta macromolecular modeling suite, to computationally estimate binding free energies changes upon introduction of a mutation into a growth factor. Based on the prediction, mutations were introduced at the binding interface between the ligand and the receptor to produce different activation intensities of the receptor. Mutations were also designed at the ligand dimer interface to regulate ligand dimerization efficiency to control the dimerization efficiency of corresponding receptors. In this presentation, I will introduce *in sillico* design of growth factor mutants, the expression and purification of protein ligands, and their characterization *in vitro*.

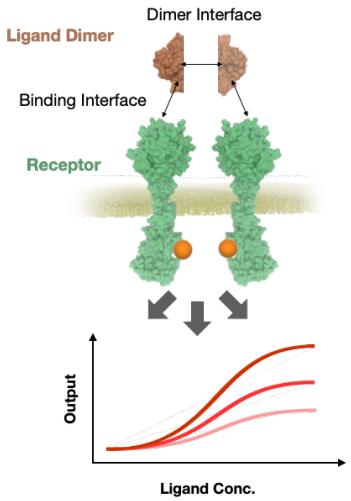


Figure. Fine-tuning of receptor siganling strength through design of protein-protein interface.

1) X. Wang, P. Lupardus, S. L. LaPorte, K. C. Garcia, *Annu. Rev. Immunol*, **27**, 29 (2009).
2) M. Atanasova, A. Whitty, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*, **47**, 502 (2012).
3) M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Cell*, **141**, 1117 (2010).
4) C. C. M. Ho, A. Chhabra, P. Starkl, P. J. Schnorr, S. Wilmes, I. Moraga, H. S. Kwon, N. Gaudenzio, R. Sibilano, T. S. Wehrman, M. Gakovic, J. T. Sockolosky, M. R. Tiffany, A. M. Ring, J. Piehler, I. L. Weissman, S. J. Galli, J. A. Shizuru, K. C. Garcia, *Cell*, **168**, 1041 (2017).
5) D. S. Jones, A. P. Silverman, J. R. Cochran, *Trends in Biotechnology*, **26**, 9 (2008).
6) A. Morin, J. Meiler, L. S. Mizoue *Trends in Biotechnology,* **29**, 4160 (2011).

©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

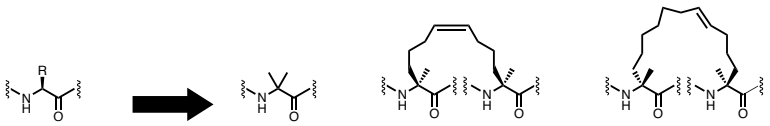
非天然アミノ酸を導入した抗菌ペプチドフォルダマーの開発

○平野元春[1, 2]・齋藤千尋[3]・川野竜司[3]・三澤隆史[2]・出水庸介[1, 2]（[1]横市大院生命医科学、[2]国立衛研、[3]農工大院生命工）

Development of antimicrobial peptide foldamers introducing non-proteinogenic amino acids (Grad. Sch. Med. Life. Sci., Yokohama City Univ.[1], NIHS[2], Dept. Biotech. Life Sci., Tokyo Univ. Agr. Tech.[3]) HIRANO, Motoharu[1, 2]; SAITO, Chihiro[3]; KAWANO, Ryuji[3]; MISAWA, Takashi[2]; DEMIZU, Yosuke[1, 2]

様々な細菌によって引き起こされる感染症には、ペニシリンをはじめ、多くの抗菌薬が発見され使用されてきた。しかし現在では、抗菌薬の長期使用や使用量の増加に伴い、従来の抗菌薬に対する耐性を獲得した薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっており、新規抗菌薬の開発が求められている。そこで注目されているのが、抗菌ペプチド（Antimicrobial Peptides; AMPs）である。AMPs は従来の抗菌薬とは異なり、細菌の細胞膜を直接の作用点とすることから、AMPs に対する耐性を獲得しにくいと考えられている。

AMPs の抗菌活性発現には、ヘリカル構造の形成とカチオン性残基及び疎水性残基が空間的に分離して配置された両親媒性を示すことが重要であることが報告されている[1)]。当研究室ではこれまでに、合理的な設計に基づいた AMPs の開発を行っており、顕著な溶血性を示すことなく強い抗菌活性を示す Magainin 2 誘導体 **17KKV**[2)] 及び両親媒性ヘリカルペプチド **Stripe**[3)]を見出している。そのため、ペプチドのヘリカル構造を安定化することで、さらなる抗菌活性の向上が見込めると考えた。本研究では、**17KKV** 及び **Stripe** をリードとして、非天然アミノ酸を用いてペプチドのヘリカル構造制御を行うことにより、AMPs のさらなる高活性化を目指した。ペプチドのヘリカル構造を安定化させる手法として、α, α-ジ置換アミノ酸（disubstituted amino acid; dAA）の導入やアミノ酸側鎖の架橋化（ステープル）を用いた。具体的には、**17KKV** 及び **Stripe** の疎水性領域に dAA やステープル構造を導入したペプチド **1-4** を設計・合成し、CD スペクトルを用いた二次構造や薬剤耐性菌を含むグラム陽性菌及びグラム陰性菌に対する抗菌活性評価、ヒト赤血球細胞に対する溶血活性評価を行なった[3-5)] (Fig 1)。本発表では、その詳細について報告する。



Peptide	Sequence	MIC (μM)			
		Gram (+)	Gram (-)		
		S.a.	*E.c.*	*P.a.*	MDRP
17KKV	GIKKFLKSAKKFVKAFK	6.25	3.125	1.56	N.D.
1	GIKKFLKSXKKFVKXFK	12.5	3.125	3.125	3.125
2	S8IKKS8LKSAKKFVKAFK	3.125	1.56	1.56	1.56
Stripe	KLLKKAGKLLKKAGKLLKKAG	12.5	3.125	3.125	3.125
3	KLLKKXGKLLKKXGKLLKKXG	3.125	1.56	1.56	1.56
4	KLLKKR8GKLLKKS8GKLLKKAG	25	6.25	12.5	25

S.a.：黄色ブドウ球菌
E.c.：大腸菌， *P. a.*：緑膿菌， MDRP：多剤耐性緑膿菌

Fig 1. 両親媒性ペプチドの設計と抗菌活性

1) H. Yokoo, M. Hirano *et al.*, *ChemMedChem.* **2021**, *16*, 1226-1233.
2) C. Goto, M.Hirano *et al.*, *ChemMedChem.* **2019**, *14*, 1911-1916.
3) T. Misawa, M. Hirano *et al.*, *MedChemComm*. **2019**, *10*, 896-900.
4) M. Hirano *et al.*, *Molecules*. **2021**, *26*, 444.
5) M. Hirano *et al.*, *ChemPlusChem.* **2020**, *85*, 2731-2736.

©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

Tau 由来ペプチドとの光架橋による微小管の構造安定化

○渡宗英[1]・稲葉央[1]・Arif Md. Rashedul Kabir[2]・角五彰[2]・佐田和己[2]・
松浦和則[1]（[1]鳥取大院工、[2]北大院理）

Structural stabilization of microtubules by photocrosslinking of a Tau-derived peptide (Graduate School of Engineering, Tottori University[1], Graduate School of Science, Hokkaido University[2]) WATARI, Soei[1]; INABA, Hiroshi[1]; KABIR, Arif Md. Rashedul[2]; KAKUGO, Akira[2]; SADA, Kazuki[2]; MATSUURA, Kazunori[1]

微小管はチューブリンの重合により形成される内径 15 nm のチューブ状細胞骨格であり、近年微小管に結合して安定化 (脱重合阻害)する薬剤が多数開発されている[1]。抗がん剤である Taxol は、微小管内部の疎水性ポケットに結合することで微小管の構造を安定化し、細胞分裂を抑制する。我々はこれまでに、微小管関連タンパク質 Tau から Taxol と同じ微小管内部ポケットに結合するペプチド TP を開発した[2]。また TP (K_d = 6.0 μM)に比べ環状 TP がチューブリンにより強く結合 (K_d = 0.94 μM)し、微小管を安定化させることを見出している[3]。しかし、TP や環状 TP とチューブリンの結合は可逆的であり、Taxol と比べ微小管安定化能が低いという課題があった。そこで、光反応によって標的タンパク質との間に共有結合を形成する光アフィニティラベル技術に着目した。光アフィニティラベル剤であるジアジリンは UV 光を照射することでカルベンとなり、近接する部位と共有結合を形成する。本研究では TP にジアジリンを導入することで、TP と微小管の光架橋による微小管安定化を試みた。赤色蛍光色素 TMR を修飾した TP (DA-TP-TMR)を合成し、微小管に内包後に UV 光照射を行うことで、チューブリンへの共有結合形成を利用した微小管安定化を試みた (図 1A)。

チューブリンと DA-TP-TMR を複合化後に UV 光を照射し SDS-PAGE の蛍光スキャンを行ったところ、チューブリン-TP 間の共有結合形成が示唆された。共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM)により DA-TP-TMR の微小管への局在が確認され、Taxol との競合実験により DA-TP-TMR が Taxol 結合部位に結合していることが明らかとなった。また UV 光照射後に Taxol を添加しても DA-TP-TMR が置換されなかったため、UV 光照射により微小管と共有結合を形成することが明らかとなった。一般的に不安定な微小管が形成される GTP を用いて微小管の安定性評価を行ったところ、DA-TP-TMR を内包し UV 光照射すると安定な微小管が形成され、脱重合条件でも微小管構造の維持が確認された(図 1B)。UV 光照射により微小管の長さおよび持続長 (剛直性の指標)の増大が確認されたことから、光未照射時と比べ微小管構造が変化することが明らかとなった (図 1C)。現在、DA-TP-TMR を細胞内に導入することで、UV 光照射による微小管安定化を利用した細胞機能の光制御を検討している。

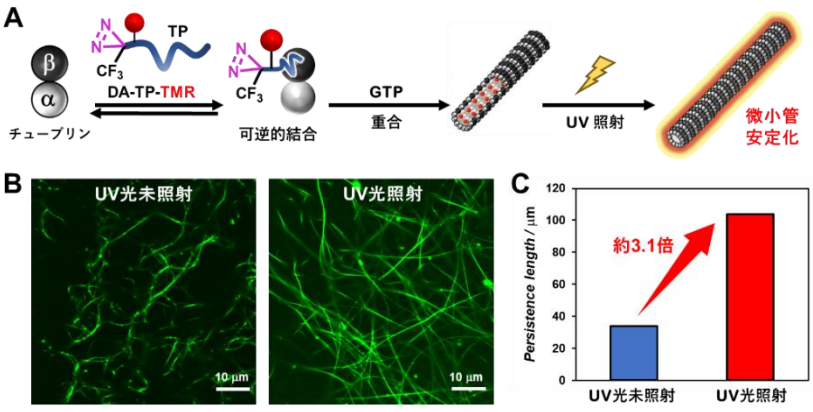


図 1. (A) DA-TP-TMR の内包と光照射による微小管安定化
(B) CLSM 像 (C) 微小管の持続長の比較

1) Y. Mimori-Kiyosue, *Cytoskeleton*, **68**, 603 (2011)
2) H. Inaba, T. Yamamoto, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Chem. Eur. J.*, **24,** 14958 (2018)
3) H. Inaba, M. Nagata, K. Juliano Miyake, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Polym. J.*, **52**, 1143 (2020)

©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

植物ホルモン–受容体相互作用に寄与する拡張デグロン配列の同定

○中山美涼[1]・齊藤里菜[2]・林　謙吾[1]・野本春菜[1]・高岡洋輔[1]・齋藤大明[3]・山神壮平[2]・武藤俊哉[1]・上田　実[1,2]（[1]東北大院理、[2]東北大院生命、[3]北陸大薬）

Extended JAZ degron sequence for plant hormone binding in jasmonate co-receptor of tomato (Graduate School of Science, Tohoku University[1], Graduate School of Life Sciences, Tohoku University [2], Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University [2]) NAKAYAMA, Misuzu[1]; SAITO, Rina[2]; HAYASHI, Kengo[1]; NOMOTO, Haruna[1]; TAKAOKA, Yousuke[1]; SAITO, Hiroaki[3]; YAMAGAMI, Souhei[2]; MUTO, Toshiya[1]; UEDA, Minoru[1, 2]

ジャスモン酸イソロイシン（JA-Ile）は、生長阻害や防御応答などの多様な応答に関与する重要な植物ホルモンである。この作用は、JA-Ile が植物体内の F-box タンパク質 COI1 と天然変性タンパク質でもある転写リプレッサーJAZ からなる COI1-JAZ 共受容体と結合することで引き起こされる [1]。

モデル植物シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）における *At*COI1-JA-Ile-*At*JAZ1 の結晶構造から、*At*JAZ の COI1 結合ドメインである Jas motif のうち、短いデグロン配列(V/L)P(Q/I)AR(R/K)が JA-Ile と直接コンタクトすることが知られている [2](Fig. 1a)。また、*At*JAZ1-13 のデグロン配列は相同性が 37.0 %と低く、*At*JAZ デグロン配列のわずかな違いによって *At*COI1-JA-Ile との親和性（K_d）に差が生じると考えられた [3]（Fig. 1a)。

今回我々は、トマト（*Solanum lycopersicum*）の *Sl*JAZ1-13（Fig. 1b）のうち、全く同じデグロン配列 LPIARR を持つ *Sl*JAZ1-4/13 と *Sl*COI1-JA-Ile との親和性に顕著な差が見られるという興味深い結果を得た [4]。*Sl*JAZ1-4/13 はデグロンの下流側（down-stream-of-degron、DOD、Fig. 1b）の配列 XSLX に違いがあり、この領域が親和性に影響を与えていることが示唆された。DOD 配列の影響を調べるために、配列を入れ替えたキメラ型の各種 *Sl*JAZ 変異体を作製し、結合親和性評価を行った結果、JAZ デグロンと DOD を含む拡張デグロン配列（Extended degron、Fig. 1b）が、*Sl*JAZ と *Sl*COI1-JA-Ile との親和性に影響を与えていることが明らかになった。また、*in silico* docking study により、天然変性領域である DOD 配列は JA-Ile と直接相互作用しないが、*Sl*COI1 との相互作用を増強し、親和性の違いに影響を及ぼすことが示唆された。近年、植物ホルモン受容体における天然変性領域の機能が注目されつつあるが [5]、本発見は、植物ホルモン受容体のリガンド認識機構について新たな知見を与えるものと期待される。

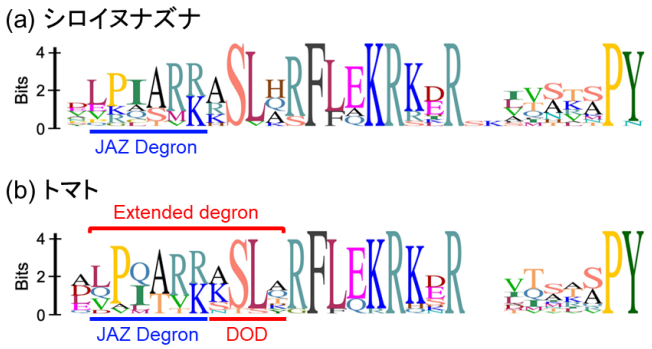


Figure 1. (a) シロイヌナズナ、および (b) トマトにおける Jas motif のシーケンスロゴ

1) Wasternack, C., Hause, B., *Ann. Bot.*, **111**, 1021, (2013).
2) Sheard, L., *et al.*, *Nature*, **468**, 400, (2010).
3) Takaoka, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **294**, 5074, (2019).
4) Saito, R., *et al.*, *Sci. Rep.*, **11**, 13612, (2021).
5) Niemeyer, M., *et al.*, *Nat. Commun.*, **11**, 2277, (2020).

©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

細胞内タンパク質結晶を利用した天然変性タンパク質の構造解析

○小島摩利子[1]・安部聡[1]・上野隆史[1]（[1]東工大生命理工）

Structure analysis of intrinsically disordered protein using in vivo protein crystal (Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Thechnology[1]) KOJIMA, Mariko[1]; ABE, Satoshi[1]; Ueno, Takafumi[1]

【緒言】近年、タンパク質結晶を外来分子や金属錯体の固定化により機能性固体材料として利用する研究が展開されている [1]。タンパク質結晶はアミノ酸変異と X 線結晶構造解析による精密な設計検討が可能である。特に、高分解能性を有するタンパク質結晶への外来タンパク質の固定化は、単分子での結晶化が困難なターゲットタンパク質の構造解析を可能にすると期待されている。例えば、天然変性タンパク質(Intrinsically Disordered Protein; IDP)はその柔軟性の高さから従来法での結晶化が困難である [2]。これまでに報告されている IDP の立体構造は IDP の結合ターゲットタンパク質との複合体形成時の構造に制限されている。よって実験室系で安定な複合体を形成しない多数の IDP に対する構造解析法は確立されていない。そこで私達は、多角体病ウイルスの感染により昆虫細胞内で結晶化するタンパク質結晶、Polyhedra crystal(PhC)に注目した [3]。PhC はアミノ酸置換や欠損による結晶エンジニアリング後でも X 線マイクロビームによる高分解能構造解析が可能なため、IDP を固定する鋳型結晶として利用できると考えた。さらに当研究室では、昆虫細胞内でのみ結晶化すると考えられていた PhC が無細胞タンパク質合成系でも結晶化し、高分解能の構造解析が可能であることを見出した(Fig.1a)。無細胞系合成による結晶化プロセスの迅速化は、網羅的な設計検討を可能にすると期待できる。本研究では、PhC を鋳型結晶として様々な IDP 由来ペプチドを融合した IDP 融合 PhC の構造解析を目的とし、無細胞系合成による結晶化と X 線結晶構造解析を試みた(Fig. 1c)。

【方法と結果】　PhC モノマーの N 末端, C 末端の Y224-Q248, 中間部の E70-N77(Loop1 領域; L1)をターゲット配列の融合箇所として選定した(Fig.1b)。HIF-1 α 由来ペプチドフラグメント HIF を融合した変異体 **HIF-PhC, PhC Δ Cter-HIF**, **PhC Δ L1-HIF** を設計した。コムギ胚芽由来無細胞系において各融合変異体の発現を行い、翻訳反応開始から 3 日後に得られる沈殿物を回収した。SDS-PAGE により発現確認を行い、SEM により沈殿物の外形を観察した。その結果、**HIF-PhC** と **PhC Δ L1-HIF** の立方体結晶形成が確認できた。得られた結晶に対し微小結晶用のビームラインである SPring-8 BL32XU にて X 線回折測定を行った。現在、回折データの解析と構造精密化を行っている。



Fig.1 (a) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系で結晶化した PhC の SEM 画像。(b) PhC モノマーの立体構造とターゲットタンパク質の融合箇所。(c) ターゲットタンパク質と PhC モノマーの融合変異体の結晶化。

[1] S. Abe and T. Ueno, *et al*., *Chem. Commun*., 2016, 52, 6496, [2] F. Delhommel, *et al., J. Mol. Biol*. 2020, 432, 2890, [3] F. Coulibaly, *et al., Nature*, 2007, 446, 97

©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

ラッソ・グラフト改変VenusによるCD24-Siglec10免疫チェックポイント阻害剤の開発

○黄薇恩[1]・寺坂尚紘[1]・菅 裕明[1]（[1]東京大学理学部）

Development of lasso grafted Venus-based CD24—Siglec-10 immune checkpoint inhibitor (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1]) HUANG, Wei-En[1]; TERASAKA, Naohiro[1]; SUGA, Hiroaki[1]

Triple negative breast cancer (TNBC) is one of the lethal diseases affecting women and its lack of three marker receptors made it challenging for chemotherapy. In TNBC, the CD24-Siglec10 (sialic-acid-binding Ig-like lectin 10) axis is identified as the dominant innate immune checkpoint[1]. (Fig. 1 (A)). Siglec-10 on tumor-associated macrophage (TAM) recognizes sialosides on CD24 surface. This interaction activates “Don’t eat me signal” assisting cancer cells to evade phagocytosis clearance by macrophage[1]. Currently, anti-CD24 antibody block CD24—Siglec-10 interaction and phagocytosis of macrophage to CD24-expressed cancer cell was increased[1]. However, the development of antibody is relatively challenging especially in time and cost effectiveness issue.

In our lab, we developed a protein engineering technology, lasso-grafting to create a multi-functional therapeutic protein[2]. In lasso grafting, we insert pharmacophore sequence of cyclic peptides (about 2 kDa) derived from RaPID[3], an affinity-based screening platform to discover potent cyclic peptide inhibitor, into a protein scaffold. Both function of parental peptide and protein scaffold can be maintained. I aim to develop lasso-grafted Venus (yellow fluorescent protein)[4] to inhibit CD24–Siglec-10 interaction. Venus is a structurally stable protein and can be used as an imaging tool with its own fluorescence. The cyclic peptides against Siglec-10 derived from RaPID were inserted into loops in Venus scaffold respectively. The grafted-Venus were successfully expressed by *E.coli* and showed binding affinity to Siglec-10. In future, this mono-grafted Venus is possible to achieve multi-functional by multi-grafting.

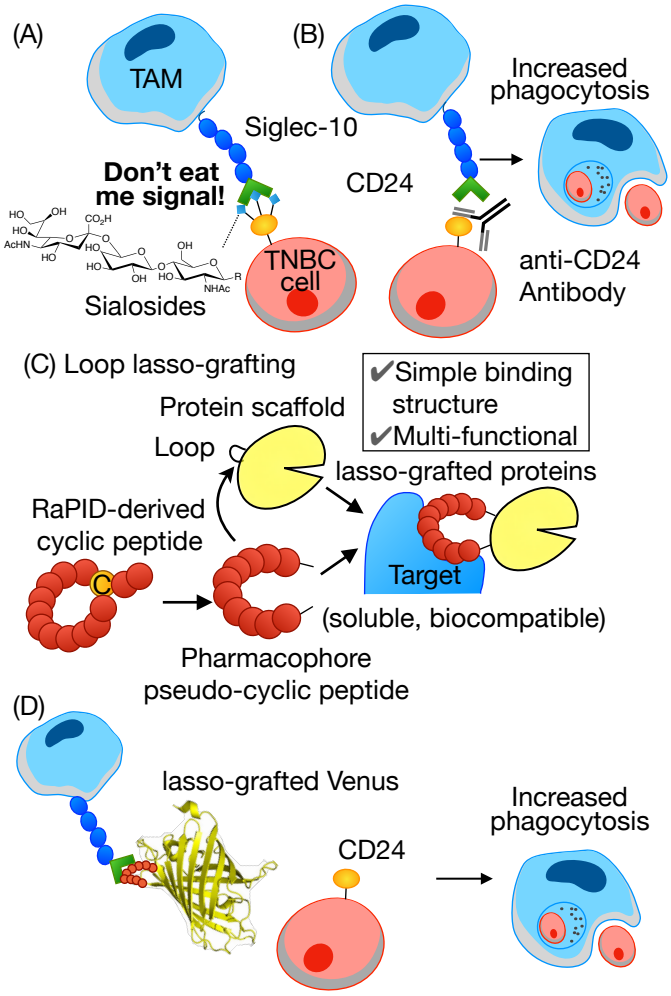


Fig. 1. (A) Schematic of the inhibition of phagocytosis by CD24–Siglec-10[1] (B) Anti-CD24 antibody blocks CD24–Siglec-10 interaction[1] (C) Work flow for loop lasso-grafting[2] (D) lasso-grafted Venus targets Siglec-10, blocking CD24–Siglec-10 and inducing phagocytosis

1) A. A. Barkal, R. E. Brewer, M. Markovic et al. *Nature* **572,** 392–396 (2019)
2) E. Mihara, S. Watanabe, N. K. Bashiruddin et al. *Nat. Commun.* **12**, 1543 (2021)
3) T. Passioura, H. Suga, *Chem. Commun,* **53**, 1931-1940 (2017)
4) A. Rekas, J. Alattia, T. Nagai, A. Miyawaki, M. Ikura, *J. Biol. Chem* **277**:50573-50578 (2002)

©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

Dicer-PAZ/Platform と dsRNA の光クロスリンク解析による基質認識機構の解明

○鈴木　駿也・横田　徳子・津田　弘貴・神谷　由紀子・浅沼　浩之（名大院工）

Analysis of interaction site between Dicer-PAZ/Platform and dsRNA by using photo crosslink reaction

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) SUZUKI, Shunya; YOKOTA, Noriko; TSUDA, Hiroki; KAMIYA, Yukiko; ASANUMA, Hiroyuki

RNAi 機構は遺伝子発現を抑制する生体反応であり、これらのシステムを応用した核酸医薬の開発が期待されている。RNAi 機構において重要な役割をもつタンパク質である Dicer は pre-miRNA や pre-siRNA を切断し、短鎖 dsRNA (miRNA, siRNA) を生産する。Dicer によって生み出された短鎖 dsRNA は Ago2 タンパク質に受け渡され RISC を形成し、標的である mRNA を切断する。このことから、Dicer による dsRNA の認識・切断機構の解明は RNAi を理解する上でも、RNAi を基盤とする核酸医薬を開発する上でも非常に重要である。

Dicer は巨大マルチドメインタンパク質であり、基質 RNA の認識・切断のステップで柔軟に構造を変化させると予想されている。これまでに Dicer の各ドメインの結晶構造解析や、RNA と Dicer の複合体のクライオ電子顕微鏡解析が行われているが、Dicer による RNA 認識・基質選別を理解する相互作用は捉えられていない。そこで本研究では、基質 RNA の 3’末端を認識することが知られている Dicer の PAZ ドメインとそれに続く Platform ドメイン (Dicer-Platform/PAZ, Dicer-PP) を用い、光クロスリンク法によって Dicer-PP による dsRNA 認識の解析を試みた。

クロスリンカーとして、Trifluoromethyl phenyl diazirine に平面性分子である Carbazole を導入した化合物を設計・合成した (Fig. 1 a)。Dicer の基質ではない短鎖 dsRNA やステムループ構造をもつ dsRNA、Dicer の基質である長鎖 dsRNA や pre-miRNA を模倣したバルジ構造をもつ dsRNA に対し、クロスリンカーの位置を変えて導入し、Dicer-PP との光クロスリンクを行った。さらに、LC-MS/MS 解析を行うことで相互作用部位の同定を行った (Fig. 1 b)。

クロスリンカーの位置が異なる dsRNA の光クロスリンク反応産物を SDS-PAGE によって比較したところ、長鎖 dsRNA の末端から 14 nt までにクロスリンカーを導入した場合は光クロスリンクが確認でき、それより 3’末端側にクロスリンカーを導入した場合は光クロスリンクが起こらなかった。このことから、Dicer-PP は dsRNA の末端だけでなく、内部とも相互作用することが明らかになった。また、14 nt におけるクロスリンク効率は、フルマッチ dsRNA よりも内在性の Dicer の標的を模したバルジ構造を持つ dsRNA において増加した。このことから、Dicer-PP は dsRNA の鎖長と末端から内部領域の構造を読み取り、基質識別を行う機能をもつと考えられた。さらに、LC-MS/MS 解析の結果から、これまでの構造解析では得られなかった、新たな Dicer-PP・dsRNA 複合体の相互作用を解明することに成功した。

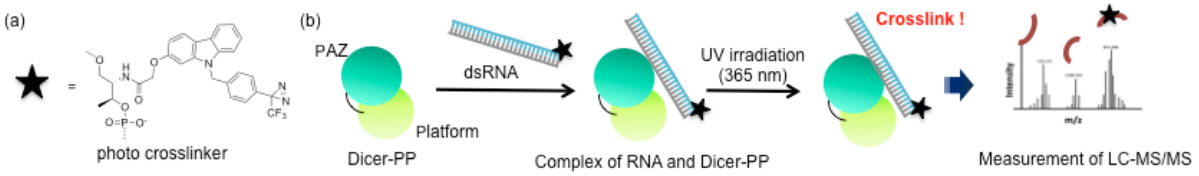


Fig. 1 Overview of photo-crosslinking of modified RNA to Dicer

分子ストッパーによる AMPA 型グルタミン酸受容体の活性制御

○三浦裕太[1]・小島憲人[2]・浜地格[2]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]京大院工）

Control the AMPA-Type Glutamate Receptor Activity Utilizing the Molecular Stopper Approach (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2]) MIURA, Yuta[1]; OJIMA, Kento[2]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPAR)は、中枢神経系での速い興奮性神経伝達を担う 4 量体カチオンチャネルであり、その発現様式が記憶や学習に大きく関連している。AMPAR には GluA1-4 からなる 4 種のサブユニットが存在し、それぞれ異なる機能を有すると考えられる。しかし構造的相同性の高さからサブユニット選択的活性制御が難しく、各サブユニットに固有な機能の理解には至っていない[1]。

このような背景の下、我々は受容体の構造変化に着目した新規ケモジェネティクス法「配位ケモジェネティクス」の開発を進めている。約 30 種存在するグルタミン酸受容体は、グルタミン酸の結合に伴いリガンド結合ドメインが開いた構造から閉じた構造へと変化し、活性化するという共通メカニズムを持つ(Fig. 1a)。我々はその構造変化を利用して、グルタミン酸受容体を人為的に活性化させることに成功した[2]。具体的には、まずリガンド結合部位近傍の上下に配位性アミノ酸である His の変異導入を行う。そこに Pd(bpy)錯体を加えることで変異導入された His と配位結合を形成し、閉構造への変化を誘起して活性化させた(Fig. 1b)。

本研究では、配位ケモジェネティクスによって活性化させる先行研究とは異なり、Pd 錯体の配位子が比較的嵩高いことに着目した。狙った位置に導入した配位サイトへ錯体が配位結合する事で、構造変化に干渉する分子ストッパーとして機能するのではないかと構想した。まず AMPAR の活性化時に大きく構造変化する位置に、配位性アミノ酸である His を近接するように 2 残基変異導入して配位サイトを作製した。そこに嵩高い錯体を配位させることで、閉構造への変化を妨げて受容体の活性を阻害する事に成功した(Fig. 1c)。本手法は、従来の方法で不可能だったサブユニット選択的な活性阻害を可能にするものである。

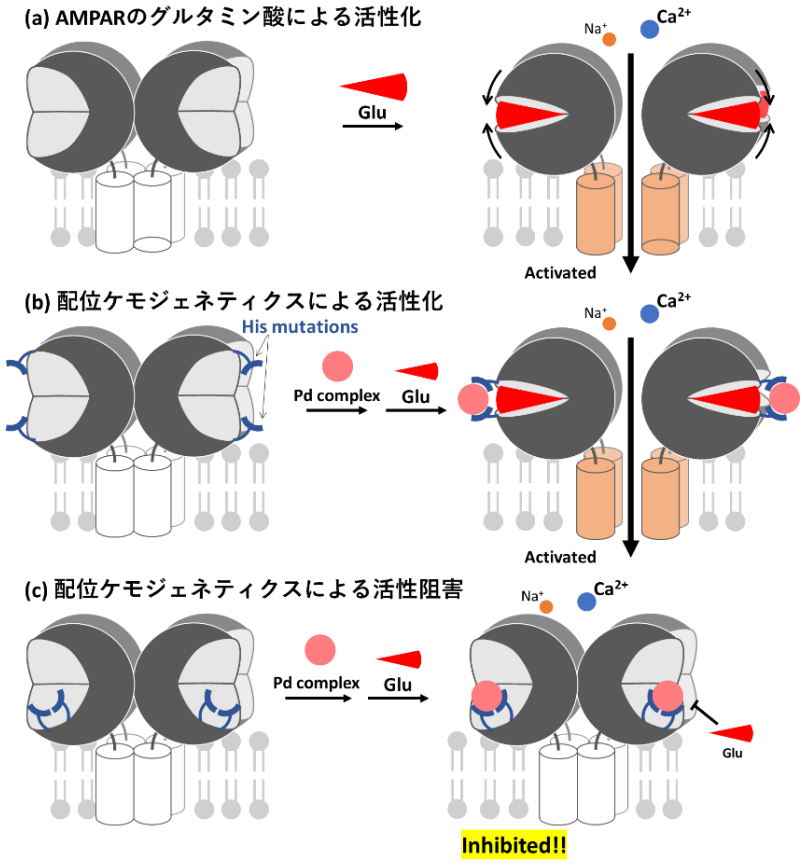


Fig. 1 (a) Glutamate-induced activation mechanism of AMPARs. (b) Coordination- chemogenetic activation of AMPARs. (c) Coordination-chemogenetic inhibition of AMPARs utilizing the molecular stopper approach.

1) J. M. Henley et al., Nature Rev. Neurosci. (2016)
2) S. Kiyonaka et al., *Nature Chem.* (2016)

天然化合物を擬似基質として利用可能な P450BM3 変異体の指向性進化法による開発とその構造解析

○横山侑弥[1]・唐澤昌之[1]・有安真也[1]・愛場雄一郎[1]・杉本宏[2,3]・荘司長三[1,2]
（[1]名大院理、[2]JST CREST、[3]理研 Spring-8）

Directed Evolution and Structure Analysis of P450BM3 Utilizing Natural Products as Decoy Molecules

(Graduate School of Science, Nagoya University[1], JST CREST[2], RIKEN Spring-8[3]) YOKOYAMA, Yuya[1]; KARASAWA, Masayuki[1]; ARIYASU, Shinya[1]; AIBA, Yuichiro[1]; SUGIMOTO, Hiroshi[2,3]; SHOJI, Osami[1,2]

シトクロム P450BM3 (P450BM3) は長鎖脂肪酸の水酸化を高効率に触媒するヘム酵素である．一方我々は，天然基質を模倣して合成した擬似基質「デコイ分子」を野生型 P450BM3 に添加することで，その基質特異性を改変し，ベンゼンなどの非天然基質の効率的な水酸化を達成している[1] (Fig. 1)．近年では，酵素の精製と高価な補酵素 NADPH の添加が不要な，菌体内反応系が開発されている[2]．しかし，これまでの反応系ではデコイ分子の合成と外部添加が必須となっており，さらなる応用に向けてデコイ分子調製におけるコスト削減が求められている．そこで本研究では，既存のデコイ分子と似た骨格を有し，一部の細菌が分泌する C10-アシルホモセリンラクトン (C10-AHL) に着目し，C10-AHL 分泌菌と P450BM3 発現大腸菌の共培養により，デコイ分子の合成と添加が不要な反応系開発を目的とした (Fig. 2)．しかし，野生型 P450BM3 に対して C10-AHL を用いた際のベンゼン水酸化活性は低いため，C10-AHL をデコイ分子として利用可能な P450BM3 変異体を指向性進化法によって開発する．

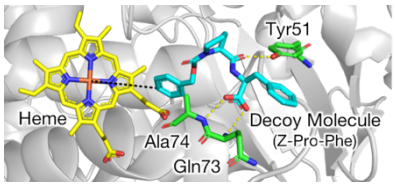


Fig. 1 Crystal structure of P450BM3 WT and decoy molecule (Z-Pro-Phe)

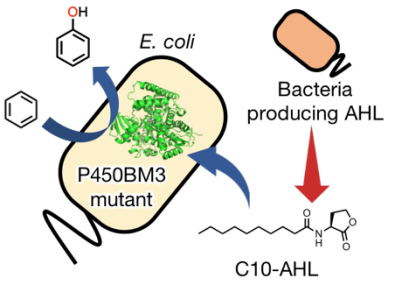


Fig. 2 Whole-cell benzene hydroxylation using C10-AHL as a decoy molecule

野生型 P450BM3 ヘムドメインにランダム変異を導入し，約 1600 変異体のスクリーニングを C10-AHL 存在下での菌体内ベンゼン水酸化によって行ったところ，野生型の約 1.5 倍の活性を持つ変異体を得た．この変異体には，A74V と L188P という，活性部位入り口付近の変異が確認されたため，第二世代として A74V, L188P 周辺の 17 残基に対し飽和変異を導入した変異体ライブラリーを構築し，そのスクリーニングを行った．その結果，高い活性と，野生型に比べて約 50 倍の C10-AHL 応答性を示し，活性部位の入り口に位置する R47W 変異を持った 10-G10 変異体を開発した (Fig. 3)．

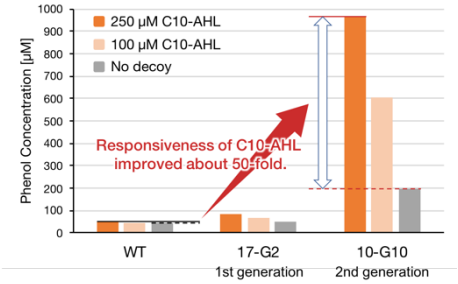


Fig. 3 Whole-cell benzene hydroxylate activity of developed mutants with C10-AHL

次に，開発した第二世代変異体 (10-G10) の構造を調査するため，X 線結晶構造解析を行った．解析の結果，L188P の位置する F-G ループを中心に，野生型 P450BM3 と比べてその主鎖の構造が大きく変化していることがわかった (Fig. 4)．現在，さらなる活性と C10-AHL 応答性の向上を目指し，第三世代変異体の作製とスクリーニングを行っており，これに関しても発表する予定である．

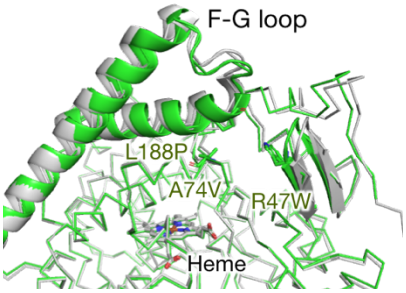


Fig. 4 Crystal structure of 10-G10 (green) and WT binding decoy (gray, PDB: 6JLV)

1) O. Shoji, *et. al.*, *ACIE.* **2017**, *56*, 10324-10329.
2) M. Karasawa, *et. al.*, *ACIE.* **2018**, *57*, 12264-12269.

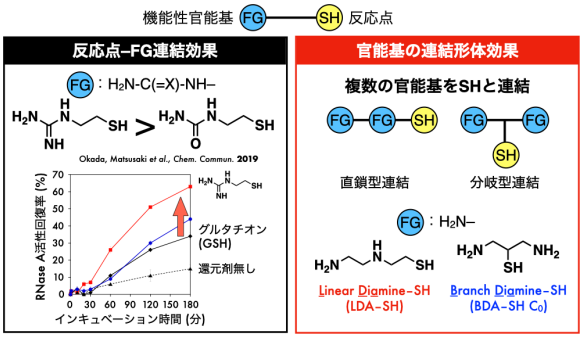
タンパク質酸化的フォールディングを促進する低分子化合物の官能基配置効果

○岡田隼輔[1]・松﨑元紀[2]・奥村正樹[3]・村岡貴博[1]（[1]東農工大院工、[2]徳島大先端酵素研、[3]東北大学際研）

Structural Effects of Conjugation between Thiol and Functional Groups on Accelerating Oxidative Protein Folding ([1]Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]IAMS, Tokushima University, [3]FRIS, Tohoku University) OKADA, Shunsuke[1]; MATSUSAKI, Motonori[2]; OKUMURA, Masaki[3]; MURAOKA, Takahiro[1]

タンパク質は、多様な生命機能を担う生体分子であるとともに、機能性材料や薬剤などとしても重要な物質群である。その機能や薬効は、タンパク質固有の立体構造と密接に関係している。例えば、筋肉中に多く含まれるミオグロビンは、8 個の α-ヘリックス構造を有する。これらヘリックスがヘムを固定化し、酸素貯蔵の機能を実現している。また、医薬品に広く用いられる IgG 抗体は、重鎖と軽鎖が多数の SS 結合を形成し天然構造へと折り畳まれ、抗原認識作用、及び結合・免疫細胞活性化など免疫維持作用を示す。従って、ポリペプチド鎖の折り畳み(フォールディング)は、タンパク質としての生命機能を発現する上で重要なプロセスである。しかし、大腸菌などを用いてある目的タンパク質の発現を行なう際、可溶性画分の天然構造収率は必ずしも高くない。目的タンパク質を効率的に天然構造へフォールディングさせることは、タンパク質の応用上重要な技術であるが、特にジスルフィド(SS)結合形成を伴うタンパク質のフォールディングを促進する分子、材料の有効な設計指針は未確立である。

複数の SS 結合を有するタンパク質は、システイン側鎖のチオール基(SH)が、他の SH 基と反応して SS 結合を形成する酸化反応を伴いながらフォールディングする(酸化的フォールディング)。ここで、天然型のシステイン対で SS 結合が組まれると、天然構造へ導かれる。他方、非天然型システイン対による SS 結合は、非天然構造(ミスフォールド構造)を与える。従って、活性タンパク質の収率向上を指向する上で、非天然型 SS 結合を切断し、天然型 SS 結合へと組み替えるアプローチが有効と考えられる。我々は、非天然型 SS 結合の還元的切断が可能である SH 基に着目し、天然構造へのフォールディングを効果的に進める SH 化合物の開発を行っている。SH 基と機能性官能基(FG)の連結を分子設計の基本コンセプトとし、これまで、ウレア骨格(–NHC(=X)NH_2, X = O or NH)を導入した SH 化合物が、還元変性タンパク質に対し、天然構造へのフォールディングを著しく促進することを見出した[1]。さらに、SH 基と FG の連結距離がタンパク質の天然構造形成効率に影響を及ぼすことを報告した[2]。



本研究では、FG の連結形体が与える効果に注目し、複数の FG を SH 基に対して異なる形体で配置した化合物を新たに開発した(FG–SH 直鎖型連結分子, FG–SH 分岐型連結分子)。還元変性タンパク質に対するフォールディング促進効果を定量評価した結果、FG–SH 連結形体の違いがフォールディング促進効果に明確な差を与えることが示された。各合成化合物の SH 基の化学的性質も評価し、フォールディング実験結果と合わせて議論する。

1）S. Okada, M. Matsusaki, K. Arai, Y. Hidaka, K. Inaba, M. Okumura, T. Muraoka, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 759.
2）S. Okada, M. Matsusaki, M. Okumura, T. Muraoka, *Molecules* **2021**, *26*, 879.

©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

天然・転写 tRNA による Ser/Leu 交換遺伝暗号の翻訳高効率化

○藤野 公茂[1]・園田 凌吾[1]・村上 裕[1,2]（[1]名大院工、[2]名大ナノライフ）

Improvement of the translation efficiency with a Ser/Leu-swapped genetic code by using native and *in vitro* transcribed tRNAs. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University[2]) FUJINO, Tomoshige[1]; SONODA, Ryogo[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1,2]

組み換えタンパク質を作製する研究では、外部環境への組み換え遺伝子拡散のリスクが常に問題となる。無細胞翻訳系の利用は、一見すると有効な解決手段と見えるが、実際には、化学合成 DNA をクローニングすることで、正しい配列を選択する必要があり、完全にリスクを払拭できてはいない。これに対し、我々は先行研究において、普遍遺伝暗号と直交性を持つ「Ser/Leu 交換遺伝暗号」の構築を考案した（図 1）。この遺伝暗号では、翻訳反応に使用する、$tRNA^{Ser, Leu}$ のアンチコドンを交換してキメラ tRNA とすることで、これら 2 つのアミノ酸のコドンが交換されている。遺伝子設計の時点で、予め Ser と Leu コドンを交換して配置しておくことで、翻訳時に再度交換が起こり、結果として正しい配列のタンパク質が得られる仕組みである。コドン交換遺伝子は、仮に環境へ漏洩したとしても、通常の生物の持つ普遍遺伝暗号では正しい配列に翻訳できないため、遺伝子拡散によって生じる問題は根本から解消されると考えられる。

しかし、先行研究の Ser/Leu 交換遺伝暗号を持つ無細胞翻訳系は、その翻訳合成量が、通常の翻訳系の 20%程度と、非常に低いという問題があった。これは、キメラ tRNA を含む全 21 種の tRNA を、*in vitro* 転写によって用意していたためと考えられた。そこで、本研究では、交換を行わない大部分の tRNA については、大腸菌から抽出した天然 tRNA を利用することで、タンパク質合成活性の高い、Ser/Leu 交換遺伝暗号を持った翻訳系の構築を目指した（図 2）。天然 tRNA を変性電気泳動で長さ毎に分離し、$tRNA^{Ser, Leu}$ を含むバンドを除去した後、キメラ tRNA を加えることで、天然・転写ハイブリッド tRNA を調製した。これを用いて Ser/Leu 交換遺伝暗号を持った無細胞翻訳系を構築し、その機能の評価を行った。その結果、モデルタンパク質 sfGFP の合成量を、天然 tRNA のみを用いた通常の無細胞翻訳系と同程度まで改善させることに成功した。さらに、ハイブリッド tRNA を用いたことで、使用可能なコドンが増えたため、コドンを自由に選択した遺伝子の設計が可能になった。本系は、毒素タンパク質などの、遺伝子漏洩の場合にリスクの大きいタンパク質を、その危険な遺伝子を用いずに作製するツールとして、応用可能であると期待される。

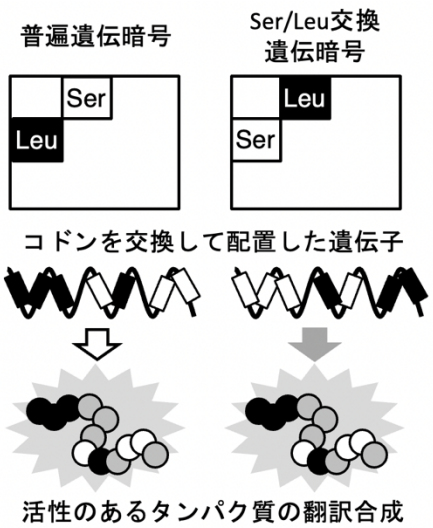


図1 Ser/Leu交換翻訳の原理。

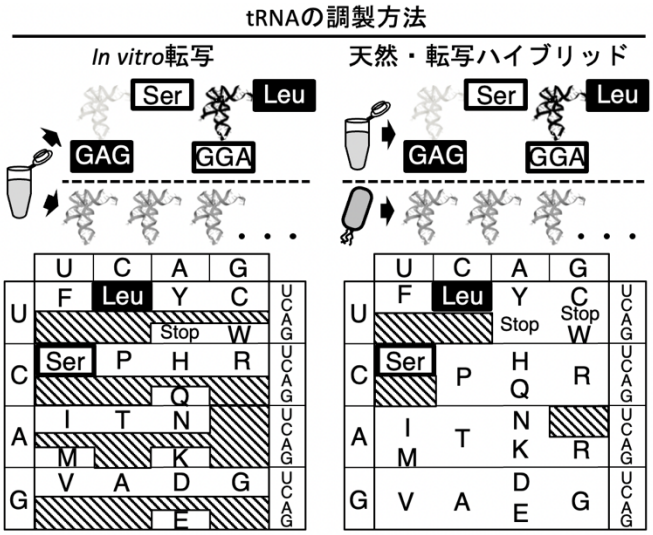


図2 天然・転写ハイブリッドtRNAを用いた遺伝暗号構築。

メンブレンコンタクトの化学遺伝学操作を介した膜脂質代謝の可逆制御

○吉川優[1]・阿喰萌香[2]・中津史[2]・築地真也[1]（[1]名工大院工、[2]名工大工、[3]新潟大院医歯）

Reversible control of lipid metabolism in living cells by chemogenetic membrane contact manipulation

(Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology[1], Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology[2], Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University[3]) YOSHIKAWA, Masaru[1]; AJIKI, Moeka[2], NAKATSU Fubito[2], TSUKIJI Shinya[1]

真核生物の細胞内には細胞小器官（オルガネラ）と呼ばれる、高度に専門化された機能を持つさまざまな構造体が存在している。個々のオルガネラは脂質膜に覆われるなどしてそれぞれ空間的に独立しているが、さまざまな物質輸送機構を介して協奏的に機能していることが知られている。近年、異なるオルガネラの膜同士が近接することで「メンブレンコンタクト」と呼ばれる膜–膜接触部位が形成されており、これが新たな輸送機構として機能していることが明らかとなった。コンタクト部位では主に脂質の交換輸送などが行われているが、その詳細な形成機構や機能については未知の部分が多く残されている。したがって、任意のオルガネラ間におけるコンタクト形成を人為的に制御可能な技術は、その生理的役割を理解する上で強力な研究ツールになるものと期待される。

本研究では、小胞体（ER）と細胞膜（PM）間のコンタクト（ER–PM contact）を人為的に制御するための新規ツールの開発を目指した。オキシステロール結合タンパク質である ORP5/8 は小胞体表面に発現しており、PH ドメインを用いて細胞膜上のイノシトールリン脂質 PI4P に結合する性質を有している。そのため、細胞膜上の PI4P 濃度が上昇すると ORP により ER-PM contact が形成され、コンタクト部位で ORP5/8 は PI4P とホスファチジルセリン（PS）の交換輸送を駆動する。一方、我々はこれまでに、細胞質中の標的タンパク質の局在を細胞膜特異的に移行させることができる化学遺伝学システムを開発している[1-3]。このシステムでは、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素（eDHFR）の改変体「^{iK6}eDHFR」をタグとして標的タンパク質に融合する。これを発現させた細胞にパルミチン酸を連結した TMP リガンド（palTMP）を添加すると、^{iK6}eDHFR 融合タンパク質を細胞質から細胞膜へ局在移行させることができる。そこで今回、ORP5 中の PH ドメインを ^{iK6}eDHFR タグに置き換えることで、palTMP の添加によって人為的に ER-PM 間の架橋を形成可能なシステムを構築した（**図 1**）。実際に、本システムを用いることで ER-PM contact の形成が誘導され、細胞膜上の PI4P の交換輸送と代謝を制御できることが培養細胞実験において確認された。本発表では、このメンブレンコンタクト操作システムの特性と、これを用いた細胞内脂質代謝の制御について報告する。

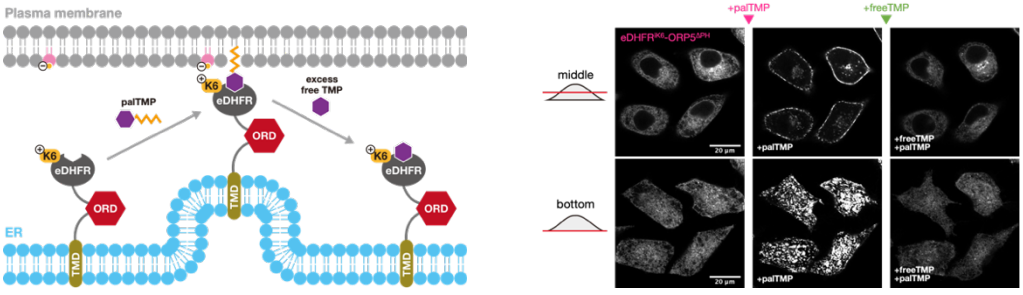


図 1 (a) ER-PM contact 誘導システムの概念図　(b) 本システムを用いた ER-PM contact の可逆制御

1) M. Ishida et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 12684 (2013); 2) A. Nakamura et al., *ACS Chem. Biol.*, **15**, 1004 (2020); 3) Y. Hatano et al., bioRxiv, DOI: 10.1101/2021.03.16.435568

©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

固定化駆動法による脳内での分子動態解析を指向した新規プローブ開発

對馬暁洋[1]・美野丈晴[1]・天池一真[1]・石川守[2]・坂本清志[1]・野中洋[1,2]・浜地格[1,2]（[1]京都大院工, [2]JST ERATO）

Development of Fixation-driven Chemical Crosslinking Probes for Pharmacokinetic Analysis in Brain(Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], ERATO JST[2]) TSUSHIMA, Akihiro[1]; MINO, Takeharu[1]; AMAIKE, Kazuma[1]; ISHIKAWA, Mamoru[2]; SAKAMOTO, Seiji[1]; NONAKA, Hiroshi[1,2]; HAMACHI, Itaru[1,2].

薬剤をはじめとした外来性分子の拡散・浸透・滞留性の評価は、薬剤の標的選択性・メカニズム・持続性の理解に直結するもので、薬理学的に極めて重要である。既存の外来性分子の動態解析手法として、放射性同位元素を標識した分子を用いる陽電子断層撮像法（PET）が知られている。PET はパワフルな解析手法であるが、空間分解能が低いといった原理上の問題がある。そのため、外来性分子の動態を詳細に解析可能な新規手法の開発が現在求められている。

当研究室では、このような背景から高解像度に外来性分子の動態解析を行う手法として、固定化駆動クロスリンク法（Fixation-driven chemical crosslinking: FdCC）を開発してきた。FdCC 法では、まず解析対象となるリガンドに蛍光色素と1級アミノ基を組み込んだ分子プローブ（Fig. 1A）を生きた動物個体に投与する。次に、任意のタイミングでパラホルムアルデヒド（PFA）水溶液による灌流固定（クロスリンク処理）を行うことで、プローブと相互作用タンパク質の求核性官能基が架橋される（Fig. 1B）。最後に、固定された生体組織を蛍光イメージングすることで、分子プローブの動態を高解像度に解析する手法である。

今回我々は、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の一種である AMPA 受容体（AMPAR）のアンタゴニスト PFQX と、ドーパミン受容体（DRD2）のアンタゴニストであり定型抗精神病薬である Spiperone を対象とした新規の FdCC プローブの開発を行った。まず、AMPA 受容体を発現させた HEK293T 細胞に対して、PFQX-FdCC プローブをインキュベートし PFA 処理したところ、AMPAR 発現細胞の膜表面からプローブ由来の蛍光が観測された。リガンド認識を阻害した条件や、アミノ基がないプローブを用いた条件では、そのような蛍光は確認されず、AMPAR との相互作用と PFA によるクロスリンクに基づくプローブの固定化であることが確認された。さらに、生きたマウス脳内にプローブを投与し、PFA による灌流固定を行うと AMPA 受容体が高発現する海馬や小脳分子層から蛍光シグナルが見られ、固定化駆動クロスリンク法により PFQX-FdCC プローブの脳内での分布を解析できることが示唆された。同様に、Spiperone-FdCC プローブを合成し、DRD2 を発現した HEK293T 細胞を用いて評価したところ、DRD2 との相互作用と PFA によるクロスリンクに基づく蛍光シグナルを確認した。本発表では、これらの新規 FdCC プローブの詳細に関して報告する。

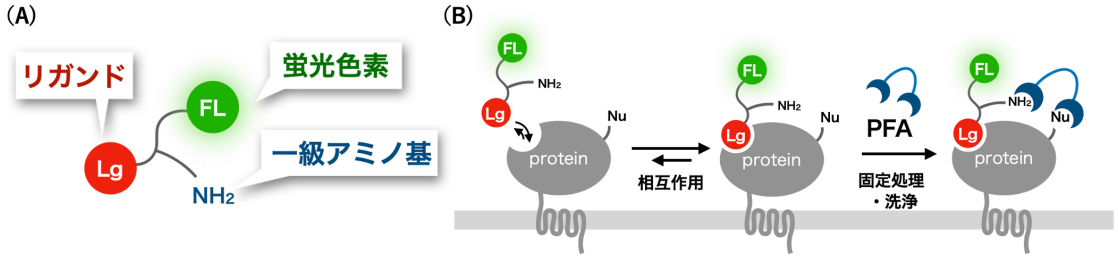


Fig 1. 固定化駆動クロスリンク法に用いる分子プローブ（A）と、その原理（B）

PET 加水分解酵素と高付着性タンパク質の連結体構築

○澤田美波・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Construction of a fusion protein consisting of a PET hydrolase and an adhesive protein (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SAWADA, Minami; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

プラスチックはひとたび環境中に排出されると環境中に長期間にわたり残存するため、適切に処理する方法が求められている。近年、環境負荷の低いプラスチックの処理方法として生体触媒 (酵素) による分解が注目されている。この方法ではプラスチックをモノマーに分解し、それを原料として再びプラスチックを生産できるため、温和なケミカルリサイクルとして資源循環型社会の実現への寄与が期待されている。しかし、固体表面を基質とするプラスチックの酵素分解には、反応速度が遅いという問題点がある。

当研究室で発見された高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 由来のファイバータンパク質 AtaA は、プラスチックからガラス、金属など様々な固体材料表面に対する高い付着性を示す [1]。AtaA は他の分子と連結することで付着性を付与し、任意の材料表面に分子を付着させられることが示されている [2]。そこで同様に、プラスチック分解酵素に AtaA を連結すれば、基質であるプラスチック表面に酵素を集積して接触頻度を上げ、分解速度を向上できるのではないかと考えた。そこで本研究では、ポリエチレンテレフタレート (PET) 加水分解酵素のひとつである LCC[3]をモデルとして、AtaA との連結体の構築を試みた。

AtaA と LCC の連結には、混合するだけで特異的な架橋反応が起こる SpyTag/SpyCatcher システムを利用した [4]。ホモ三量体を形成する AtaA に SpyCatcher を、LCC に SpyTag を付加したリコンビナントタンパク質を設計し、大腸菌でそれぞれ生産、精製した (Fig. 1A)。LCC と SpyTag の間のリンカーには、柔軟な $(GGGGS)_5$ と堅い $(EAAAK)_5$ の 2 つを検討した (Fig. 1B)。それらを 1.5 ml チューブ内で混合し 37℃で 1 時間反応したところ、$(EAAAK)_5$ リンカーで SpyTag を付加した LCC は AtaA-SpyCatcher と連結したが、$(GGGGS)_5$ リンカーで SpyTag を付加した LCC は AtaA-SpyCatcher とほとんど連結しなかった。SpyTag-$(EAAAK)_5$-LCC と AtaA の連結体をアフィニティー精製し、そのエステラーゼ活性を酢酸 p-ニトロフェニルの分解試験で評価したところ、AtaA と連結させていない LCC と同等の活性を維持していた。これらの結果から、SpyTag/SpyCatcher システムを用いて AtaA-LCC 連結体を構築できることが示された。

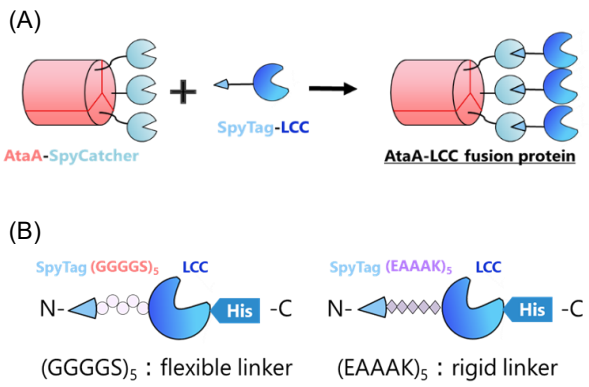


Fig. 1. (A) Schematic illustration of construction of AtaA-LCC fusion protein. (B) Two types of linkers used in SpyTag-LCC.

1) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLOS ONE*, 7, e48830 (2012)
2) K. Noba, M. Ishikawa, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, 141(48), 19058-19066 (2019)
3) V. Tournier, C. M. Topham, *et al.*, *Nature*, 580, 216-219 (2020)
4) A. H. Keeble, A. Banerjee, *et al.*, *Angewandte Chemie. International Edition*, 56(52), 16521-16525

インクジェット装置による膜透過性ペプチドを用いた細胞内導入技術の開発

○大村美香[1]・中瀬生彦[1,2]（[1]阪府大生命環境、[2]阪府大院理）

Development of inkjet system-based intracellular delivery technology using cell-penetrating peptides (College of Life, Environment, and Advanced Sciences, Osaka Prefecture University[1], Graduate School of Science, Osaka Prefecture University[2]) OMURA, Mika[1] NAKASE, Ikuhiko[1,2]

細胞内導入技術は種々存在するが、代表的な方法としてマイクロインジェクション法が挙げられる。この方法は確実性が高く細胞内導入効率が高い一方で、作業効率が低く細胞生存率への影響が大きい。そこで本研究ではこれらの問題点を解決するために、インクジェット装置と膜透過性ペプチド（cell-penetrating peptides, CPP）を用いた新たな細胞内導入技術の開発を進めている。インクジェット装置により液滴量と滴下速度、滴下位置を精密に制御し、加えて超微細インクジェットヘッドを併用することで微量の標的投与が可能となる。また高い細胞膜透過機能を有する CPP は、通常なら細胞膜を透過できない高分子の薬物やナノ粒子を細胞内へ送達できることが明らかにされている[1)]。本研究では、液滴の吐出の強さを調節することで滴下速度をコントロールし、導入液とその濃度を変化させて最適条件の検討を行った。また、インクジェットシステムにおいて適用可能な CPP の探索を行い、高効率な細胞内導入の技術構築を進めている。

インクジェット装置（クラスターテクノロジー社）は、専用ドライバ（WaveBuilder®）、カメラ付き観測装置（InkjetLabo™）、及び、超微細インクジェットヘッド（PulseInjector®）を搭載したシステムを用いた。全てのペプチドは Fmoc 固相法で合成し、C 末端に配置したシステインの側鎖を介して蛍光標識（Alexa488）を行った。脱保護、及び、HPLC で精製後に得られたペプチドの分子量を MALDI-TOFMS を用いて測定した。各種ペプチドを超微細インクジェットヘッドへ充填し、電圧、周波数、波形、吐出回数を設定した後、カメラ付き観測装置で吐出位置を確認しながら HeLa 細胞に添加した。その後、蛍光顕微鏡、及び、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光標識ペプチドの局在を観察した。

膜透過性ペプチドの蛍光標識 FHV ペプチド[2)]（PBS 溶解）を本インクジェット装置により細胞へ添加したところ、通常の細胞操作による添加時に比べて、低濃度かつ少量でのサイトゾル移行が可能であることを確認した。また装置電圧を上昇し滴下速度を高めることで、ペプチドの細胞膜通過効率が上昇することが示唆された。本実験条件において、細胞へのダメージはほとんど無いことも示されている。また、細胞死誘導配列ペプチド（PAD）[3)]について、FHV 配列を PAD に付加することで、インクジェット装置による本技術での細胞内導入、及び、顕著な細胞死誘導を確認することができた。

以上のように、インクジェットシステムを使用することで、狙った細胞群への膜透過性ペプチドの滴下ができ、高効率なサイトゾル導入が可能になった。本手法は、新たな細胞内導入技術の基盤構築に繋がることが考えられる。本技術を用いた生理活性分子の細胞内導入評価についてさらに展開させたい。

【参考文献】

1) S. Futaki, I. Nakase, *Acc. Chem. Res*. **50**, 2449-2456 (2017)
2) I. Nakase *et al.*, *Mol. Ther.* **11**, 1868-1876 (2009)
3) C.L. Ellerby *et al.*, *Nature* **5**, 1032-1038 (1999)

膜融合配列によるエンドソーム脱出促進を指向したペプチド性薬物キャリアの合成

○廣田 翔吾[1]・今井 崇人[1]・山崎 正幸[2]・富﨑 欣也[1]（[1]龍谷大理工、[2]龍谷大農）

Synthesis of A Peptide-Based Drug Carrier for Facilitating Endosomal Escape by A Fusogenic Sequence

([1]Department of Materials Chemistry, [2]Department of Food Sciences and Human Nutrition, Ryukoku University)
HIROTA, Shogo[1]; IMAI, Takahito[1]; Yamasaki, Masayuki[2]; TOMIZAKI, Kin-ya[1]

薬物は生体システムにとって異物であるために、体内で分解や排出を受けやすく、また、様々な副作用を引き起こす。そこで効果の増強や、副作用の低減を目的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が盛んに行われている。近年では特に、ガン細胞など、細胞を特異的に標的化した DDS が注目を集めている。しかし細胞内に薬物が取り込まれる主要な経路であるエンドサイトーシスでは、エンドソームによる内包が薬効の抑制や薬物の分解等の様々な問題を引き起こす。したがって、膜貫通孔形成や膜融合によって、エンドソーム膜を不安定化させることで、エンドソームからの薬物の放出を促進し、効率的な薬物の送達が可能となる。本研究では、先行研究において設計・合成された薬物キャリアペプチド (Cap-p : Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH2)[1] の N 末端に細胞膜透過性の核移行シグナルペプチド (NLS) 及び pH 応答性の膜融合ペプチドとして知られている GALA ペプチド [2] の部分配列を有する 2 種のキャリアペプチドをそれぞれ設計した。さらに細胞内還元環境による薬物放出を期待して、2 種のキャリアペプチドを、ジスルフィド結合を介して二量化することでヘテロダイマー (GALA-NLS) を新たに設計・合成しその機能について評価した。

Cap-p をベースにカルボキシフルオレセイン (FAM) を修飾した FAM-NLS-p-C 及び GALA-p-C(S-Py) を固相合成法により合成した。さらにそれらを超純水中で 1 時間反応させることで、ジスルフィド結合を介した GALA-NLS を合成した (Fig. 1)。次いで CD スペクトル測定による二次構造の pH 応答性、還元剤ジチオトレイトール (DTT) によるジスルフィド結合の解離評価、そして、システインを含まない FAM-NLS-p 及び GALA-p を対照ペプチドとして、カルセインを用いた細胞内挙動の評価をヒト子宮頸ガン由来の HeLa 細胞を用いて行った。

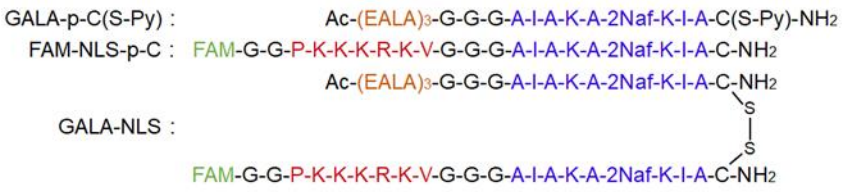


Fig. 1. ペプチドの配列 (2Naf = L-2-naphtylalanine)

CD スペクトル測定の結果、エンドソーム内の pH 相当の pH5.5 において pH7.5 よりもα-ヘリックス性が高いことを示唆するスペクトルが得られた。また、DTT 処理によりジスルフィド結合の解離が確認された。次いで、カルセイン存在下でペプチドを細胞導入したところ GALA-NLS を用いた場合のみ細胞全体から緑色蛍光が確認され、GALA-NLS がエンドソームから内包物を放出する機能を有していることが示唆された (Fig. 2)。今後は薬剤モデルとして核酸の送達を試みる予定である。

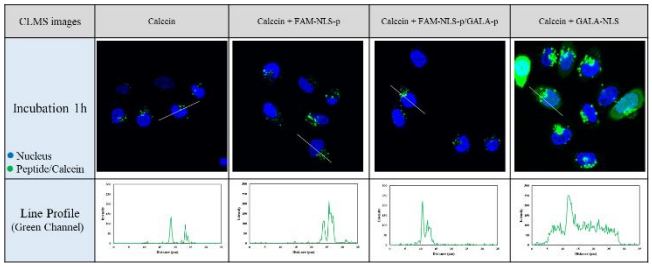


Fig. 2. カルセインの細胞内拡散評価

本研究の一部は、2021 年度龍谷大学科学技術共同研究センタープロジェクト及び科研費 (基盤研究 C : JP20K05713) の支援を受けて実施されたものである。

[1] Tomizaki, K.-Y. et al., *Molecules* **2017**, *22*, 1916.
[2] Subbarao, N. K. et al., *Biochemistry* **1987**, *26*, 2964.

ミトコンドリア移行シグナルペプチドを表面修飾した金ナノロッドの合成

○中村翔也・今井崇人・富﨑欣也（龍谷大理工）

Synthesis of Gold Nanorods Surface-Modified with Mitochondrial Targeting Signal Peptides (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) NAKAMURA, Shoya; IMAI, Takahito; TOMIZAKI, Kin-ya

薬剤をガン細胞に投与すると、薬剤の一部は ABC トランスポーターとよばれる膜タンパク質の働きにより細胞外に放出されるものの、その多くは細胞内に滞留し、薬効を発揮する。しかしながら、ABC トランスポーターが過剰発現した多剤耐性ガン細胞に薬剤を投与すると、大部分の薬剤は細胞外に放出され、薬効が十分に発揮されないという課題が指摘されている。この課題の解決策として、金ナノロッドの近赤外光に対する光熱効果により ABC トランスポーターのエネルギー源であるアデノシン 3 リン酸を産生するミトコンドリアに損傷を与え、薬剤耐性を克服する方法が挙げられる。そこで本研究では、多剤耐性ガン細胞のミトコンドリアに金ナノロッドを送達・集積させることを指向し、ミトコンドリア移行シグナル (MTS) と金ナノロッドの複合体の形成を目的とした。

金ナノロッドの表面修飾に用いる MTS ペプチドとして L-シクロヘキシルアラニン (Cha) と D-アルギニン (DArg) を 3 回くり返したペプチド[1]にリンカーを介してシステインを配置した $(ChaDArg)_3$ をデザインした (Fig.1)。$(ChaDArg)_3$ は Fmoc 固相合成法を用いて合成した。次いで、臭化セチルトリメチルアンモニウムミセルを鋳型として金ナノロッドの合成を行った。さらに、ペプチド-金ナノロッド複合体に親水性および分散性をもたせるためにポリエチレングリコールメチルエチルチオール (PEG-SH) を金ナノロッドの表面に修飾し、その後$(ChaDArg)_3$ ペプチドによる金ナノロッドへの表面修飾を試みた。

Ac - Cha - D-Arg - Cha - D-Arg - Cha - D-Arg - AEEA - AEEA - Aoc(8) - Cys - NH_2

Fig. 1. $(ChaDArg)_3$ の配列

$(ChaDArg)_3$ ペプチドは HPLC 上単一のピークとして得られ、MALDI-TOF-MS にて想定する分子イオンピークが得られたことから目的ペプチドの合成を確認した。次いで、金ナノロッドの形成評価を UV-vis 吸収スペクトルおよび TEM により行った。UV-vis 吸収スペクトルにおいて、金ナノロッドの長軸および短軸由来のプラズモン吸収がそれぞれ 800 および 500 nm 付近にみられた(Fig.2)。また、TEM 画像からロッド形の金ナノ結晶が確認できた(Fig.3)。以上の結果より、金ナノロッドの合成に成功したと考えられる。今後はペプチドおよび PEG-SH を金ナノロッドに修飾し、ゼータ電位および IR 測定を行ってペプチドを表面修飾した金ナノロッドの形態評価を行う予定である。

本研究の一部は、科研費（基盤 C：20K057130002）の支援により実施された。

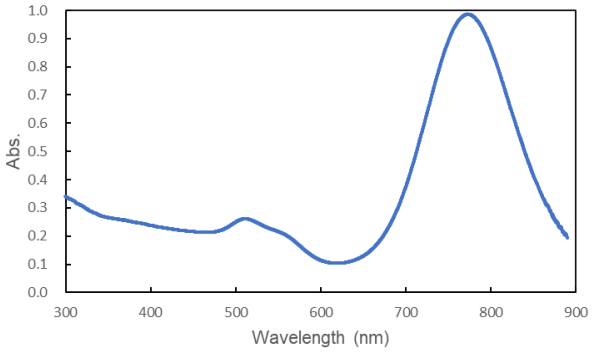


Fig. 2. 金ナノロッドの吸収スペクトル

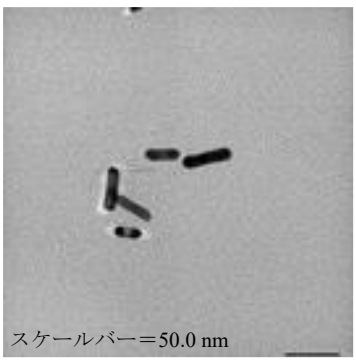


Fig. 3. 金ナノロッドの TEM 画像

[1] Sea Rin Jean.et.al. Mol. Pharmaceutics 2014, 11, 2675–2682

二つの異なる蛍光色素を修飾したタンパク質を構成要素とするハイドロゲルの調製

○印南拓希・大洞光司・林　高史（阪大院工）

Preparation of Hydrogel Containing a Protein Unit Modified by Two Different Fluorophores (Graduate School of Engineering, Osaka University) INNAMI, Hiroki; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

高分子ハイドロゲルは、三次元網目構造を形成する高分子鎖が水和し、膨潤した物質である。多数のハイドロゲルが報告されているが、その中には外部刺激に応答して形状や物性を変化させるものがある。このような刺激応答性ゲルの構築法の一つとして、刺激応答性を有する機能性分子をゲルの構造内部に導入する手法が挙げられ、機能性分子由来のユニークな特性の発現が期待される。例えば、メカノフォアと呼ばれる機械的刺激に応答して吸収・発光特性を変化させる分子と高分子を複合化させた材料は、局所的な応力集中を可視化できることが報告されている[1]。一方で、タンパク質は、温度やpHに応答して構造や物性を変化させる多様な刺激応答性を有するため、ゲルに導入する機能性分子として注目されている。安定な共有結合を介してタンパク質を三次元網目構造中に有するゲルは、マクロな外部刺激をタンパク質のミクロな形状変化として反映するユニークな材料構築が可能であると考えられる。そこで、我々は新しいタイプの応力集中可視化ゲルの開発を目指し、タンパク質の変性と折り畳みに注目した。具体的には、応力集中を定量評価するために、構成要素となるタンパク質に対して、フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）のドナーおよびアクセプターとして機能する二つの異なる蛍光団の導入を試みた。FRETは距離依存性が強いため、タンパク質中に二つの蛍光団を導入すれば、タンパク質の変性と折り畳みに伴う大きな構造変化によって蛍光波長が変化すると予想される。溶液中でのタンパク質の変性と折り畳みに伴うエネルギー変化とそれに伴うFRETの蛍光変化を関連づけることで、ゲルへの応力に伴う局所的なエネルギー変化の定量的な可視化が期待される。

ハイドロゲルの構成要素として用いるタンパク質としてβ-ラクトグロブリンを用い、タンパク質に導入するドナーおよびアクセプター蛍光色素としてフルオレセインとテトラメチルローダミンをそれぞれ選択した。まずβ-ラクトグロブリンに一つだけ存在するフリーのシステイン残基を標的とし、マレイミド基を有するフルオレセイン誘導体を修飾した。次にタンパク質のN末端を既報に従ってアジド化[2]した後に、ジベンゾシクロオクチン（DBCO）を有するテトラメチルローダミン誘導体を歪み解消型クリック反応を用いて導入した。得られたβ-ラクトグロブリンを質量分析法および分光学的手法により評価した。本発表では、さらにβ-ラクトグロブリン表面に多数存在するリジン残基と、グルタルアルデヒドの反応を利用したハイドロゲルの調製について報告する。

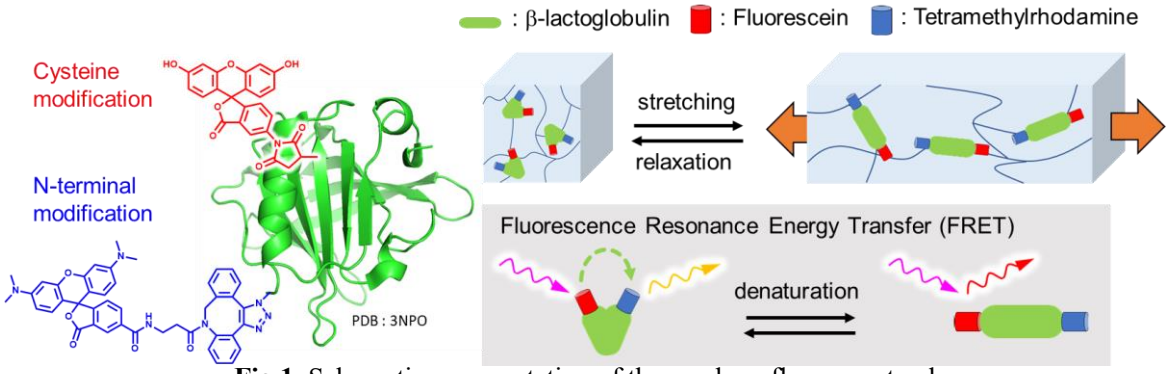


Fig 1. Schematic representation of the mechanofluorescent gel

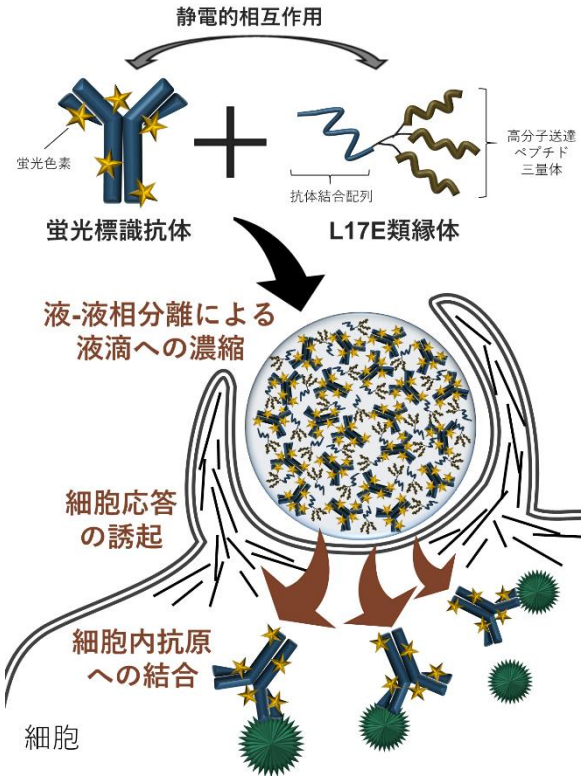
1) Y. Sagara *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*, 5519-5525.
2) S. Schoffelen *et al.*, *Chem. Sci.*, **2011**, *2*, 701-705.

液-液相分離による抗体と高分子送達ペプチドの濃縮と抗体の細胞内送達

○岩田恭宗、広瀬久昭、坂本健太郎、平井勇祐、Jan Vincent V. Arafiles、
秋柴美沙穂、今西未来、二木史朗　（京大化研）

Condensation of Antibodies and Macromolecule Delivery Peptides into Liquid Droplets by Liquid-Liquid Phase Separation and Intracellular Delivery of Antibodies (Institute for Chemical Research, Kyoto University) IWATA, Takahiro; HIROSE, Hisaaki; SAKAMOTO, Kentarou; HIRAI, Yusuke; ARAFILES, Jan Vincent V.; AKISHIBA, Misao; IMANISHI, Miki; FUTAKI, Shiroh

抗体は優れた抗原認識能を有しており、生命科学分野における分子解析ツールとして用いられているだけでなく、分子標的薬としての開発が進んでいる。しかし抗体はサイズの大きさ (約 150 kDa) や親水性のために細胞膜を透過することができず、細胞内分子を標的とすることは困難である。そのため、抗体医薬品の利用は細胞外分子を標的とするものに限られている。抗体を効率よく細胞内へと送達する手法を開発することができれば、抗体医薬品の適用範囲を細胞内分子にまで拡張することが可能である。当研究室では溶血性ペプチド M-lycotoxin の配列を改変した高分子送達ペプチド“L17E”を開発した[1]。L17E により抗体を含む高分子を効率よく細胞内へと送達することが可能となった。しかし、L17E による効果的な細胞内送達と抗体の細胞内での標的認識を達成するためには両者ともに高濃度で投与しなければならず (L17E 40 μM, IgG 0.5-1 mg/mL)、細胞生物学などの基礎研究への適用や臨床応用を見据えると、L17E と抗体がより低濃度で効率的に細胞内に送達可能な手法の開発が求められる。



我々は、抗体の効率のよい細胞内送達を実現するためには膜近傍での抗体と L17E の局所濃度の増加が重要であるという仮説を立てた。そこで、L17E の局所濃度の増加のために L17E を多量体化させ、抗体との複合体形成のために抗体に結合親和性を持つペプチド配列を付与した L17E 類縁体を作製した。作製した L17E 類縁体を用いることで L17E よりも低いペプチドおよび抗体濃度で蛍光標識抗体を細胞内に効率よく導入することに成功した。また、その送達様式は元来の想定とは異なり、L17E 類縁体と蛍光標識抗体が静電的相互作用により液-液相分離を引き起こすことが重要であるということが分かった[2]。

L17E 類縁体による抗体の細胞内送達メカニズムの詳細等についても本発表にて説明したい。

[1] Akishiba, M. *et al*., *Nat. Chem*., *9*. 751-761 (2017)
[2] Iwata, T. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed*., in press. DOI: 10.1002/anie.202105527

2′-β-プロパルギルセレノヌクレオシドを用いた逆転写酵素不可逆阻害の機構解析

○吉田祐希[1]・新美結士[1]・伏原大地[1]・村瀬裕貴[1]・木村康明[1]・阿部洋[1, 2, 3]（[1]名大院理、[2]JST CREST、[3]iGCORE）

Mechanistic Study of Irreversible Inhibition of Reverse Transcriptase with 2′-β-propargyl-seleno Nucleoside Analogue. (Graduate School of Science, Nagoya University[1], JST CREST[2], iGCORE[3]) YOSHIDA, Yuki[1]; NIMI, Yushi; FUSHIHARA, Daichi[1]; MURASE, Hirotaka[1]; KIMURA, Yasuaki[1]; ABE, Hiroshi[1, 2, 3]

DNA や RNA といった核酸の構成要素であるヌクレオシドは、遺伝情報の保存のみならず、代謝の調節など様々な機能を持つ重要な生体分子である。天然のヌクレオシドはリボースの糖部と核酸塩基部からなる構造を持つ。この構造を模倣したヌクレオシドアナログはウイルス性疾患の治療薬として研究開発が行われている。AIDS や B 型肝炎などの重篤な疾患に対しても、逆転写酵素を標的として様々なヌクレオシドアナログが抗ウイルス薬として開発されてきた。しかしながら、それらの多くは DNA 鎖の伸長を停止させるだけであり、逆転写酵素を本質的には阻害していないため、複製阻害効果は一過性である。さらに、HIV のような複製エラーが起こりやすいウイルスでは薬剤耐性株の出現も問題になっており、新規の阻害形式を持つ逆転写酵素阻害剤の開発が強く求められる。

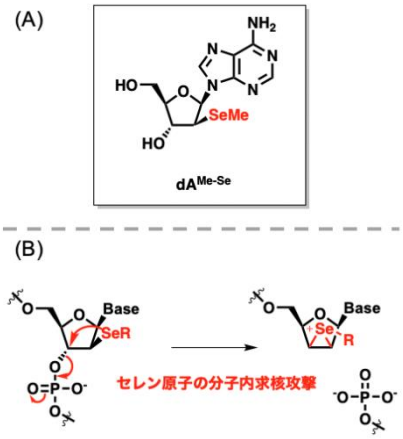
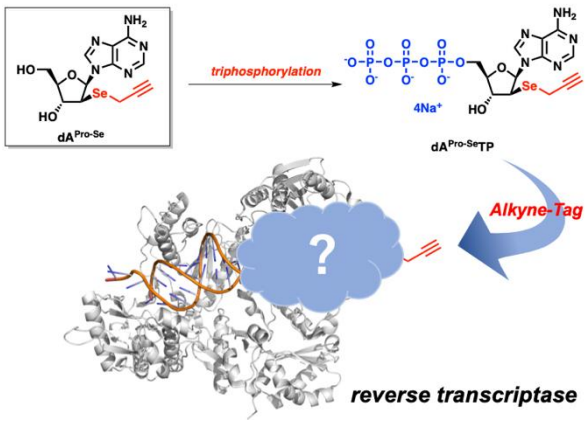


図 1. (A) $dA^{Me\text{-}Se}$ の構造
(B) DNA 鎖切断メカニズム

そこで当研究室では新たな阻害形式を期待して、デオキシアデノシンの 2′-β 位にメチルセラニル基を導入した 2′-deoxy-2′-β-methyl-selanyladenosine ($dA^{Me\text{-}Se}$) を合成した (**図 1 (A)**)。この $dA^{Me\text{-}Se}$ は逆転写酵素による伸長中の DNA に取り込まれた際、3′位のリン酸化を引き金にしてセレン原子が 3′位に求核攻撃し、鎖切断を引き起こすことが見出された (**図 1 (B)**)。さらに、鎖切断に伴い求電子性の高いカチオン性セレニラン環を形成することで逆転写酵素の活性部位近傍のアミノ酸残基と反応し、逆転写酵素に対する共有結合阻害も期待された。実際に、$dA^{Me\text{-}Se}$ を三リン酸化した $dA^{Me\text{-}Se}TP$ は AMV 逆転写酵素を不可逆的に阻害することが一塩基伸長アッセイにより明らかとなった。しかし、共有結合を形成した逆転写酵素のアミノ酸残基や活性種であるカチオン性セレニラン環の反応点は不明であり、詳細な不可逆阻害メカニズムは明らかになっていない。

本研究では 2′-β-セレン修飾ヌクレオシドの不可逆阻害メカニズムを解明するために、2′-deoxy-2′-β-propargyl-selanyladenosine ($dA^{Pro\text{-}Se}$)を設計し (**図 2**)、それを用いて逆転写酵素に対する共有結合形成様式の解明に取り組んだ。$dA^{Pro\text{-}Se}$ の三リン酸体は、逆転写酵素により伸長中の DNA 鎖に取り込まれると、図 1 (B)のメカニズムに基づき、逆転写酵素に対してアルキンタグ化が行われると考えられる。このアルキンタグ化された逆転写酵素に対してアジ化デスチオビオチンで Huisgen 環化付加反応によってビオチンラベル化し、affinity 精製により反応した逆転写酵素を回収する。現在 affinity 精製の条件最適化と単離されたタンパク質の MS 解析を進めている。発表ではその詳細について報告を行う予定である。



核酸医薬への応用を指向した Staple 核酸の短鎖化および安定性の追求

○木田朋輝[1]・勝田陽介[1]・嘉村匠人[1]・北村祐介[1]・萩原正規[2]・佐藤慎一[3]・井原敏博[1] ([1] 熊本大学大学院先端科学研究部、[2] 弘前大学理工学部、[3] 京都大学化学研究所)

Pursuit of shorten and stability of Staple oligomer for application to a nucleic acid medicine (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University[1], Faculty of Science and Technology, Hirosaki University[2], Institute for Chemical Research, Kyoto University[3]) KIDA, Tomoki[1]; KATSUDA, Yousuke[1]; KAMURA, Takuto[1]; KITAMURA, Yusuke[1]; HAGIHARA, Masaki[2]; SATO, Shin-ichi[3]; IHARA, Toshihiro[1])

核酸医薬は、低分子医薬や抗体医薬では狙うことが難しい mRNA を標的とすることが可能であることから、希少疾患の治療を可能とする新しい創薬モダリティとして大きな注目を集めている。一方、薬価が高いことが問題の一つとして挙げられており、医薬品としての品質を満たす核酸医薬を 100g 合成する場合には、天然塩基のみで構成した場合においても約 21 億円の費用がかかるとされている。従って核酸医薬の一般的な利用を拡大させるために、①投与核酸を短鎖化することで合成コストを削減する、②核酸医薬の生体内安定性を向上させ導入核酸を少量化する、という二点を考慮することが必須である。しかし、①の短鎖化に関しては、既存の標的 mRNA 切断型遺伝子発現抑制技術では導入する核酸を短鎖化することで標的 mRNA への結合に基づく副作用（オフターゲット効果）が顕著化してしまい、②の少量化に関しては、生体内安定性を向上させることが知られている人工核酸（Xeno Nucleic Acids：XNAs）を使用することで標的 mRNA 切断酵素に対する基質能が大きく低下し薬効が減弱するジレンマに挟まれる。

このような背景から、我々のグループは Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を用いて、RNA G-quadruplex（RGq）の形成を誘導し、標的遺伝子の発現を抑制する技術を開発した。本技術は、Staple 核酸が RGq の形成に必要なグアニン繰り返し配列近傍に結合することで機序を発動することから、標的外配列に結合して遺伝子発現制御機能を作動することはない。従って、Staple 核酸の短鎖化に伴うオフターゲット効果は限りなく弱いことが想定される。また、Staple 核酸は mRNA 切断酵素の基質となる必要はなく、使用する XNAs の位置および数に制限がない（**Fig. 1**）。標的 mRNA 切断型の核酸医薬で多く見られる Gapmer やヘテロ核酸とは異なるアプローチで核酸の医薬品化を目指すことが可能となる。

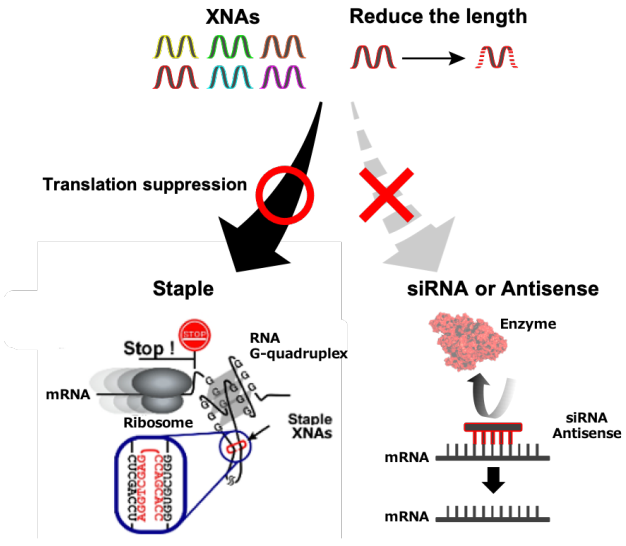


Fig. 1 The concept of Staple systems.

本発表では、種々の長さに短鎖化した Staple 核酸の RGq 形成誘導および XNAs を利用した Staple 核酸（Staple XNAs）の遺伝子発現抑制効果に関して報告する。

効率的な遺伝子発現能を有する超巨大人工細胞の構築を目的とした超巨大リポソーム調製法の改良

○高橋萌・小川敦司（愛媛大 PROS）

Improvement of the method for preparing super-giant liposomes to construct a giant artificial cell capable of efficient gene expression in the interior (Proteo-Science Center, Ehime University) TAKAHASHI, Hajime; OGAWA, Atsushi

【緒言】人工細胞は、現時点では、生細胞機能の一部（遺伝子発現など）を模倣する小胞のことを指し、リポソームなどのカプセルに特定の生体分子を封入することで作製できる。人工細胞のカプセルには、生細胞サイズの巨大リポソーム（GUV, 直径 1～200 μm）がよく使用されており、これまでに幾つかの GUV 調製法が報告されている。中でも「water-in-oil（W/O）エマルジョン界面通過法」が簡便で、リン脂質を含む油相（上相）の W/O エマルジョン（リン脂質逆ミセル）を、リン脂質単分子膜（油水界面）下の水相（下相）に移すだけで、簡単にリポソームを調製できる。逆ミセルの油水界面通過には一般的に遠心沈降が用いられるが、リポソームが破裂や融合するのを避けるために、逆ミセルに高密度溶質を封入することで、水相との密度差により自発的に界面を通過させることも可能である。特に、後者の自発通過法を用いれば、リポソームのサイズを制御できるだけでなく、肉眼観察可能な直径数 mm の超巨大リポソーム（SGUV）も調製できる。GUV に比して SGUV は、サイズ・量を厳密制御できることや観察が容易であるといった利点があるが、リポソーム内の高密度溶質が生化学反応（特に遺伝子発現）を阻害してしまう問題もあってか、人工細胞のカプセルとしては使用されてこなかった。そこで本研究では、SGUV の調製法を改良することで、コムギ無細胞系を“活性を保ったまま”SGUV に封入し、高効率な遺伝子発現活性を有する SGUV サイズの超巨大人工細胞の作製を試みた。

【実験】SGUV を調製するには、逆ミセル内にコムギ無細胞系とともに高密度溶質（スクロースなど）を封入する必要があり、既報告の条件下では遺伝子発現が大幅に阻害されてしまう。そこで、初めに、コムギ無細胞系における黄色蛍光タンパク質（YPet）の発現を 20%以上阻害しない最大のスクロース濃度を調査した。次に、当該スクロース濃度下でコムギ無細胞系を封入するための SGUV の調製条件（油相ならびに水相の組成、温度条件）を最適化した。さらに、最適条件下で形成させたコムギ無細胞系封入 SGUV の内部で YPet を発現させ、SGUV 外の YPet 発現量と比較することで、SGUV 内の発現効率を評価した。

【結果】コムギ無細胞系の遺伝子発現を阻害しない最大スクロース濃度は約 1.5%で、既報告の SGUV 形成条件（約 30%）に比して極めて低濃度であった。1.5%スクロース濃度下では逆ミセルと水相の密度差が小さく、SGUV の調製は困難を極めたが、油相・水相組成および温度条件を最適化することで、安定なコムギ無細胞系封入 SGUV（直径 1.7 mm）の調製に成功した（存在時間: 約 60 min 以上、調製確率: 90%以上）。また、最適条件下で調製した SGUV の内部における YPet の発現効率は、SGUV の外部における YPet の発現効率と同等であった（**Fig. 1**）[1]。

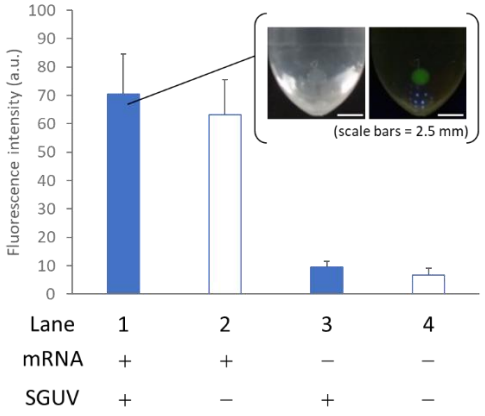


Fig. 1 SGUV 内外におけるコムギ無細胞系の YPet 遺伝子発現効率の比較
（写真左: 可視光 image、右: 蛍光 image）

1) *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9*, 1608-1614.

Poster(first day)

Wed. Sep 8, 2021 5:50 PM - 6:50 PM JST | Wed. Sep 8, 2021 8:50 AM - 9:50 AM UTC | Second half number Zoom

Even (1P-050~1P-094)

[1P-050] Investigation for effect of epigenetic modification on LLPS of nucleic acid

*Mitsuki Tsuruta[1], Daisuke Miyoshi[1] (1. Konan univ. FIRST)

[1P-052] Development of dicopper(II) complexes exerting cancer-cell selective toxicity: electronic effect of substituents

*Jin Ueno[1], Machi Hata[1], Yutaka Hitomi[1], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[1P-054] Development of replication, transcription, and reverse transcription of L-*a*TNA by non-enzymatic chemical ligation

*Hikari Okita[1], Keiji Murayama[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[1P-056] Ratiometric SERS assays for reliable quantification of nucleic acids using SERS probes as internal standard.

*Kenta Sasaki[1], Ryo Ota[1], Tomonori Waku[1], Akio Kobori[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology)

[1P-058] DNA Origami as scaffolds to assemble quantifiable channel proteins on artifical organelles

*Shiwei Zhang[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Kyoto university)

[1P-060] Development of Functional Oligonucleotide for Highly Sensitive Metabolite Detection

*Yuto Motohashi[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[1P-062] Development of novel FISH by ultrafast RNA photo-cross-linking targeting difficult-to-detect regions in E. coli 16S rRNA

*Junichi Mihara[1], Nanami Watanabe[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. School of Advanced Institute Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[1P-064] Development of novel visible light-responsive DNA photo-cross-linker containing pyranocarbazole derivatives

*Yasuyuki narita Narita[1], Junichi Mihara[1], Shinobu Sasago[1], Kenzou Fujimoto[1] (1. School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[1P-066] Guanine-Tethered Antisenses Inhibit Protein Synthesis Through G-Quadruplex Formation

*Shuhei Shiroto[1], Masaki Hagihara[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University)

[1P-068] Development of Luminescent Probe for Visualization of Endogenous RNA in Living Single Cells

*Masatoshi Eguchi[1], Hideaki Yoshimura[1], Yoshibumi Ueda[1], Takeaki Ozawa[1] (1. School of Science, The University of Tokyo)

[1P-070] Development of evaluation method for intercellular cross-linking abilities to obtain functional bispecific antibodies

*Atsushi MAEJIMA[1], Kenta Ishibashi[1], Hyonchol Kim[1,2], Izumi Kumagai[1], Ryutaro Asano[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[1P-072] Development of cell-arraying device filled with silica particles for capturing cancer cell-secreted proteins toward single cell analysis

*Rina Nishikawa[1], Kento Ota[1], Yoshiaki Maeda[1], Keiichi Hatakeyama[2], Tomoko Yoshino[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Department of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Medical Genetics Division, Shizuoka Cancer Center Hospital and Research Institute)

[1P-074] Exploitation of a hydrolase as an orthogonal enzyme to human cells for bioanalysis

*Ryosuke Kaneko[1], Chuya Tateishi[2], Kenta Tanito[2], Teruki Nii[1,2], Akihiro Kishimura[1,2,3], Takeshi Mori[1,2], Yoshiki Katayama[1,2,3] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. School of SystGraduateems Life Sciences, Kyushu University, 3. International Research Center for Molecular Systems, Kyushu University)

[1P-076] Construction of Redox Responsive Hydrogel Cross-linked by Interaction between Heme and Protein Matrix

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

[1P-078] Optical Properties of Chlorophyll Aggregates Assisted by Chlorophyll-Appended Peptides

*Ma-aya Semba[1], Ryuichi Yamamoto[1], Tomohiro Miyatake[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University)

[1P-080] Protein Encapsulation within an Expanded Self-assembled Hollow Cage

*Risa Ebihara[1], Takahiro Nakama[1], Daishi Fujita[2], Makoto Fujita[1,3] (1. The University of Tokyo, 2. Kyoto University, 3. Institute for Molecular Science)

[1P-082] Design and construction of the three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion

*Kodai Fujiwara[1], Masaru Yamanaka[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Haruki Onishi[1], Takayuki Uchihashi[2], Shun Hirota[1] (1. Division of Materials Science, Nara institute of science and technology, 2. Graduate School of Science, Nagoya University)

[1P-084] Apoptotic activity of ceramide derivative towards living cells

*Koya Tsujimura[1] (1. Graduate School of Science, Kyushu University)

[1P-086] Development of multivalent electrophilic probes for exploring carbohydrate binding proteins.

*Shione Kamoshita[1], Kaori Sakurai[1] (1. Engineering, Tokyo University of Agriculture and technology)

[1P-088] Complex of porphyrin derivatives with polysaccharides for photodynamic therapy

*Keita Yamana[1], Riku Kawasaki[1], kouta Sugikawa[1], Atsushi Ikeda[1] (1. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University)

[1P-090] Creation of a transdermal malaria vaccine using next-generation transdermal absorption technology

*Keisuke Tanaka[1], Kosuke Minamihata[2], Rie Wakabayashi[2,3], Noriho Kamiya[2,3,4], Masahiro Goto[2,3,4] (1. Kyushu University Graduate School of Engineering, 2. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 3. Next Generation Transdermal Absorption Center, 4. Center for Future Chemistry and Innovation)

[1P-092] Transcriptome and genome mutation analysis of non-small cell lung cancer for elucidation of cell diversity in cancer microenvironment after EGFR-TKI treatment

*Miki Yamazaki[1,2], Hiroko Matsunaga[3], Masahito Hosokawa[1,3], Koji Arikawa[3], Naoko Suzuki[3], Takuo Hayashi[4], Haruko Takeyama[1,2,3,5] (1. Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 2. CBBD-OIL, AIST-Waseda University, 3. Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University , 4. Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Department of Human Pathology, Graduate School of Medicine, Juntendo University, 5. Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

[1P-094] Synthesis of An Anthracene Derivative with Selective Gold Recovery Mechanism

*Shungo Teramura[1], Takahito Imai[1], Masahiro Asano[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Department of Materials Chemistry, Ryukoku University)

核酸の液液相分離現象に及ぼすエピジェネティック修飾効果の検討

○鶴田充生・三好大輔（甲南大 FIRST）

Investigation for effect of epigenetic modification on LLPS of nucleic acid (*Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University*) TSURUTA, Mitsuki; MIYOSHI, Daisuke

液液相分離現象（Liquid-liquid phase separation: LLPS）は新たな細胞内反応の調節機構として注目されている [1]。LLPS はタンパク質や核酸が、静電相互作用やカチオン - π 相互作用、スタッキング相互作用などの弱い相互作用を介してネットワーク構造を形成することで誘起される。LLPS に関与するタンパク質はプリオン様ドメインや RGG ドメイン、SYGQ リッチドメインなどの low-complexity ドメインを含むことが知られている。特に、RGG ドメインをもつタンパク質である FUS や FMRP は、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭型認知症（ALS/FTD）と脆弱 X 関連振戦/失調症候群（FXTAS）の発症に関与している [2]。さらに、これらのタンパク質をコードしている遺伝子は GGC や GGGGCC の反復配列を有している。反復配列の異常伸長が、疾患発症主因であるが、興味深いことに、伸長に伴ってシトシンのメチル化も同時に亢進されることが知られている。

本研究では、FMRP の RGG ドメイン由来のモデルペプチド（RGG peptide）と *FMRP* 由来の四重らせん構造（G4）形成配列（FMR1 DNA: $d(G_2C)_4$）を用いて LLPS のモデル系の構築を試みた。その結果、RGG peptide との LLPS には G4 構造が必須であることが明らかとなった（Fig.）。また、シトシンのメチル化はシトシンとグアニンリッチな染色体領域である CpG アイランド上で豊富に存在する [3]。シトシンメチル化は遺伝子発現の制御や細胞のがん化と関係していることが知られている。そこで、G4 のループに存在するシトシンにメチル基を導入することで、G4 形成 DNA のメチル化による LLPS 能への影響を検討した。その結果、導入されたメチル基の数が増加するに伴い、LLPS 能が低下することが見いだされた。本発表では G4 構造へのシトシンメチル化の影響についても議論する。

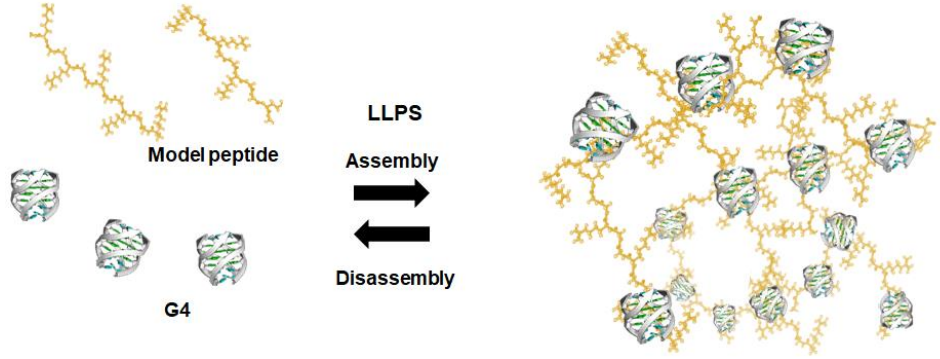


Figure. LLPS induced by G4DNA and model peptide using in this study.

References
1 Kohata K., Miyoshi D., (2020) *Biophys.*, **12**, 669-676.
2 a) Ash P. E. A., Bieniek K. F., Gendron T. F. *et al.*, (2013) *Neuron*, **77**, 639-646. b) Jain A., Vale R. D., (2017) *Nature*, **546**, 243-247.
3) Holliday R., Pugh J. E., (1975) *Science* 187, 226-232.

がん細胞選択的毒性を示す二核銅(II)錯体の開発：置換基の電子効果

○上野ジン・畑真知・人見穣・小寺政人（同志社大院理工）

Development of dicopper(II) complexes exerting cancer-cell selective toxicity: electronic effect of substituents (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) UENO, Jin; HATA, Machi; HITOMI, Yutaka; KODERA, Masahito

シスプラチンやブレオマイシンなど，既存の金属錯体によるがん治療は，正常細胞の DNA に対しても同様に作用し，深刻な副作用を引き起こす．この問題の解決のため，我々はがん細胞の特異環境において高い DNA 切断活性を有し，がん細胞選択的な細胞毒性を示す金属錯体の開発を目指してきた．その中で *p*-cresol の 2,6 位に $dpa^{4\text{-}X}$ を amide-tether で導入した $Hbdpamide^{4\text{-}X}$ 配位子($HL^{4\text{-}X}$)の二核銅(II)錯体$[Cu_2(\mu\text{-}OAc)_2(L^{4\text{-}X})]^+$ [X = H(**1**), Cl(**2**), OMe(**3**)]が高い DNA 切断活性を示すことを見出した．錯体 **1**-**3** は還元剤存在下の O_2 活性化や H_2O_2 を用いた DNA 切断において高い活性を示した．H_2O_2 を用いた DNA 切断では，電子求引性基であるクロロ基が置換した錯体 **2** が最も高い活性を示した．しかし，**2** は正常細胞に対して細胞毒性が高く，がん細胞選択性を示さなかった．一方，電子供与性基であるメトキシ基が置換した錯体 **3** は，H_2O_2 を用いた DNA 切断では **1** よりも活性が低下したが，がん細胞選択的毒性を示した．これらの結果は，置換基の電子効果が様々な活性に影響を与えることを示しており，特に電子供与性基の導入はがん細胞選択的に細胞死を導くことを示唆した．そこで本研究では，さらに高いがん細胞選択性を示す金属錯体の開発を目指して，メトキシ基よりさらに電子供与性が高いジメチルアミノ基(X =NMe_2)を導入した新規二核化配位子とその二核銅(II)錯体(**4**)を合成し，この錯体の DNA 切断活性や細胞毒性を評価した．

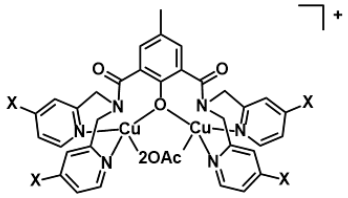


Fig 1. Chemical structures of $[Cu_2(\mu\text{-}OAc)_2(L^{4\text{-}X})]^+$ [X = H (**1**), Cl (**2**), OMe (**3**), and NMe_2 (**4**)].

低 pH 条件下における H_2O_2 による **1**-**4** の DNA 切断活性の測定結果を Fig. 2 に示す．**4** は **1**-**3** と比較して DNA 切断速度が遅く，活性が低下するということが明らかとなった．先行研究との結果を合わせると，電子供与性基によって金属中心が電子豊富となり，そのルイス酸性が低下することは H_2O_2 による DNA 切断活性を低下させると考えられる．今後，**4** を用いたがん細胞および正常細胞に対する細胞毒性を測定することで，この錯体ががん細胞選択的な細胞毒性を有しているのかを明らかにする予定である．

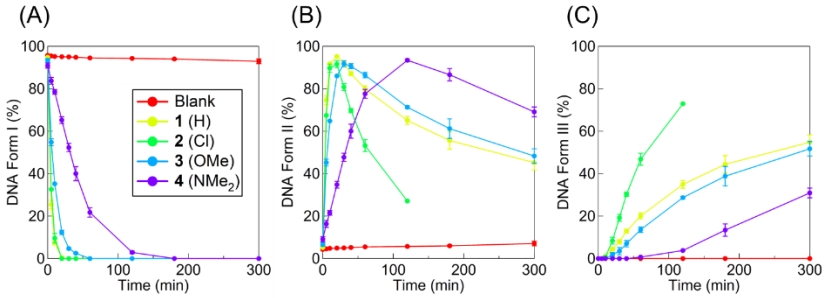


Fig 2. Time courses for Form I (A), Form II (B), and Form III (C) upon reaction of pUC19 DNA (50 μM bp) with H_2O_2 (50 μM) promoted by **1**-**4** (30 μM) under the reaction conditions containing NaCl (10 mM), and $Cu(OAc)_2$ (70 μM) at pH 6.0 (MES 10 mM) at 37°C.

©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

非酵素的な化学連結法を用いた人工核酸 L-*a*TNA の配列複製・転写・逆転写法の構築

○沖田ひかり・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

Development of replication, transcription, and reverse transcription of L-*a*TNA by non-enzymatic chemical ligation (Graduate School of Engineering, Nagoya University) OKITA, Hikari; MURAYAMA, Keiji; ASANUMA, Hiroyuki

当研究室では DNA のリボース骨格を鎖状骨格に改変することで極めて高い酵素耐性を有した非環状型人工核酸を創出してきた。中でも L-スレオニノールを主骨格とする L-*a*TNA (*acyclic* L-threoninol nucleic acid)は DNA 二重鎖と比較して、非常に安定な L-*a*TNA 二重鎖を形成することが明らかになっている[1]。また、DNA や RNA ともヘテロな二重鎖形成が可能であることが確認されているため、核酸医薬や蛍光プローブなどの多様な生物学的ツールとしての応用が期待されている(Fig. 1)。一方で、L-*a*TNA は酵素に認識されないため、酵素反応へ応用することが困難であった。

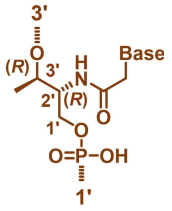


Fig. 1. Chemical structure of L-*a*TNA.

そこで、本研究では非酵素的な化学連結法を用いて L-*a*TNA の鋳型合成法の開発を行った。具体的には酵素の代わりにリン酸基と水酸基を結合させる縮合剤 *N*-Cyanoimidazole とマンガンイオン(Mn^{2+})を用いて、(1)L-*a*TNA の配列複製や(2)天然核酸から L-*a*TNA への逆転写、(3)L-*a*TNA から天然核酸への転写反応の開発に注力した。

(1) 配列複製では 17-mer の鋳型 L-*a*TNA (**T17t**)上で、8-mer の L-*a*TNA プライマー(反応開始鎖: **T8A**)と鋳型鎖に相補的な 3-mer の L-*a*TNA 断片を 3 種類(**T3B1・T3B2・T3B3**)加えて、連結反応を試みた(Fig. 2)。その結果、反応開始から 8h 後には目的の 17-mer の **T8A+T3B1+T3B2+T3B3** 鎖が収率 90%で生成されることが明らかになった[2]。さらに、3 種類の 3-mer 断片の代わりに 3-mer の L-*a*TNA ランダム配列プールを用いた場合でも目的の L-*a*TNA 鎖を配列特異的に合成できることを確認した(Fig. 2)。これは、酵素を用いずに非環状型人工核酸の配列複製に成功したはじめての例である。

(2) (1)と同様の手法で 17-mer の天然核酸(DNA または RNA)を鋳型とし、3 種類の 3-mer L-*a*TNA 断片を用いて L-*a*TNA 鎖の配列合成を行う逆転写反応を試みた結果、DNA の鋳型鎖、RNA の鋳型鎖上でともに 3 種類の L-*a*TNA 断片が逐次的に連結した。さらに RNA 鎖の場合、L-*a*TNA のランダム配列プールを基質として用いた場合でも高効率に連結反応が進行することが明らかになった。

(3) 最後に 17-mer の L-*a*TNA 鎖を鋳型として、8-mer の天然核酸断片を連結させる転写反応を試みた結果、DNA 鎖は極低収率で進行したが、RNA 鎖では全く反応が進行しなかった。そこで、二価金属イオンを検討したところ、わずかではあるが RNA 鎖の連結反応の進行が確認された。

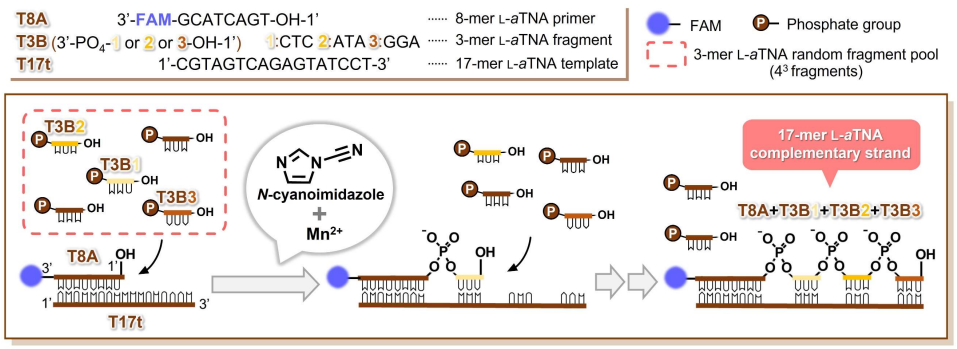


Fig. 2. Replication of L-*a*TNA by chemical ligation reaction using *N*-cyanoimidazole and Mn^{2+}

今後、L-*a*TNA の非酵素的な鋳型合成法を高効率化できれば、SELEX 法による L-*a*TNA のアプタマー探索やプレ RNA ワールド研究が実現可能になると考える。

1) K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 6500-6503.
2) K. Murayama, H. Okita, T. Kuriki, H. Asanuma, *Nat. Commun.*, **2021**, *12*, 804.

©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

内部標準を利用した SERS シグナルの規格化と核酸定量への応用

○佐々木健太・太田良・和久友則・小堀哲生（京工繊大院工芸）

Ratiometric SERS assays for reliable quantification of nucleic acids using SERS probes as internal standard. (Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology) SASAKI, Kenta; OTA, Ryo; WAKU, Tomonori; KOBORI, Akio

体液中の核酸は様々な疾患の診断・予後・治療効果予測に利用可能な診断マーカーとして注目を集めている。現在、核酸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することができるという利点をもつが、測定サンプル中の夾雑物の除去や酵素反応を用いた核酸増幅に長い時間が必要であるため、疾患診断法として汎用されていない。近年、表面増強ラマン散乱（SERS）を利用した核酸検出法が定量 PCR 法に変わる新たな検出法として期待されている。SERS は金属表面上に吸着した分子のラマン散乱光を 10^8–10^{10} 倍に増強することが可能である。しかし、SERS はシグナルの再現性が乏しく、正確な SERS スペクトルを得るためには、熟練した技術者が必要であるため、定量分析にはほとんど応用されていない。そこで、我々は SERS シグナルの再現性向上を目指し、内部標準によってシグナル強度を補正可能な 2 種類の SERS プローブ（SERS プローブ 1, SERS プローブ 2）を開発した（Fig. 1）[1]。

SERS プローブ 1, 2 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（PEP: ●, EP（内部標準）: ●）を導入した。また、SERS プローブ 1, 2 に導入する核酸は標的核酸を介して核酸三元系を形成するように設計した。さらに、この三元系を固相上に集積させるために、SERS プローブ 2 はシリカビーズ上に固定化した。

SERS プローブ 1, 2 を用いて核酸検出を行ったところ、PEP のシグナル強度は標的核酸の濃度に依存して増加した。また、EP で PEP のシグナルを補正することで、決定係数 R^2 が 0.83 から 0.98 に向上した上、検出限界も 390 pM から 86 pM に向上した（Fig. 2）。さらに、本定量法を利用して、熟練した技術者を必要としない簡便な SERS 測定に成功した。

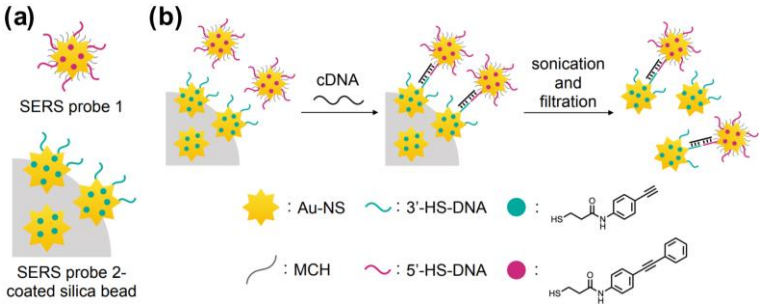


Figure 1. (a) SERS probe 1 and SERS probe 2-coated silica beads for ratiometric SERS assays. (b) Procedures for detecting target DNA using SERS probe 1 and SERS probe 2-coated silica beads.

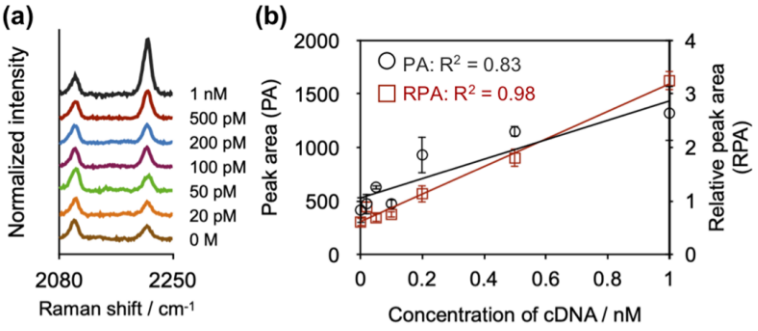


Figure 2. (a) Raman spectra of ratiometric SERS assay with different concentrations of **cDNA** (0 to 1 nM). (b) PA (black circle) and RPA (red cube) of PEP as functions of the different concentrations of **cDNA**. The error bars indicate the standard deviations calculated from five measurements. PA: peak area, RPA: relative peak area.

1) R. Ota, *et al*., *Chem. Lett.*, **50**, 513–517, (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

DNA Origami as scaffolds to assemble quantifiable channel proteins on artifical organelles

(Institute of Advanced Enengy, Kyoto University[1]) ZHANG, Shiwei[1], NAKATA, Eiji[1], MORII, Takashi[1]

Inside cells, complex metabolic reactions are highly organized and distributd into different organelles which allows a better control over the biological processes[1]. There are some additional advantages in this case. For example, many cascade reactions suffer from incompatibilities such as cross-inhibitions or inactivations by components of the reaction system[2]. Furthermore, spatially arranged enzymes can be observed in organelles which enhance the efficiency of multistep processes. Controlling the permeability of membranes with channel proteins ensures that the substrate and the reaction product can passively diffuse through the membrane. Up to now, the available channel protein that has been successfully inserted in artifical organelles (AO) is rather limited and most of the studies have been focusing on unspecific porins with molecular mass cut-offs (MMCO) such as the Outer Membrane Protein F (OmpF) from *Escherichia coli* (MMCO: 600 Da)[3]. However, information on integration efficiencies and channels per AO are generally scarce and often phenomenological, because the integration efficiency is not 100%[4]. To overcome this problem, a method which can locate the channel proteins on the menbrane of artifical organelles in high loading yields with control of the number is highly required.

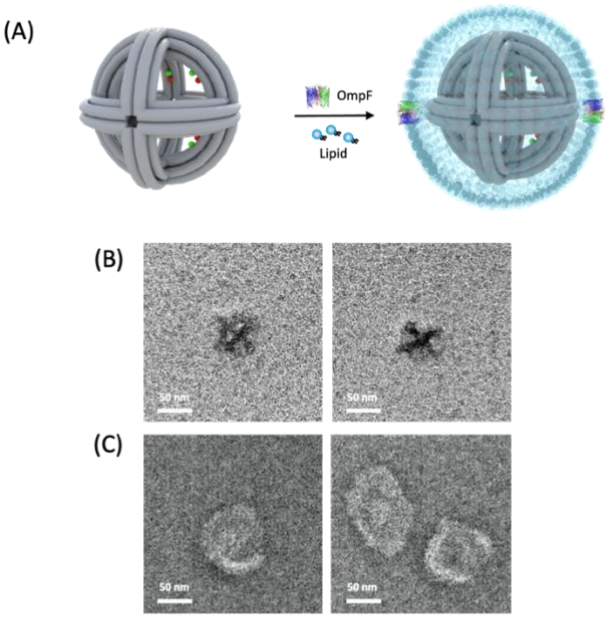


Figure 1. (A) Liposomes and channel proteins are added to Lipid-DNA conjugated DNA origami in a surfactant solution, resulting in mixed surfactant lipid micelles. Dialysis selectively removes the surfactant and results in a fused lipid bilayer around the nanostructure. (B) TEM images of origami, (C) TEM images of encapsulated origami. (scale bar = 50 nm).

In this study, a spherical DNA nanostructure encapsulated by liposome used to attach the channel proteins was designed following previous work published by Perrault et al[5]. Sequence-specific DNA-binding proteins, the zinc finger protein (zif268) as adaptors to stably locate the channel protein (OmpF) on the DNA origami scaffold. We measured internalized DNA origami diameters of 58.6 ± 5.5 nm and outer membrane diameters of 81.6 ± 10.1 nm from TEM images. In ongoing work we have started assembling OmpF by binding adaptor to control and improve the number on scaffold.

Reference: 1) R. J. R. W. Peters, J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.* **3**, 335-342 (2012); 2) E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **6**. 2393–2397 (2016); 3) E. Christoph, C. G. Palivan, *Nano Lett.* **17**, 5790-5798 (2017); 4) F. Itel, W. Meier, *Nano Lett.* **1**5. 3871–3878 (2015); 5) S. D. Perrault, W. M. Shih, *ACS Nano*. **8**, 5132-5140 (2014)

代謝物の超高感度検出を可能にする機能性人工核酸の開発

○本橋優人・西原達哉・田邉一仁（青山学院大院理工）

Development of Functional Oligonucleotide for Highly Sensitive Metabolite Detection (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) MOTOHASHI, Yuto; NISHIHARA, Tatsuya; TANABE, Kazuhito

近年、生体内で産生される代謝物は、疾病と関連する診断マーカーとして機能することから、医学研究分野で注目されている。しかし、代謝物解析に活用されている液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS)は、多成分を高感度に検出可能である一方、検出器として用いる質量分析計が高額であるため、代謝物解析の障壁は高い。そのため、代謝物を超高感度に検出する汎用的な方法論の確立が現在求められている。

以上を踏まえ、本研究では、標的代謝物量をコード可能な機能性人工核酸を開発し、定量 PCR 法により超高感度に検出する新たな分子システムの構築を目指した。具体的には、標的代謝物と選択的に反応する部位を 3’末端に導入した人工核酸を用いることとした。人工核酸による代謝物解析法は以下の通りである。まず、人工核酸と標的代謝物との付加反応を起こさせた後、液体クロマトグラフィーにより付加体を単離する。続いて、得られた人工核酸を定量 PCR にて検出することにより、超高感度に代謝物を解析・検出する (Figure 1)。

本分子システムの構築にあたり、生体内のレドックスを司り、生命機能を維持する上で非常に重要な代謝物として知られているグルタチオン (GSH) を標的分子とし、チオールとの選択的な反応が知られるマレイミド基を末端に導入した人工核酸(Maleimide DNA)を設計した。実際に、Maleimide DNA と GSH を混合すると、DNA と GSH の付加体 (GSH–DNA) が生成した。さらに、HPLC による単離を経て、GSH–DNA が定量 PCR にて増幅されることを明らかにした。本発表では、機能性人工核酸の設計、合成、及び GSH を初めとする代謝物解析に向けた実現可能性の検証結果について報告する。

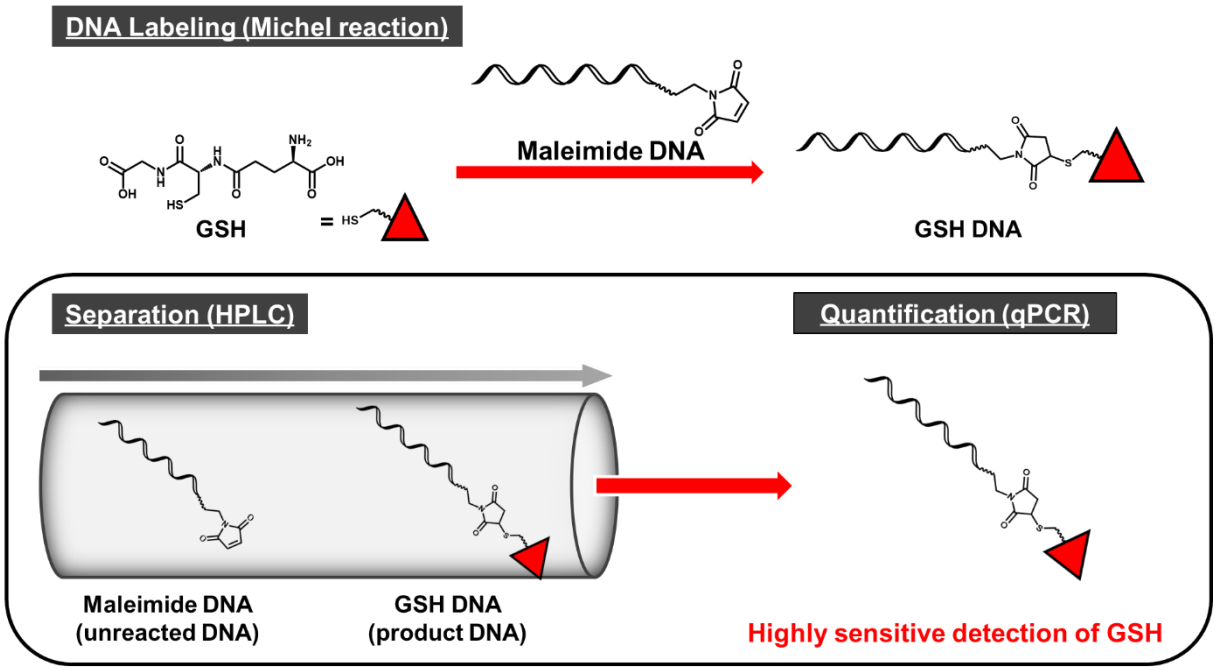


Figure 1. Schematic illustration of quantification of GSH by maleimide-modified DNA.

大腸菌 16S rRNA 中の検出困難な領域を標的とした超高速 RNA 光架橋による新規 FISH の開発

○三原純一・渡辺ななみ・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Development of novel FISH by ultrafast RNA photo-cross-linking targeting difficult-to-detect regions in E. coli 16S rRNA (School of Advanced Institute Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology) MIHARA Junichi; WATANABE Nanami; FUJIMOTO Kenzo

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH）は、オリゴヌクレオチド（ODN）を蛍光標識し、標的核酸を検出する方法である[1]。しかし、FISH の検出感度は、主に 2 つの影響を大きく受ける。1 つ目は、細胞内の標的 RNA 含有量であり、標的 RNA の含有量が少ないと検出が困難になる。2 つ目は、標的核酸に存在する高次構造の影響である。たとえ標的核酸とプローブの配列が完全に一致していても、標的核酸が高次構造を取っていると、プローブとのハイブリダイゼーションを阻害する可能性がある。Fuch 氏のグループは、大腸菌の 16S rRNA の二次構造が検出感度に与える影響を評価した。その結果、大腸菌の 16S rRNA の 627-644 領域は、特に検出が困難であり、Eco1482 領域の 1%の蛍光強度でしか検出することができないことがわかった[2]。

そこで、私たちが開発した、光応答性人工核酸 3-cyanovinyl-carbazole modified D-threoninol (^{CNV}D) を用いて、RNA 高次構造に対する FISH の課題解決を試みた。核酸に用いられる非可逆的な光架橋は、共有結合を形成して DNA や RNA との複合体を安定化させるために広く用いられている。そして、DNA ナノ構造の光化学的制御、核酸の配列特異的かつ迅速な検出を可能にする。光架橋剤としては、古くからソラレン およびその類縁体が用いられてきた[3]。しかし，ソラレンは光架橋の速度が遅く課題となっていた。一方で、この ^{CNV}D は、標的核酸と超高速で非平衡な結合を形成することができる光架橋技術である[4]。そして、この ^{CNV}D を用いることで、親和性の低い標的 rRNA を高感度で検出することが可能となった。また、高次構造を有する rRNA を検出するため、^{CNV}D を含む検出プローブと複数の光架橋性アシスト ODN を用いて、検出困難な 627-644 領域を生細胞でも検出可能な Wash-free FISH 法の開発を行った。その結果、検出困難な標的領域周辺の二次構造を崩すことでき、検出プローブのアクセスが可能となった。そして、相対蛍光強度は、約 40 倍と向上し、高感度で検出することに成功した[5]。

1) E. F. Delong, G. S. Wickham, N. R. Pace, *Science*, **1989**, *243*, 1360.
2) B. M. Fuchs, K. Syutsubo, W. Ludwig, R. Amann, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, *64*, 4973.
3) P. G. Francis, et al., *Nucleic Acids Res.*, **1994,** *22*, 2845.
4) T. Sakamoto, Y. Tanaka, K. Fujimoto, *Org. Lett*., **2015**, 17, 936.
5) K. Fujimoto, N. Watanabe, *ChemistrySelect*, **2020**, *5*, 46, 14670.

ピラノカルバゾール誘導体を含む可視光応答性新規 DNA 光クロスリンカーの開発

○成田泰之・三原純一・笹子しのぶ・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Development of novel visible light-responsive DNA photo-cross-linker containing pyranocarbazole derivatives (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology) NARITA, Yasuyuki ; MIHARA, Junichi; SASAGO, Shinobu; FUJIMOTO, Kenzo

DNA 光架橋反応は、光照射により連結し共有結合を形成する。しかし、代表的な光応答性人工核酸である Psoralen[1] は、光架橋に必要な照射時間が長いことや、光毒性を持つ短波長の 254 nm(UV-C)の光を使用する必要があるという問題点があった。そのような問題点を解決するため、我々は、秒単位の光照射で[2+2]光還化により相補鎖の pyrimidine 塩基と光架橋する 3-cyanovinylcarbazole nucleoside (^{CNV}K)[2] を報告した。そして、^{CNV}K は、核酸配列の特異的かつ迅速な検出 [3] などに使用された。しかし、^{CNV}K は、光架橋に 366 nm の光照射を必要とするため、細胞への光毒性が生細胞で使用する障害となっていた。一方、可視光である 400nm の光毒性は紫外光である 366 nm よりも弱く、生細胞に 300 s 以上照射されたことが知られている [4]。そこで、我々は、塩基部分のπ共役構造を広げることで、可視光によって光架橋する光応答性人工核酸 pyranocarbazole nucleoside (^{PC}X)[5] を開発した。この ^{PC}X は、可視光で光架橋が可能であるため、従来の ^{CNV}K と比べ光毒性が軽減され、生細胞内での Fluorescence *in situ* hybridization(FISH)が可能である [6]。ところが、^{PC}X には、塩基部分を合成する際に、$InCl_3$ を触媒とする *tandem Michael* 付加 [7] を使用するため、副生成物が生じてしまい、その収率が約 20 %と非常に低くなり、実用化への課題となっていた。

本研究は、^{PC}X の合成収率が低いという問題点を解決するため、新たな合成法により ^{PC}X 誘導体を合成した。新たな合成法は、H_2SO_4 を触媒とすることで coumarin 誘導体を合成する、簡便で高収率が期待された *Pechmann* 縮合を検討した。また、*Pechmann* 縮合を用いて coumarin 誘導体を合成すると ^{PC}X の 4 位にメチル基が置換された 4-methlpyranocarbazole nucleoside (^{MEP}K)が取得されると分かった。実際、*Pechmann* 縮合を用いた合成法によって、^{MEP}K は、副生成物が生じることを抑えることができた。そのため、^{MEP}K の塩基部分を約 72 %と高い合成収率で取得することができ、^{PC}X の課題であった収率を 3.5 倍向上することができた。そして、^{PC}X と同様に ^{MEP}K は、光毒性の弱い 400 nm の可視光で光架橋することが明らかとなった。これにより、生細胞内の核酸の制御、検出、操作などの様々な用途での実用化が期待される。

1. B. L. Lee, A, Murakami, K.R. Blake, S. B. Lin, P. S. Miller, *Biochemistry*, **1988**, 27, 3197.
2. Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 3227.
3. K. Fujimoto, M. Hashimoto, N. Watanabe, S. Nakamura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, 29, *16*, 2173.
4. J. Edahiro, K. Sumaru, Y. Tada, K. Ohi, T. Takagi, M. Kameda, T. Shinbo, T. Kanamori, Y. Yoshimi, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 970.
5. K. Fujimoto, S. Sasago, J Mihara, S. Nakanura, *Org. Lett*., **2018**, *20*, 2802.
6. K. Fujimoto, M. Hashimoto, N. Watanabe, S. Nakamura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, *29*, 16, 2173.
7. A. Vronteli, D. J. H. Kitina, M. Konstantinidou, K. E. Litinas, *Arkivoc*, **2015**, *3*, 111.

©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

グアニン修飾アンチセンス核酸による遺伝子発現制御法の開発

○白戸秀平・萩原正規（弘大院理工）

Guanine-Tethered Antisenses Inhibit Protein Synthesis Through G-Quadruplex Formation

(Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University) SHIROTO, Shuhei; HAGIHARA, Masaki

グアニン塩基に富む RNA 配列はグアニン塩基間の特異的な Hoogsteen 型水素結合を介し、グアニン四重鎖構造を形成する。近年、グアニン四重鎖構造は遺伝子発現を制御する重要な機能を持つことが明らかにされており、四重鎖形成配列は多くのガン遺伝子の翻訳制御領域に認められることから、これらを標的とした遺伝子発現制御の有用性も示されている。また、グアニン四重鎖構造は分子内で形成されるだけではなく、グアニン塩基どうしの近接によって分子間でも形成することが可能である。本研究では、末端にグアニンを修飾したアンチセンス核酸（g-AS）を用いて標的 RNA にグアニンを近接させ、RNA/DNA 会合型グアニン四重鎖構造の形成を試みた。さらに、本手法で誘起した四重鎖構造による、標的特異的な遺伝子発現制御効果を検討した。

まず、グアニン連続配列：$(GGGU)_n$ (n=1~3)を有するモデル RNA を作成し、様々な g-AS を加えて逆転写反応を行った。得られた反応産物をキャピラリー電気泳動で解析した結果、g-AS と標的 RNA で $(GGGU)_n$ が n=4 以上となる組み合わせでは四重鎖を形成し、逆転写反応が阻害されていることが確認された。また、これらモデル配列に g-AS を加え、核酸の融解温度測定と円偏光二色性測定を行うことで、RNA/DNA 会合型グアニン四重鎖を誘起できていることを確認した。

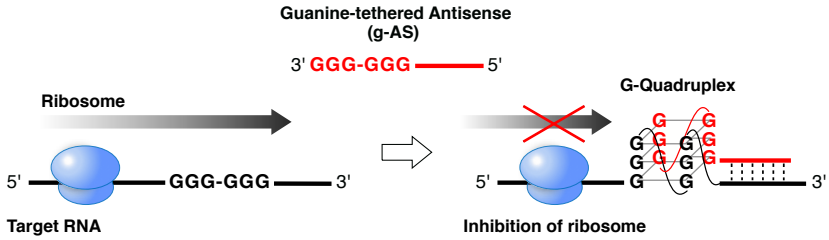


図 1. グアニン修飾アンチセンス核酸（g-AS）によるグアニン四重鎖構造の誘起と翻訳制御の概要図。

次に、グアニン連続配列を有する TPM3 遺伝子の 5'-UTR 下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入し、無細胞タンパク質発現系での翻訳制御を試みた。TPM3 は染色体転座により ALK や NTRK1 などと融合し、ガン遺伝子として機能することが知られている。TPM3 の 5'-UTR を含む 16 塩基に相補的なアンチセンス核酸を設計し、レポーターアッセイにより翻訳量を比較した（図 2）。その結果、グアニン連続配列を修飾していないアンチセンス核酸（AS）は遺伝子発現量に大きな変化は見られなかった一方で、グアニン連続配列を修飾した G2-AS では、1 μM でほぼ完全に翻訳を抑制することが分かった。さらに標的 RNA に対しての結合親和性向上を期待し、g-AS の相補鎖領域に 2'-OMe 修飾を施すと（rG2-AS）、DNA アンチセンス核酸よりも強力な翻訳制御効果を発揮した。以上の結果より、グアニン修飾アンチセンス核酸は標的 RNA を配列特異的に認識してグアニン四重鎖構造を誘導することで、効率的に翻訳過程を制御できることが明らかとなった。

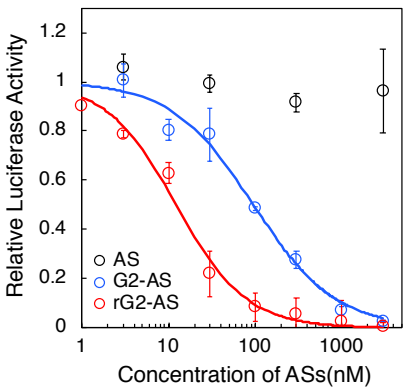


図 2. グアニン修飾アンチセンス核酸（G2-AS）、相補鎖領域のみ（AS）、2'-OMe 修飾を施した g-AS（rG2-AS）による翻訳制御効果。

1) M. Hagihara, L. Yamauchi, A. Seo, K. Yoneda, M. Senda, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 11171.
2) M. Hagihara, S. Shiroto, S. Igarashi, S. Sato, *Chem. Lett.*, *in press*
3) M. Hagihara, *Chem. Commun.*, *in press*

©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

生細胞内在性 RNA のリアルタイム可視化検出を志向した発光プローブの開発

○江口 正敏·吉村 英哲·上田 善文·小澤 岳昌（東京大学院理）

Development of Luminescent Probe for Visualization of Endogenous RNA in Living Single Cells. (Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo) Eguchi, Masatoshi; Yoshimura, Hideaki; Ueda, Yoshibumi; Ozawa, Takeaki

分化や多能性獲得、ガンなどの疾患によるの細胞状態変化は、細胞外からの様々な刺激入力により関連遺伝子の発現状態が変化することで生じる。近年、網羅的遺伝子解析技術の発展により細胞の状態変化に関わる遺伝子の同定が進んでいる。一方で、個々の同定された遺伝子について、網羅的解析技術の特性上、同一標本中での発現変化の時空間的パターンの特定には至っていない。そこで、細胞状態変化を誘導する際に必要十分である時空間的な発現パターンを特定するために、細胞状態変化の過程全体を通じて標的遺伝子発現を 1 細胞解像度、さらには細胞内局在を可視化する必要がある。本研究では遺伝子発現産物である RNA の発現量を生細胞中で高感度かつ長時間測定するため、生物発光を用いた生細胞内遺伝子発現検出技術の開発を行った。

RNA を検出する生物発光プローブとして、発光タンパク質 NanoLuc (NLuc)の二分割体と RNA 結合タンパク質 PUM-HD の変異体 mPUM からなる融合タンパク質を設計した。標的 RNA として β-actin mRNA を選択し、標的とする配列に対して特異的に結合する mPUM を用いた。プローブ分子が標的 RNA に結合すると、二分割 NLuc が近接し再構成することで NLuc の発光能が回復する。この再構成 NLuc の発光を測定することで RNA を検出定量できるプローブ設計を行った。プローブタンパク質について、タンパク質を単離し試験管内発光測定を行い RNA 検出能の評価をおこなった。発光顕微鏡を用いて一細胞での RNA の可視化検出能を評価した。さらに、初代培養神経細胞内にプローブタンパク質を発現し神経細胞内での内在性 mRNA のリアルタイム検出を試みた。

RNA 検出プローブ性能の評価のため、大腸菌による発現系からタンパク質を発現・精製し、試験管内での発光測定系を構築した。標的配列を含む RNA を添加することで発光強度が上昇し、そこに RNA 分解酵素を添加すると発光量が低下した。標的配列を含まない RNA を添加した場合は発光強度の上昇が見られなかった。結果から、本プローブは可逆的に標的とする RNA を認識し発光量を変動させることが示された。標的 RNA 量を変化しプローブの発光量の RNA 濃度との関係を評価したところ、RNA 量依存的に発光値が変化することが明らかとなった。すなわち、本プローブは標的 RNA を定量的に認識し、発光シグナルとして検出可能であることが示された。標的 RNA 配列を発現させた HEK293T 細胞についても発光顕微鏡を用いて観察を行った。この際、標的 RNA が発現する細胞にはレポーターとして蛍光タンパク質が発現するように設計したところ、標的 RNA が発現している細胞について特異的に発光画像が得られた。以上の結果から、開発したプローブは RNA 発現量を 1 細胞解像度で可視化追跡可能となる性能を有することが示された。次に、本プローブ DNA を標的 RNA が発現する NIH3T3 細胞内に導入し発光顕微鏡を用いて観察を行った。細胞の遊走能を評価する手法であるスクラッチアッセイを行い細胞の移動度とβ-actin mRNA の量との関係性を検討した。発光値の変動を一細胞レベルで追跡・評価することができ、遊走方向の細胞が高い発光値を示したことから，細胞ごとに標的 RNA の量の変動を追跡可能であることが示唆された。ラット初代培養神経細胞中にプローブを発現し顕微鏡観察を行ったところ、神経細胞内でも RNA の局在は均一ではなく、特に軸索中では細胞体と比較すると局在していない一方で一部プローブが凝集する部分があることが明らかとなった。この結果から、本プローブがサブセルラーレベルでの局在を追跡可能であることが示唆された。

以上のように、本研究では RNA 結合タンパク質ツール mPUM と生物発光を利用して、長時間にわたる RNA 可視化検出を実現するプローブの礎を開発した。さらなる RNA 認識能の評価と改良を施すことで、本センサーの原理を利用した 1 細胞内遺伝子発現定量評価法の確立が期待される。

©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

高機能な二重特異性抗体の獲得に向けた細胞間架橋能評価の開発

○前島敦[1]・石橋健太[1]・金賢徹[1,2]・熊谷泉[1]・浅野竜太郎[1]（[1]東京農工大院工、[2]産総研細胞分子工学）

Development of evaluation method for intercellular cross-linking abilities to obtain functional bispecific antibodies (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1], Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology[2])
MAEJIMA, Atsushi[1]; ISHIBASHI, Kenta[1]; KIM, Hyonchol[1,2]; KUMAGAI, Izumi[1]; ASANO, Ryutaro[1]

がん細胞表面の上皮増殖因子受容体 (EGFR) と T 細胞表面の CD3 の両者を標的とする二重特異性抗体 Ex3 は、がん細胞と T 細胞を強制的に架橋することで特異的な抗腫瘍効果を示す (Fig. 1)。これまで、Ex3 を構成するドメインの連結順を変えた配向性改変体は、それぞれの標的に対する結合活性は変わらないものの、がん細胞傷害活性が著しく増加することが分かっている[1]。これは、配向性の違いによる立体障害の有無が、細胞間架橋能に影響を及ぼしたためと考えている。このため、より高機能な二重特異性抗体の獲得には、2 細胞間の架橋能を定量的に評価する手法の確立が望まれるが、有効な解析手法がなかった。そこで本研究では、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた二重特異性抗体が介する細胞間架橋能の定量的な解析手法の開発を目指した。

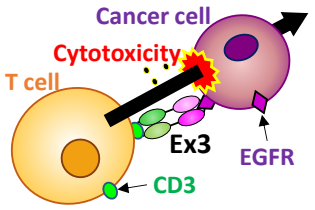


Fig. 1. Cytotoxicity by Ex3

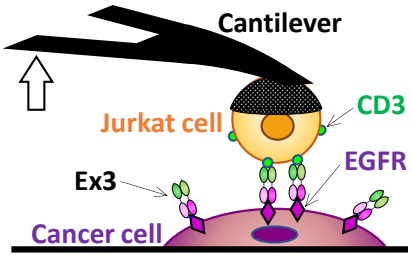


Fig. 2. Principle of AFM measurement

正常 T 細胞を用いた評価はドナー間のロット差が懸念されるため、T リンパ腫株である Jurkat 細胞を用いることで、より定量的な測定系の確立を目指した。シャーレに付着させたがん細胞に種々の濃度の Ex3 を添加後、先端に細胞径と同等の金属カップを取り付けたカンチレバーを用いて、Jurkat 細胞を 1 細胞捕捉し、がん細胞に接触させた後、それらを引き離す際のフォースカーブを測定した (Fig. 2)。二重特異性抗体が介する細胞間架橋能は 2 細胞間の接着を破断する際の仕事で表した。さらに、Ex3 およびがん細胞傷害活性が向上した Ex3 配向性改変体を用いて細胞間架橋能の比較を行った。

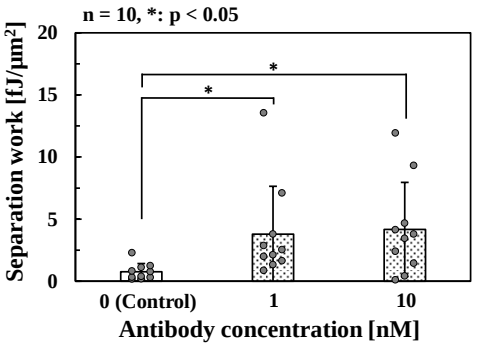


Fig. 3. Cross-linking abilities measured by AFM

AFM 測定の結果、Ex3 非添加時 (0 nM) に比べて 1 nM の添加で有意な測定値の上昇が認められた (Fig. 3)。このことから、本手法で二重特異性抗体が介する細胞間架橋能を評価可能であることが示された。さらに、Ex3 に比べ、がん細胞傷害活性がより高い Ex3 配向性改変体の方がより高い細胞間架橋能を示した (Fig. 4)。このことから、二重特異性抗体のがん細胞傷害活性と細胞間架橋能には相関があることが示された[2]。今後、AFM を用いた細胞間架橋能評価を用いて、より高機能な二重特異性抗体の獲得を目指す予定である。

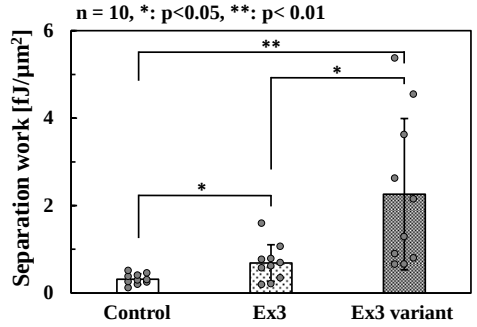


Fig. 4. Differences of cross-linking abilities

[1] R. Asano *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, **26**, 359-67 (2013)
[2] A. Maejima *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **178**, 113037 (2021)

がん細胞分泌タンパク質の単一細胞解析に向けたシリカビーズ充填型細胞捕捉デバイスの開発

○西川莉奈[1]・太田健人[1]・前田義昌[1]・畠山慶一[2]・吉野知子[1]・田中剛[1]（[1]東京農工大院工、[2]静岡県立静岡がんセンター研究所 遺伝子診療研究部）

Development of cell-arraying device filled with silica particles for capturing cancer cell-secreted proteins toward single cell analysis (Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1], Medical Genetics Division, Shizuoka Cancer Center Hospital and Research Institute [2]) NISHIKAWA, Rina[1]; OTA, Kento[1]; MAEDA, Yoshiaki[1]; HATAKEYAMA, Keiichi[2]; YOSHINO, Tomoko[1]; TANAKA, Tsuyoshi[1]

がん細胞が分泌するタンパク質はがんの進展に深く関与している。当研究グループでは、セクレトーム解析により大腸がんに特異的な分泌タンパク質を発見した。しかし、細胞毎に分泌量が不均一なことから、単一細胞解析により悪性度に関与する細胞の特定を目指している。これまで微細孔集積基板のキャピラリープレート (Capillary plate: CP)孔内にモノリス構造を持つシリカを充填したデバイスを開発し、単一細胞の分泌タンパク質解析に利用してきた (Fig. 1A)。毛細管現象により細胞がアレイ化でき、多孔性によりイムノアッセイに用いる抗体固定化量が増大するため、高感度検出が可能である。しかし、モノリスシリカ充填行程は 2 日間を要し、煩雑かつ労働集約的であることが課題であった。そこで、簡易迅速な充填物としてシリカビーズに注目し、シリカビーズ充填 CP の作製、性能評価を行った。

酸素プラズマ処理し、表面を PDMS でスタンプした CP (φ20 μm、孔数 6×10⁵、厚さ 400 μm)をメンブレンフィルター上に設置し、シリカビーズ (φ3 μm)懸濁液を滴下した。この時、CP の孔径、孔数から計算した最大充填数 (5.33×10⁹ particles/ml)に対し、10 倍のビーズ数を添加した。CP を乾燥後、走査型電子顕微鏡 (SEM)による観察を行った。その結果、高密度にビーズが充填された様子が確認され（Fig. 1B）、充填率はモノリスシリカ-CP と同等の値であった。この結果より、シリカビーズ充填 CP を簡易迅速に作製できることが示された。続いて、シリカビーズ充填 CP に CellTracker Green 染色したヒト大腸がん細胞 SW480 株 1～30×10³ cells/ml の各細胞懸濁液 1 ml を滴下し、蛍光顕微鏡による観察を行った。得られた蛍光画像から細胞捕捉率を解析した結果、モノリスシリカ-CP と同等の細胞捕捉率が得られ、1×10⁴ cells/ml において 86 %の捕捉率を示した。また、シリカビーズ充填 CP またはスライドガラス上に 50～1000 μg/ml 蛍光標識抗体を導入し、バイオチップリーダー (被写界深度 250 μm)にて蛍光画像を取得した結果、シリカビーズ充填 CP の抗体固定化量はスライドガラスの約 50 倍となり、平面基板よりも抗体固定化量が増大することが示された。以上のことから、シリカビーズ充填 CP は簡易迅速に作製可能なデバイスであり、単一細胞由来の分泌タンパク質解析への応用が期待できる。

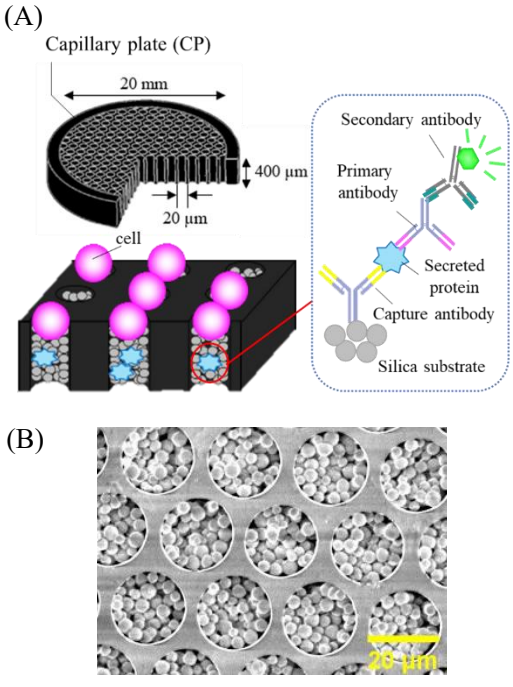


Fig. 1 (A) Schematic diagram of detection of secreted proteins from single-cells using the silica-capillary plate (CP). (B) SEM image of CP filled with silica particles.

バイオ分析に利用可能な「ヒト細胞直交性」の加水分解酵素の開拓

○金子諒右[1]・立石宙也[2]・谷戸謙太[2]・新居輝樹[1,2]・岸村顕広[1,2,3]・森健[1,2]・片山佳樹[1,2,3,]([1]九大院工、[2]九大院システム生命、[3]九大分子システム科学センター)

Exploitation of a hydrolase as an orthogonal enzyme to human cells for bioanalysis (Dept. of Applied Chemistry, Grad. Sch. of Eng, Kyushu Univ.[1], Grad. Sch. of Sys. Life Sci, Kyushu Univ. [2], Int. Res. Cent. for Molecular Sys., Kyushu Univ.[3]) KANEKO, Ryosuke[1]; TATEISHI, Chuya[2]; TANITO, Kenta[2]; NII, Teruki[1,2]; KISHIMURA, Akihiro[1,2,3]; MORI, Takeshi[1,2]; KATAYAMA, Yoshiki[1,2,3]

【緒言】タンパク質などの検出を目的とするバイオ分析において、検出感度の向上のために酵素増感反応が用いられる。例えばELISA や免疫組織染色では、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ（HRP）やアルカリホスファターゼ（AP）、β-ガラクトシダーゼ（β-gal）といった穏和な条件下で高い活性を持つ酵素が用いられてきた。しかし、これらの酵素を細胞上のタンパク質検出に用いる際は、細胞に内在する酵素活性が問題となる（Fig. 1A）。そのため、事前に加熱や固定化による失活処理が行われるが、これによって抗原の変性や細胞死が生じる[1]。

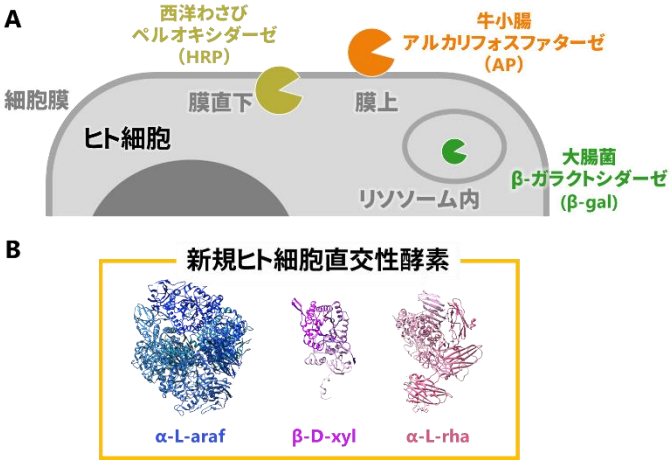


Fig. 1 (A)内在性酵素と(B)新規ヒト細胞直交性酵素

加えて、これらの酵素の反応条件は異なるため、同時利用が容易ではない。そこで我々はヒト細胞に内在せず、かつ特異性の高い酵素を用いればこの問題を解決できると考えた。このような酵素の候補として糖加水分解酵素に注目し、種々のデータベースから、α-L-arabinofuranosidase（α-araf）、β-D-xylosidase（β-xyl）ならびに α-L-rhamnosidase（α-rha）を選出した。最後に、これらが Cell ELISA に適用できるかの検証を試みた（Fig. 1B）。

【実験】HeLa および JY25 細胞に対して新規酵素の p-ニトロフェノール基質を添加し、37℃で 18 時間培養した。また、pH 4.5 および pH 7.4 において、HeLa と JY25 のライセートに対して同様の実験を行った。新規酵素及び β-gal について活性・交差反応性を測定した後、Clostridium thermocellum 由来の α-araf に抗体を修飾した。この α-araf およびその蛍光基質を用いて、生細胞 HepG2 の PD-L1 の検出を行った。さらに、β-gal 修飾抗体とその緑色蛍光基質、および α-araf 修飾抗体とその青色蛍光基質を同時に用いて生細胞 HepG2 上の２種類のタンパク質の検出を行った（Fig. 2）。

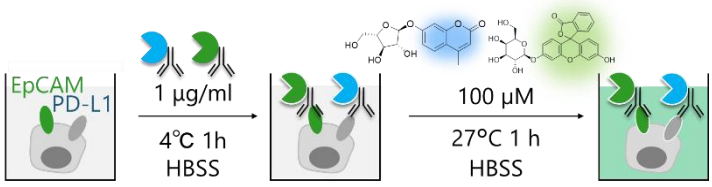


Fig. 2 複数酵素による多色検出のスキーム

【結果及び考察】上記の新規酵素の活性が HeLa 細胞および JY25 細胞に存在しないことを確認した。これらの酵素を実際に発現して、活性を調べたところ、従来の分析用酵素と同程度の高い活性を有し、また、互いに交差反応しなかった。そこで、α-araf を β-gal と同時に用いて、HepG2 生細胞の PD-L1 と EpCAM の２種類のタンパク質の検出を試みたところ、それぞれの存在を同時かつ独立に検出することが可能であった[2]。同様に α-rha についても、cell ELISA に適用できることを確認した。したがって、これらの酵素を組み合わせれば、複数の抗原タンパク質の同時高感度検出が可能と期待される。

[1] Z. Liu, et al., J. Immunol. Methods 2000, 234, 153.
[2] R. Kaneko, et al., Chem. Lett. 2021, 50, 1493.

©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

ヘムとタンパク質マトリクス間の結合を架橋点とする酸化還元応答ゲルの開発

○影山和希・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Construction of Redox Responsive Hydrogel Cross-linked by Interaction between Heme and Protein Matrix (Graduate School of Engineering, Osaka University) KAGEYAMA, Kazuki; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

近年、外部刺激によりその体積および性質を変化させる刺激応答性ゲルは、将来の化学センサーやアクチュエーターへの応用を指向した材料として注目されている。これらの材料の構築において、機能性分子と合成高分子との複合化は有力な手法の一つである。最近では複合化させる機能性分子として生体分子がしばしば利用されている[1]。生体分子の中でも、特にタンパク質は酵素活性や分子認識など有機小分子では達成困難な機能や性質を有しており、よりユニークな材料構築を遂行する上で魅力的な素材である。しかし、タンパク質は多数の反応性官能基を表面に持つため部位特異的な化学修飾は容易ではない。そこで我々は可逆に結合する補因子としてヘムを有するヘムタンパク質に注目した。ヘム補因子は強酸性条件および有機溶媒処理により簡単に除去可能であり、官能基修飾したヘム誘導体を挿入することで、目的の官能基を有する再構成タンパク質を調製することが可能である。ヘム補因子は水中でタンパク質マトリクスのヘム結合部位に強く結合しており、またその結合定数は鉄中心の価数、すなわち酸化還元状態に依存する。このヘムタンパク質の性質を反映させた酸化還元応答ゲルの構築を目指し、我々は六量体ヘムタンパク質を基盤としたハイドロゲルの開発を行った。

本研究では高い熱安定性を有する六量体ヘムタンパク質、Hexameric tyrosine coordinated heme protein (HTHP)に着目した[2]。まず HTHP のヘムとタンパク質マトリクス間の結合の安定性を、ヘムの解離に伴うエネルギー差(ΔG^o)を算出することで定量的に評価した(Table 1)。その結果、酸化状態では一般的なヘムタンパク質よりも強く結合し、また鉄中心の還元により結合能が大きく低下した。これらの特性から酸化還元応答ゲルの素材として最適であると判断した。次に、HTHP を基盤とするハイドロゲルの調製を行った。反応点としてヘム補因子のプロピオン酸部位にアクリロイル基を修飾したヘム誘導体を合成し、HTHP の天然ヘムと置換することで再構成タンパク質を得た。この再構成タンパク質を架橋剤としてアクリルアミドと共重合させることでハイドロゲルを構築した(Fig 1)。本発表ではこのゲルの力学特性評価および鉄中心の還元に伴う力学特性の変化について報告する。

Table 1. 各ヘムタンパク質のヘムの解離に伴うエネルギー差（ΔG^o）

Hemoprotein	ΔG^o (kJ/mol)
HTHP (Fe^{3+})	57 ± 6
HTHP (Fe^{2+})	25 ± 2
Myoglobin (Fe^{3+})	46 ± 4
Myoglobin (Fe^{2+})	49 ± 2

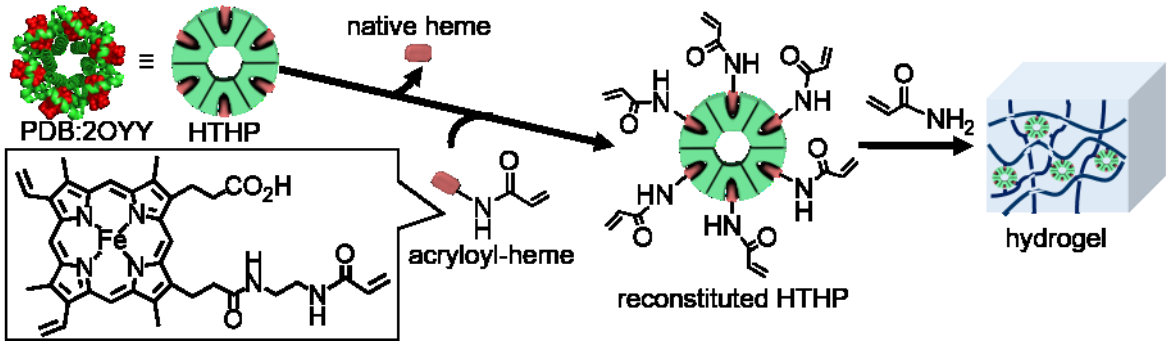


Fig 1. 再構成 HTHP を架橋点とするポリアクリルアミドゲルの調製 (PDB: 2OYY)

1) Z. Yang *et al*., *Chem. Soc. Rev*, **2013**, *42*, 891-901.2) H. Dobbek *et al*., *J. Mol. Bio*., **2011**, *368*, 1122-1131.

©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

クロロフィルを修飾したペプチド鎖上で集積した種々のクロロフィル誘導体の分光学的特性

○仙波真彩・山本龍一・宮武智弘（龍谷大先端理工）

Optical Properties of Chlorophyll Aggregates Assisted by Chlorophyll-Appended Peptides (Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University) SEMBA, Ma-aya; YAMAMOTO, Ryuichi; MIYATAKE, Tomohiro

自然界のクロロフィルは、タンパク質と複合化しながら集積化することで、高効率の光吸収および分子間励起エネルギー移動を可能にしている。これまで我々は、カチオン性の亜鉛クロロフィル誘導体をアニオン性のポリペプチドと複合化させることで集積化させ、色素間の相互作用を発現させてきた。本研究ではアミノ酸残基数 n が 2—6 のオリゴペプチドにクロロフィル誘導体を結合させ、これを種々のイオン性亜鉛クロロフィル誘導体と複合化させることで亜鉛クロロフィル類の集積化を試みた(図 1)。THF/Tris-HCl 緩衝溶液=15/85 の溶液中で **1** と **4** を混ぜ合わせると、カチオン性の亜鉛クロロフィル誘導体 **1** はアニオン性のヘキサアスパラギン酸をもつクロロフィル誘導体 **4**(n=6)と 6:1 の比で複合化し、その Qy 吸収帯は 662 nm から 685 nm へと長波長シフトした。またアニオン性の亜鉛クロロフィル誘導体 **2** もカチオン性のヘキサアルギニンをもつクロロフィル誘導体 **5**(n=6)と 6:1 の比で複合化し、同様の長波長シフトを示した。このことからペプチド鎖と亜鉛クロロフィル誘導体とは分子間で静電的な相互作用によって定量的に複合化し、集積した亜鉛クロロフィルの間で色素間相互作用が発現することがわかった。さらに **2** の 13 位のカルボニル基をメチレン基に還元し、より短波長側の 623 nm に Qy 吸収帯をもつカチオン性亜鉛クロロフィル誘導体 **3** を新たに合成し、**4** との複合化を試みた。この新たに合成した **3** を THF/Tris-HCl 緩衝溶液=15/85 の溶液中で **4**(n=6)と混ぜ合わせると、**3** および **4** の発色団の Qy 吸収帯が 623 nm から 639 nm、666 nm から 677 nm へとそれぞれ長波長シフトした(図 2 (1))。また、**4** のペプチド鎖の長さを n=2—6 と変化させて **3** と複合化させた。このとき、色素間相互作用をもつ亜鉛クロロフィル部の量を 623 nm および 639 nm の吸収帯から見積もった(図 2 (2))。すると n の値が大きくなるほど色素間相互作用をもつ亜鉛クロロフィルが多くなり、n=5 以上のペプチド鎖を用いることで、色素間相互作用をもつ亜鉛クロロフィルが定量的に得られることがわかった。

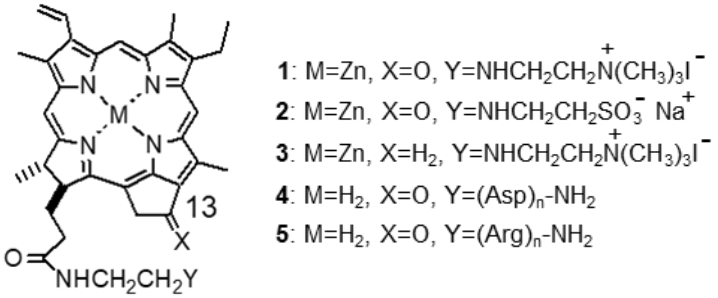


Figure 1. Structures of ionic zinc chlorophylls **1**—**3** and chlorophyll-appended peptides **4**, **5**.

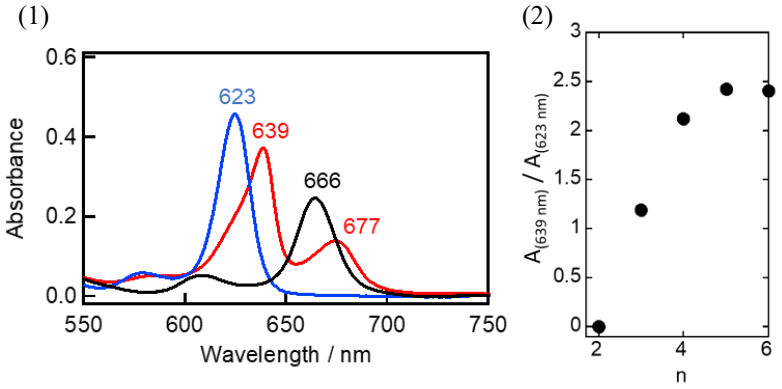


Figure 2. (1) Visible absorption spectra of **3** (blue) and **4** (n=6, black), complex of **3** and **4** (**3**:**4**=6:1, red) in THF / Tris-HCl Buffer (pH 8.0) =15 / 85 (v/v): (2) Ratios of associated (A_{639}) and non-associated (A_{623}) zinc chlorophylls **3** in complexes with serveral peptide-appended chlorophylls (**4**: n=2—6) .

©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

拡張された自己集合中空錯体へのタンパク質の包接

○海老原梨沙[1]・中間貴寛[1]・藤田大士[2]・藤田誠[1,3]
（[1]東大院工, [2]京大 iCeMS, [3]分子研）

Protein Encapsulation within an Expanded Self-assembled Hollow Cage (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University[2], Institute for Molecular Science[3]) EBIHARA, Risa[1]; NAKAMA, Takahiro[1]; FUJITA, Daishi[2]; FUJITA, Makoto[1,3]

タンパク質の人工ホストへの包接は、空間的な隔離・固定化による特異な安定化・機能制御を実現する。当研究室では、有機二座配位子 **1** (L)と Pd(II)イオン(M)の自己組織化により形成する $M_{12}L_{24}$ 自己集合中空錯体へのタンパク質の包接を達成した(Fig. 1a)[1]。2-ホルミルピリジル基によるタンパク質 N 末端修飾反応[2]を用いることで、タンパク質を天然構造のまま包接し、その安定性を飛躍的に向上させた。さらに、その特長的な一義内部空間を用いたタンパク質構造解析法への展開が期待される。しかしながら、錯体 **I** の内径は 5 nm であり、最大で直径約 4 nm、200 残基ほどのタンパク質しか包接できなかった。そのため、多様なタンパク質を包接可能な汎用性の高い新規手法の開発が望まれていた。

本研究では、内部空間の拡張された $M_{12}L_{24}$ 中空錯体 **II** を構築し、従来よりも大きなタンパク質の包接を行った(Fig. 1b)。アセチレンスペーサーを追加した配位子 **2** から成る中空錯体 **II** は、モデリングにより内径 6 nm まで拡張されると見積もられた。12 ステップ、総収率 5.7%で合成した配位子 **2** を用いて、先行研究よりも大きなタンパク質エラスターゼ(5.2 nm, 240 a.a.)の包接を行った(Fig. 1c)。エラスターゼと配位子 **2** を縮合した後、Pd(II)イオンとの錯形成をワンポットで行い、中空錯体 **II** への包接を試みた。^{1}H NMR では、エラスターゼとともに $M_{12}L_{24}$ 錯体に特徴的なブロードなピークが観測された。さらに、^{1}H DOSY NMR により分子の自己拡散係数からその大きさを見積もり、タンパク質の包接を評価した。エラスターゼ由来のピークの拡散係数(log D = −10.25)は、エラスターゼ単体の拡散係数(log D = −9.98)から大きく減少し、錯体ケージと同一の値を示した(Fig.1c)。これは、中空錯体 **II** 単体の拡散係数(log D = −10.22)と同程度であることから、先行研究と同様に中空錯体 **II** へエラスターゼを包接したことが示された。さらに、タンパク包接錯体 **II** の拡散係数(log D = −10.25)は、タンパク包接錯体 **I** の値(Fig. 1a, log D = −10.14)よりも小さく、球状錯体が設計通り拡張されたことも確かめられた。以上より、自己集合 $M_{12}L_{24}$ 中空錯体を拡張し、これまでよりも大きな直径 5 nm 以上のタンパク質の包接を達成した。本発表では、その他のタンパク質の包接と共に、包接されたタンパク質の性質・安定性についても議論する。

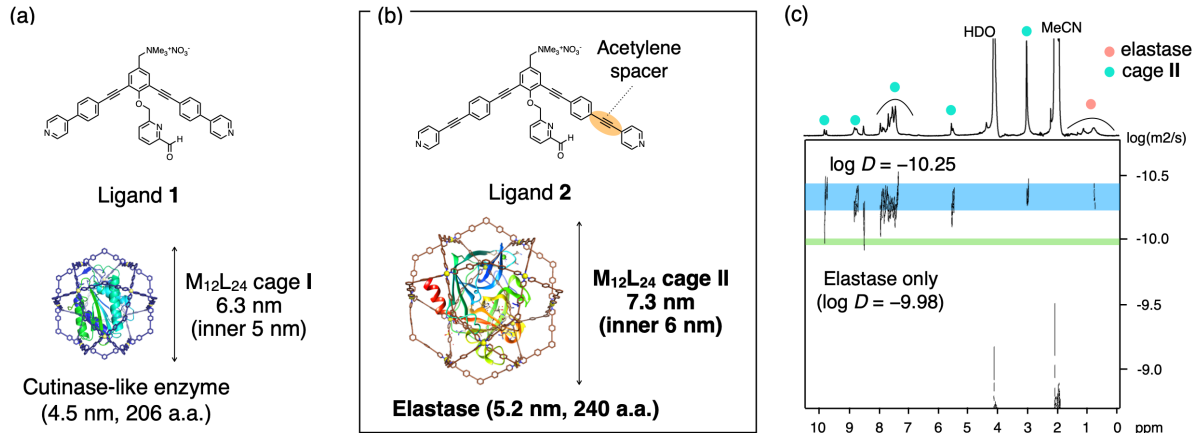


Fig. 1 (a, b) Encapsulation of a protein within a self-assembled hollow $M_{12}L_{24}$ cage. Cage **II** with an extended cavity (b) was constructed to encapsulate larger proteins than those by the previous cage **I** (a). (c) ^{1}H DOSY NMR analysis of the encapsulation of elastase within cage **II** (500 MHz, D_2O/CD_3CN = 1:1, 300 K).

1) (a) D. Fujita *et al.*, *Nat. Commun.* **3**, 1093 (2012); (b) D. Fujita *et al.*, *Chem*, accepted
2) J. I. MacDonald, H. K. Munch, T. Moore, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **11**, 326–331 (2015)

循環置換とαヘリックス挿入を用いた３ユニット環状ヘムタンパク質の設計と構築

○藤原綱大[1]・山中優[1]・真島剛史[1]・小林直也[1]・大西遥喜[1]・内橋貴之[2]・廣田俊[1]（[1]奈良先端大物質・[2]名大院理）

Design and construction of the three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion

(Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology[1], Graduate School of Science, Nagoya University[2]) FUJIWARA, Kodai[1]; YAMANAKA, Masaru[1]; MASHIMA, Tsuyoshi[1]; KOBAYASHI, Naoya[1]; ONISHI, Haruki[1]; UCHIHASHI, Takayuki[2]; HIROTA, Shun[1]

天然では、秩序的に集合化した超分子構造をとることで機能を発揮するタンパク質が存在する。その機能発現機構を人工的に模倣し応用するために、自在にタンパク質超分子構造を構築する手法が求められている。

本研究室ではこれまでに、超好熱菌由来シトクロム c_{555} のドメインスワップ二量体構造を基に、ヒンジループ前後でスワップするN末端領域とC末端領域の順番を入れ替え、接合部位に9残基のαヘリックスリンカーを挿入した循環置換タンパク質(circular permutated Cyt c_{555}, CPC)を設計した(Fig. 1)[1]。組み換え大腸菌を用いて発現させたCPCはエタノール処理や熱処理によってドメインスワッピングし、選択的に環状3量体を形成した。そこで、本研究では、三角形形状となるタンパク質構造体をより簡便かつ安定的に構築することを目指し、CPCを3分子連結したタンパク質(CPC_3)を構築し、環化条件の検討を行った。このCPC_3はCPCのN末端領域とC末端領域の間に２つのシトクロム c_{555} が挿入された分子に対応する。

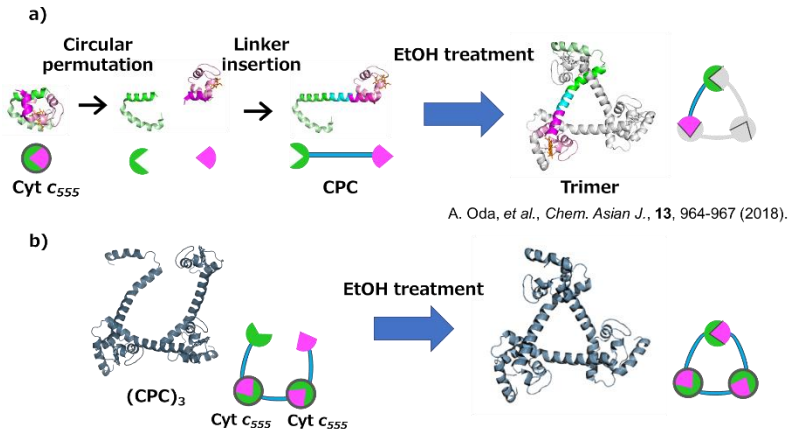


Figure 1. Schematic representation of the design and construction of a) CPC trimer and b) cyclic CPC_3.

培養・精製後のCPC_3に終濃度50%以上になるようエタノールを添加し、凍結乾燥にてエタノールを取り除き、得られた粉末を再溶解させることでCPC_3の環化を試みたところ、二量体、三量体、高次多量体の形成が確認された。エタノール処理前後の単量体ではSECにおける溶出位置がわずかにシフトし、単量体構造が溶液中で変化することが確認された。そこでエタノール処理前後の単量体構造を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて観察したところ、CPC_3の単量体はエタノール処理前では直鎖状構造をとり、エタノール処理によりN末端とC末端が分子内で閉環した環状構造を形成することが示唆された(Fig. 2)。

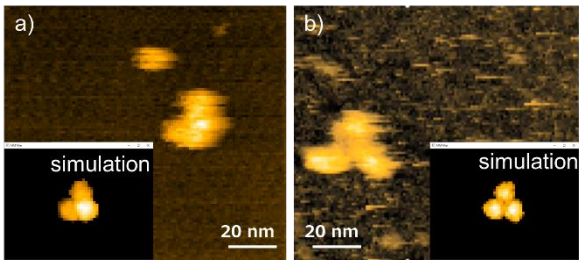


Figure 2. Representative and simulated AFM images of CPC_3 monomer a) before and b) after ethanol treatment.

[参考文献]

[1] A. Oda, *et al.*, *Chem. Asian J.*, **13**, 964-967 (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

セラミド誘導体の生細胞に対するアポトーシス活性

○辻村　晃也・木下 祥尚・松森 信明（九大院理）

Apoptotic activity of ceramide derivative towards living cells.(Graduate School of Science, Kyusyu University)
TSUJIMURA, Koya; KINOSHITA, Masanao; MATSUMORI, Nobuaki

セラミド(pCer；Fig. 1)はスフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合をした構造をした細胞膜脂質の一つであり、細胞の分化や増殖などを引き起こすシグナル伝達物質としての重要な機能を担っている。また、セラミドは抗がん剤やストレスにより細胞内で増殖し、カスパーゼ群を活性化させることによってアポトーシスを誘導するとの報告があり、この機構として2つの仮説が立てられている[1]。一つはセラミドが受容体タンパク質と特異的に相互作用することでカスパーゼ群を活性化させるというもの、もう一つはセラミドが細胞膜で凝集し、ドメインを形成することによってカスパーゼ群を活性化させるというものである。しかし、セラミドによるアポトーシス誘導の詳細なメカニズムは解明されていない。一方、当研究室では、セラミドの頭部のヒドロキシ基を変えた各種セラミド誘導体を合成し（Fig. 2）、人工膜におけるドメイン形成能を評価した[2), 3)]。本研究ではこれらのセラミド誘導体を生細胞に作用させアポトーシス活性を評価することで、セラミドドメイン形成能との関連について検討を行った。

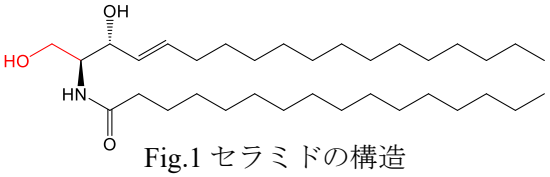


Fig.1 セラミドの構造

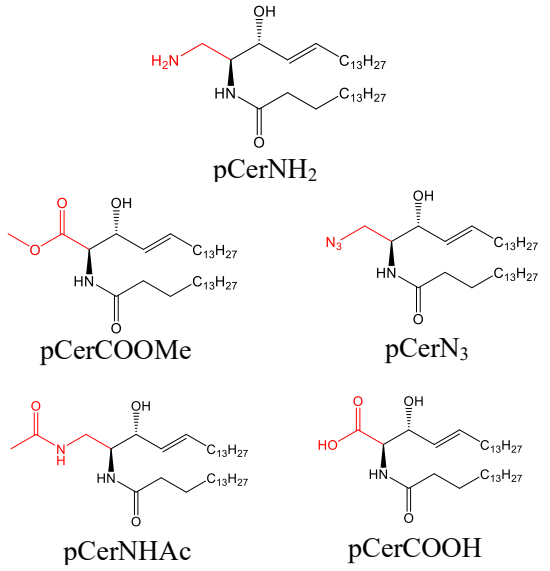


Fig. 2 セラミド誘導体の構造

まず Fig. 2 のセラミド誘導体を報告に従って再合成した。次にこれらの誘導体のアポトーシス活性を CHO-K1 細胞を用いて検討した。アポトーシス細胞ではホスファチジルセリンが細胞膜内葉から外葉に露出するため、ホスファチジルセリンに特異的に結合する Annexin V の蛍光標識体を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、$pCerNH_2$ を除く全ての誘導体でアポトーシス活性が確認された（Fig. 3）。発表では、顕微鏡観察以外にフローサイトメトリーを用いたアポトーシス活性の定量評価の結果、およびセラミドドメイン形成との関連について議論する。

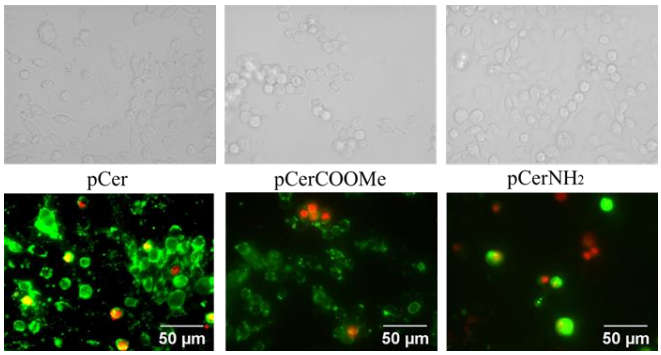


Fig. 3 アポトーシス観察（一部）
上：位相差画像
下：蛍光顕微鏡画像
緑：アポトーシス細胞　赤：死細胞

(1) Y A. Hannun, L M. Obeid, Trends Biochem. Sci. 1995, 20 (2), 73-77.
(2) T. Matsufuji, M. Kinoshita, A. Möuts, et al., Langmuir 2018, 34 (1), 465-471.
(3) A. Möuts, E.Vattulainen, et al., Langmuir. 2018, 34 (51), 15864-15870.

糖鎖結合タンパク質のアフィニティーラベリングに向けた求電子性マルチバレントプローブの開発

○鴨下潮音[1]・櫻井香里[1]（[1]東京農工大学院工）

Development of multivalent electrophilic probes for exploring carbohydrate binding proteins.

(Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1]) Kamoshita Shione[1]; Sakurai Kaori[1]

糖鎖結合タンパク質の同定は、シグナル伝達に関与する細胞表層糖鎖の機能解明に重要である。このため、糖鎖をリガンドとしたアフィニティーラベリングプローブが開発されてきた[1)]。しかし、多くの糖鎖–タンパク質間相互作用は結合強度が弱いため、親和性を利用して細胞プロテオームから糖鎖タンパク質を精製することは困難であった。当研究室では捕捉効率の改善に向けて、糖鎖リガンドと求電子基を多価に提示した金ナノ粒子アフィニティーラベリングプローブを開発した[2)]。このプローブは、糖鎖の局所的な濃度増大効果により、糖鎖結合タンパク質のラベリングを効率化した。そこで、求電子基をさらに探索することで、糖鎖結合タンパク質の高効率的な同定につながると考えた。本研究では、lactose と種々の求電子基を多価に共修飾した金ナノ粒子アフィニティーラベリングプローブを設計、合成し、モデル系結合タンパク質を用いた反応性解析を行った。Lactose および求電子基のモノマーを、金ナノ粒子結合部位を有するリポ酸の誘導体として合成し、リガンド交換法によって金ナノ粒子に修飾した。これらのプローブと lactose 結合タンパク質である PNA と RCA を反応させた後(Fig. 1)、SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、蛍光イメージングによってラベル化効率を比較評価した。この結果、*p*-および *m*-arylsulfonyl fluoride 基が高いラベル化効率を示した。また、非標的タンパク質である BSA の共存下でラベリングを行ったところ、*m*-arylsulfonyl fluoride 基が最も高い選択性を示した。このことから、arylsulfonyl fluoride 基は未知の糖鎖結合タンパク質の捕捉に向けた金ナノ粒子アフィニティーラベリングプローブにおいて、ラベル化効率と選択性に優れた求電子基であることが示唆された。

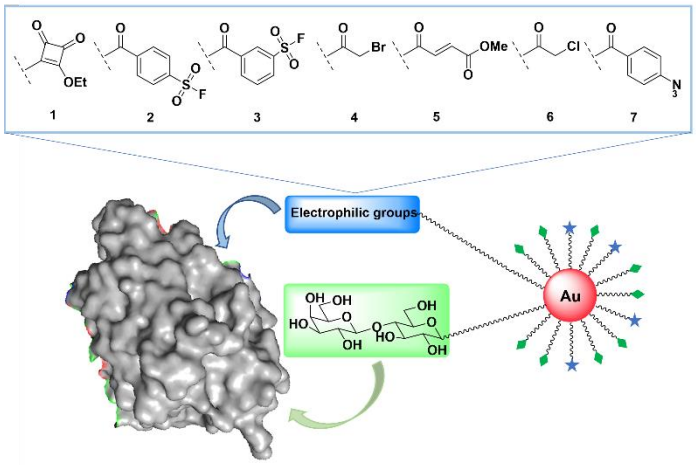


Figure 1. Affinity labeling of a carbohydrate binding protein by gold nanoparticle-based probes presenting ligands and electrophiles.

1) Wu. H and Kohler. J, *Curr. Opin. Chem. Biol*, **2019**, 53, 173-182.
2) Suto. N, Kamoshita. S, Hosoya. S and Sakurai. K, *Angew.Chem.Int.Ed*, **2021**,133,2-10

多糖-ポルフィリン誘導体ナノ複合体による光線力学療法

○山名啓太・河﨑陸・杉川幸太・池田篤志（広大院先進理工）

Complex of porphyrin derivatives with polysaccharides for photodynamic therapy (Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University) YAMANA, Keita; KAWASAKI, Riku; SUGIKAWA, Kouta; IKEDA, Atsushi

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、光線力学療法（PDT）が挙げられる。PDT では生体透過性に優れた光照射によって励起された光増感剤（PS）が生成する細胞障害性の高い活性酸素種によりがん細胞を死滅させる。ここで活性酸素種の半減期が極めて短いことから、PS を腫瘍選択的に蓄積させることによって、がん細胞選択的な殺傷を実現することができる。PS として、生体透過性に優れた可視光領域に吸収帯を有するポルフィリン誘導体が広く用いられてきたが、一般にこれらπ共役系化合物は疎水性が高く、水中で容易に会合・凝集することによって、その機能を失ってしまうことが知られている。そのため、ポルフィリン誘導体のバイオメディカルの分野への応用は制限されてきた。

当研究室では、ボールミルを用いた多糖によるフラーレンなどπ共役系化合物の可溶化について報告してきた。この固相で機械的に混合する手法（高速振動粉砕法）の利用によって、疎水性の高いπ共役系化合物の水溶化を極めて簡便に行うことができる。そこで本研究では、本システムを光増感剤としてのポルフィリン誘導体へと拡張し、その光増感剤としての機能について評価した結果について報告する（図 1）。ここで用いる多糖として、アニオン性多糖であるλ-カラギーナン [1]と温度応答性多糖であるヒドロキシプロピルセルロース [2]を採用した。

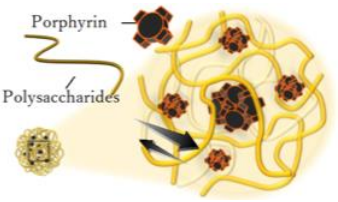


図 1. 本研究の概要

高速振動粉砕法によって、多糖-ポルフィリン誘導体を作製した。紫外可視吸収分光法の結果、ポルフィリンに由来するピークが観測され、確かに多糖によって、効率的に水中にポルフィリンが水溶化されていることが明らかとなった。また従来法である超音波法や加熱法と比較して、吸収ピークが大きかったことから、本システムの可溶化における有用性が示された。ここでポルフィリンに由来するスペクトルに着目すると、その概形がブロード化していたことから、多糖が形成するポリマーマトリックス内部でポルフィリン誘導体は会合していることが示唆された。さらに蛍光スペクトル測定の結果、蛍光が消光していたことも、ポルフィリン誘導体が会合していることを支持している。また、複合体の粒子径が 200-300 nm と比較的小さな値を示すことが動的光散乱測定の結果から明らかした。また、ヒドロキシプロピルセルロースを用いた場合、これらの光機能や放出制御について、温度によって制御可能であった。

これらの複合体を用いてがん細胞（HeLa 細胞）に対する光線力学活性を評価したところ、光照射に基づく濃度依存的な細胞障害性が確認された。それだけでなく、その光線力学活性は臨床に用いられている PS（Photofrin）と比較して、非常に高い活性を実現させた。ここで、ヒドロキシプロピルセルロースを用いた系では、細胞内の発熱器官の一つであるミトコンドリアへの効率的な集積が確認され、細胞内の温度に応答することでミトコンドリア選択的な送達を実現し、効率的な細胞死を誘導したものと考えられる。以上の結果から、多糖-ポルフィリン誘導体複合体は優れた光線力学療法用治療薬として期待できる。

参考文献

1) K. Yamana, *et. al.*, *ACS Appl. Bio Mater.*, **3**, 3217. (2020). 2) R. Kawasaki, *et. al.*, *ACS Omega*, **6**, 3209. (2021).

タンパク質油中分散化技術を用いた経皮マラリアワクチンの創製

○田中　敬佑[1]・南畑 孝介[2]・若林 里衣[2]・神谷 典穂[2,3,4]・後藤 雅宏[2]（[1]九大院工、[2]九大院工学研究院、[3]次世代経皮吸収研究センター、[4]未来化学創造センター）

Development of transdermal malaria vaccine using protein oil dispersion technology (Kyushu University Graduate School of Engineering[1] , Graduate School of Engineering, Kyushu University[2], Next Generation Transdermal Absorption Research Center[3] , Center for Future Chemistry and Innovation[4]) Keisuke, Tanaka[1]; Kosuke , Minamihata[2] ; Rie , Wakabayashi[2,3] ; Noriho , Kamiya[2,3,4] ; Masahiro , Goto[2,3,4]

1. 緒言

マラリアは、マラリア原虫がハマダラカによって媒介され、吸血時にヒト体内へ侵入し、肝細胞および赤血球を破壊しながら増殖することで、貧血や、腎不全などを引き起こす感染症である。マラリアワクチンが必要とされる地域の多くでは医療体制が不十分であり、注射を行う医療従事者の不足や、注射によって生じる皮膚の損傷が新たな感染症の原因になるといった問題点が存在する。

本研究では、非侵襲的かつ簡便な、「塗るマラリアワクチン」の開発を目的とした。皮膚を介して抗原を体内に送達する戦略として Solid-in-oil (S/O) 化技術を選択した。この技術は親水性分子を疎水性界面活性剤で被覆することで油中分散させる技術であり、皮膚に馴染みやすい油中へ分散させることで良好な皮膚浸透性が期待できる。今回は、S/O 化技術をマラリア抗原へ適用することで、マラリアワクチンの経皮製剤化を試みた。本発表では、マラリア抗原である Pvs25 を内包した S/O 製剤の抗体産生能について報告する。

2. 実験

Pvs25 水溶液を L-195/cyclohexane 溶液へ加え、ホモジナイザーで高速撹拌することで W/O エマルションを形成させ、凍結乾燥を行った。凍結乾燥後の Pvs25/L-195 複合体を Isopropyl myristate 中に分散させ、Pvs25 を内包した S/O 製剤を調製した。ナノ粒子を形成しているかの確認のため、動的散乱光法 (DLS) 測定によって粒子系を測定した。BALB/c マウスの背部を除毛し、調製した S/O 製剤を添加したパッチを 24 h 貼付し、経皮投与を行った。経皮投与は 1 週間おきに計 3 回行った。最終投与から経時的に採血を行い、ELISA 法によって血清中に含まれる Pvs25 に対する IgG の定量を行った。

3. 結果および考察

Fig.1 へ調製した S/O 製剤の DLS 測定結果を、**Fig.2** へ免疫化後のマウス血清中における抗体価 (Total IgG) 測定結果を示す。DLS 測定結果から、200 nm 程のピークが確認され、PDI 値も低いことから、S/O 化によって均一なナノ粒子が形成されたことが確認された。抗体価測定結果から、Pvs25 水溶液を注射した群は採血初期から高い抗体価を示した。一方、S/O 製剤を経皮投与した群では、免疫化後 16 日目以降から抗体価の顕著な上昇が確認され、43 日目の血清では注射群に匹敵する抗体価が確認された。中長期的に抗体価上昇が見られる現象は、経皮製剤によるワクチンではしばしば見られる現象ではあるが、表皮中に存在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞への抗原送達から、免疫誘導までの過程が、注射とは異なる経路を辿っているためではないかと考えられる。これらの結果から、Pvs25 を S/O 化することで、経皮マラリアワクチンとして利用できる可能性が示唆された。

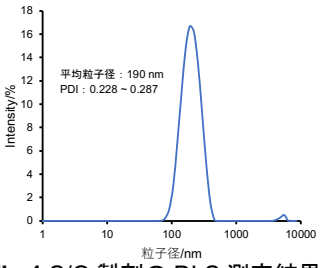


Fig.1 S/O 製剤の DLS 測定結果

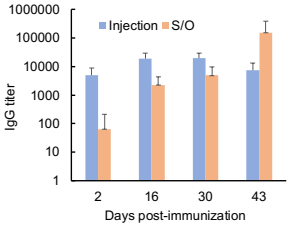


Fig.2 抗 Pvs25 抗体価測定結果

トランスクリプトーム及びゲノム変異解析を用いた分子標的薬投与後の肺がん微小領域における細胞多様性の解明

○山﨑美輝[1,2]・松永浩子[3]・細川正人[1,3]・有川浩司[3]・鈴木直子[3]・林大久生[4]・竹山春子[1,2,3,5]（[1]早大院先進理工、[2]産総研早大 CBBD-OIL・[3]早大ナノライフ創新研・[4]順大人体病理病態学講座・[5]早大生命動態研）

Transcriptome and genome mutation analysis of non-small cell lung cancer for elucidation of cell diversity in cancer microenvironment after EGFR-TKI treatment

(Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University [1], CBBD-OIL, AIST-Waseda University [2], Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University [3], Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Department of Human Pathology, Graduate School of Medicine, Juntendo University [4], Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University [5]) YAMAZAKI, Miki[1,2]; MATSUNAGA, Hiroko[3]; HOSOKAWA, Masahito[4]; ARIKAWA, Koji[3]; SUZUKI, Naoko[3]; HAYASHI, Takuo[5]; TAKEYAMA, Haruko[1,2,3,6]

がん組織は、形態や増殖性、薬剤耐性の異なる細胞集団で構成されており、それら細胞の相互作用により病態が形成される。分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤など、がん特有の分子を標的とした薬剤の開発により、無増悪生存期間は改善されている。しかし、細胞多様性や蓄積されたゲノム変異による薬剤耐性が課題となっている。当研究室では、空間情報を用いた生体組織の包括的な解析を目指し、生体組織の微小領域(直径100μm)を網羅的かつ高速に採取する独自のシステムを開発してきた[1)]。また、当システムを用いた微小領域の遺伝子発現解析における検出感度の向上、及び微小領域を対象としたマルチオミクス解析に向けて研究開発を行なっている[2)]。本研究では、分子標的薬投与後の肺がん微小領域における細胞多様性を捉え、薬剤耐性マーカーの特定を目指した。

分子標的薬投与後の EGFR 変異陽性肺がん組織から、正常部位、残存する腫瘍部位、腫瘍周辺の間質、寛解部の間質を、形態学的に分類した上で採取した。比較対象として、薬剤投与前の腫瘍部位を採取した。各微小領域から遺伝子発現情報及びゲノム情報を取得し、細胞型の比較や相互作用を予測した。薬剤投与後の腫瘍部位では投与前に比べて、細胞外マトリックスと受容体の相互作用が活性化しており、薬剤耐性機構への影響が示唆された。腫瘍周辺の間質は寛解部の間質と比較して、免疫チェックポイント阻害剤の標的である PD-L1 発現と PD-1 チェックポイント経路の活性化が見られた。今後更に知見を積み重ねることで、がん微小環境における各細胞の薬剤応答を捉え、新たな耐性獲得メカニズムの解明が期待される。

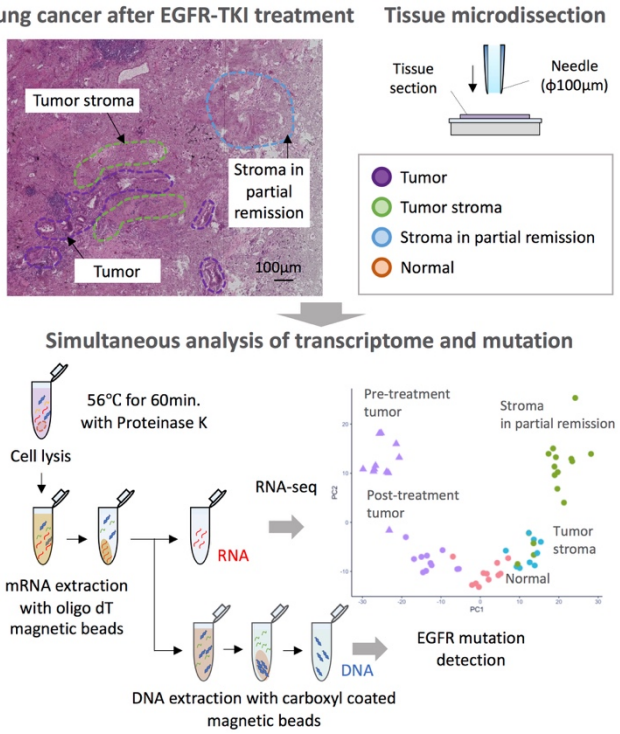


Fig 1. Workflow of transcriptome and genome mutation analysis of micro-tissue in non-small cell lung cancer

1) T. Yoda, M. Hosokawa, K. Takahashi, C. Sakanashi, H. Takeyama, H. Kambara, *Sci. Rep.*, 7(1), 1-11 (2017)

2) M. Yamazaki, M. Hosokawa, K. Arikawa, K. Takahashi, C. Sakanashi, T. Yoda, H. Matsunaga, H. Takeyama, *Sci. Rep.*, 10(1), 1-8(2020)

金選択的回収機能を有するアントラセン誘導体の合成

○寺村 駿吾[1]・今井 崇人[1]・浅野 昌弘[2]・富﨑 欣也[1]（龍大理工）

Synthesis of An Anthracene Derivative with Selective Gold Recovery Mechanism ([1]Department of Materials Chemistry, [2]Course of Environmental Ecological Engineering, Ryukoku University) TERAMURA, Shungo; IMAI, Takahito; ASANO, Masahiro; TOMIZAKI, Kin-ya

貴金属は、化学的安定性、電気伝導性、触媒能を有することから、電子部品などに用いられ、AI技術が発展してきた現代社会において、欠かせないものとなっている。しかし、生産量が少なく、埋蔵量も限られているため、廃電子部品や工業廃液などの産業廃棄物からの貴金属回収の重要性が高まっている。貴金属の回収方法として、種々産業化されているものの、均一・低濃度溶液からの貴金属回収については更なる技術開発が必要である。当研究室では、貴金属回収方法として、自己集合化能を有するペプチドを利用して、貴金属イオン濃度を局所的に高め、希薄貴金属混合水溶液からの選択的回収が可能であると考えた[1,2,3]。これまでに当研究室では、$HAuCl_4$ と H_2PtCl_6 の希薄混合水溶液から金イオンをより優位に還元鉱物化するペプチド (RU065$_{4-8}$: Ac-K-A-2Ant-K-I-NH_2) (Fig. 1) を得ている。本研究では、産業応用を指向して、RU065$_{4-8}$ の構造を基に、非ペプチド性のアントラセン誘導体 (diAnt) を化学合成し、金選択的回収機能の評価を行った。本研究で用いる diAnt は RU065$_{4-8}$ の構造を基に、金イオンに電子を与えるためのアントラセン環を含み、$AuCl_4^-$取り込みのためのカチオンおよび分離回収を容易にするための水素結合性基を含む構造とした (Fig. 2) 。合成した diAnt を ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR および MALDI-TOF-MS にて同定した。芳香族化合物を低濃度の塩酸に溶解させた溶液と、$HAuCl_4$ と H_2PtCl_6 の希薄混合水溶液を混合し、40℃、24 時間反応 ([HCl] = 0〜50 mM, [$HAuCl_4$] = 50 μM, [H_2PtCl_6] = 50 μM, [diAnt] = 200 μM) させた。反応溶液の UV-vis スペクトルを測定したところ、[HCl] = 0〜1 mM の範囲で金ナノ粒子特有のピークが見られたが、塩酸濃度の増大により、白金粒子のピークが顕著に見られた。塩酸 1 mM において、回収した沈殿物を FE-SEM (EDS) を用いて分析したところ、沈殿物の Au/Pt 原子数比は約 12 であり、反応溶液の上澄み溶液を ICP-OES を用いて分析したところ、97%の金イオンが還元された。

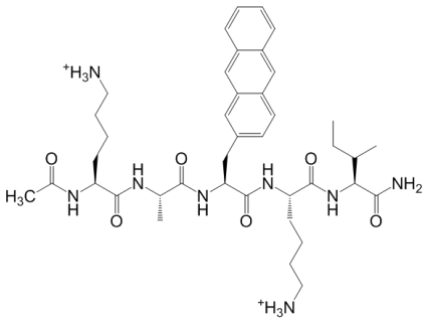


Fig. 1. RU065$_{4-8}$ ペプチドの構造

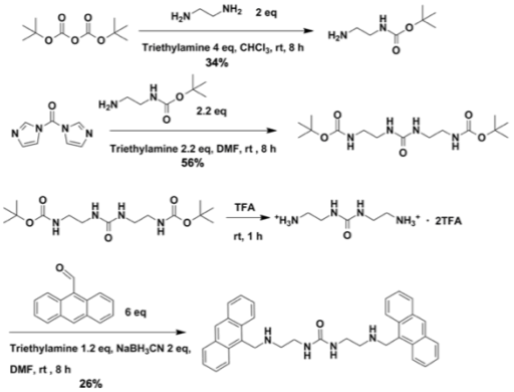


Fig. 2. diAnt の合成経路

1) Tomizaki, K.-Y. et al. *Langmuir* **2014**, *30*, 846-856.
2) Tomizaki, K.-Y. et al. *Bioorg. Med. Chem*. **2015**, *23*, 7282-7291.
3) Tomizaki, K.-Y. et al. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*,5060.

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。

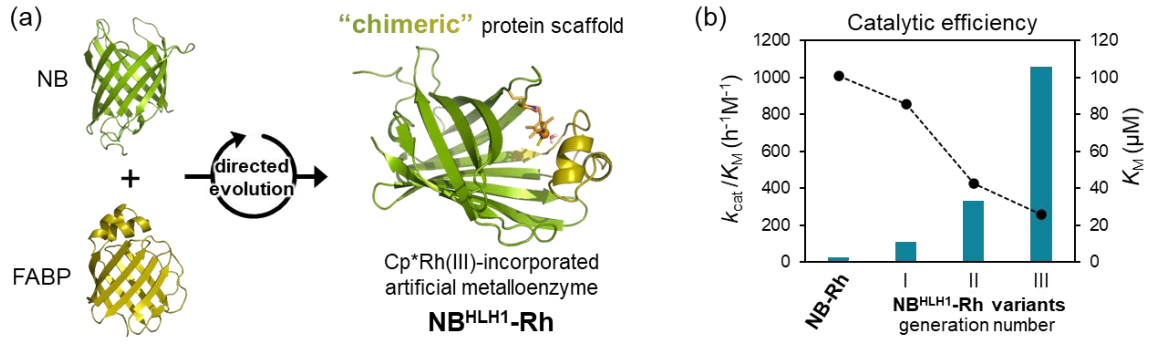


Figure 1. (a) Construction of a Cp*Rh(III)-linked artificial metalloenzyme with chimeric protein scaffold. (b) Michaelis-Menten parameters of evolved NB^{HLH1}-Rh variants for the cycloaddition reaction.

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]）。

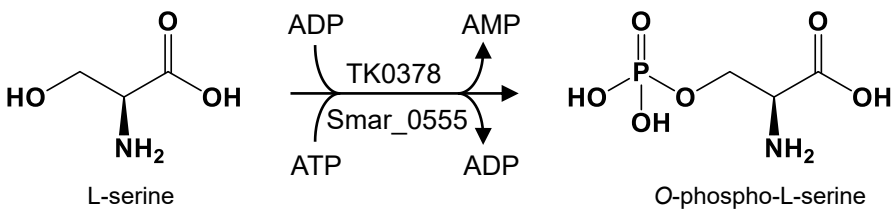


図 1. Serine kinase が触媒する反応

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。

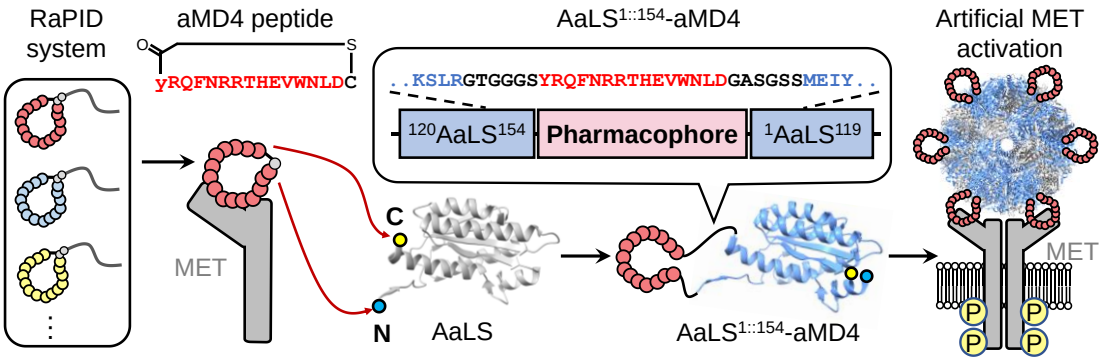


Fig 1. Schematic illustration of *de novo* peptide grafting to a *Aquifex aeolicus* Lumazine Synthase (AaLS) to produce a hepatocyte growth factor receptor (MET) agonist.

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。

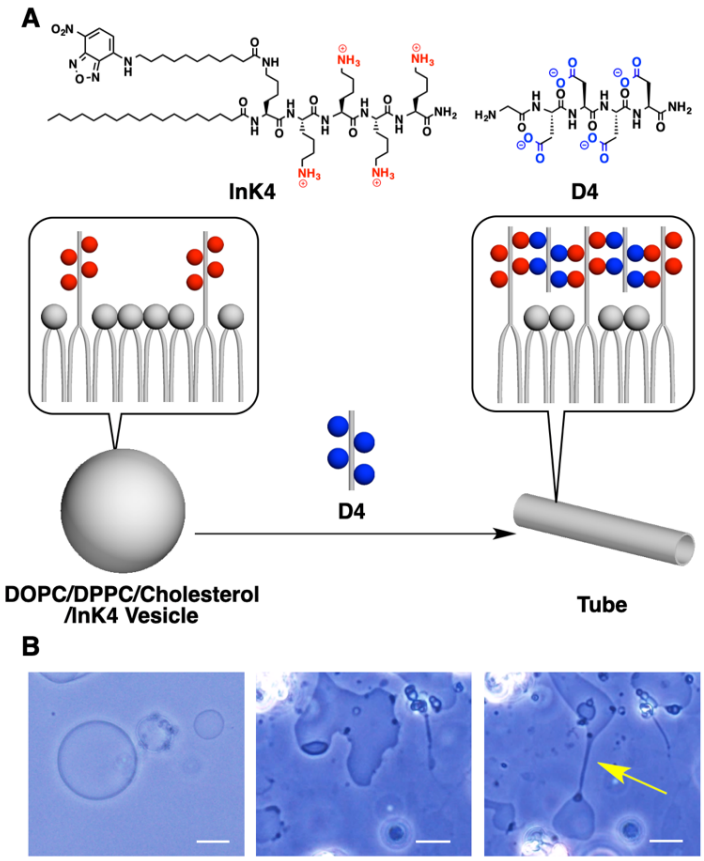


Figure. Schematic illustration (A) and micrographs (B) of the tube formation via the flattened object induced by self-assembly of the peptide receptor. Scale bars = 20 μm.

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。

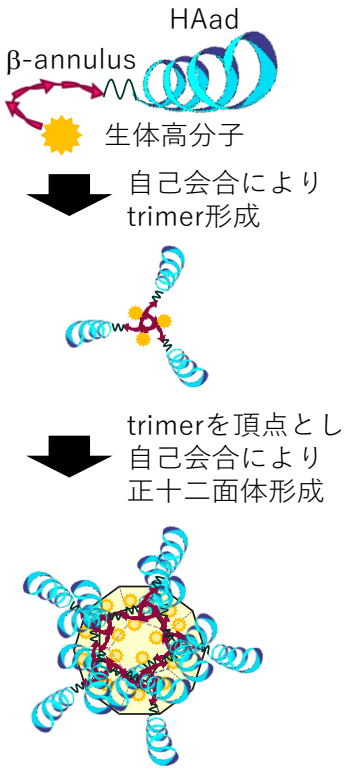


図 1 HAad 修飾／生体高分子内包ナノキャリアの構成。

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]。

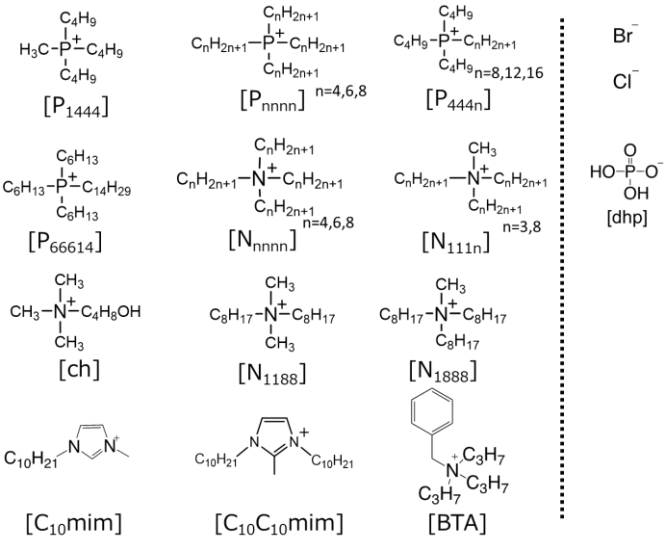


Fig. 1 Structure of component ions used in this study

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。

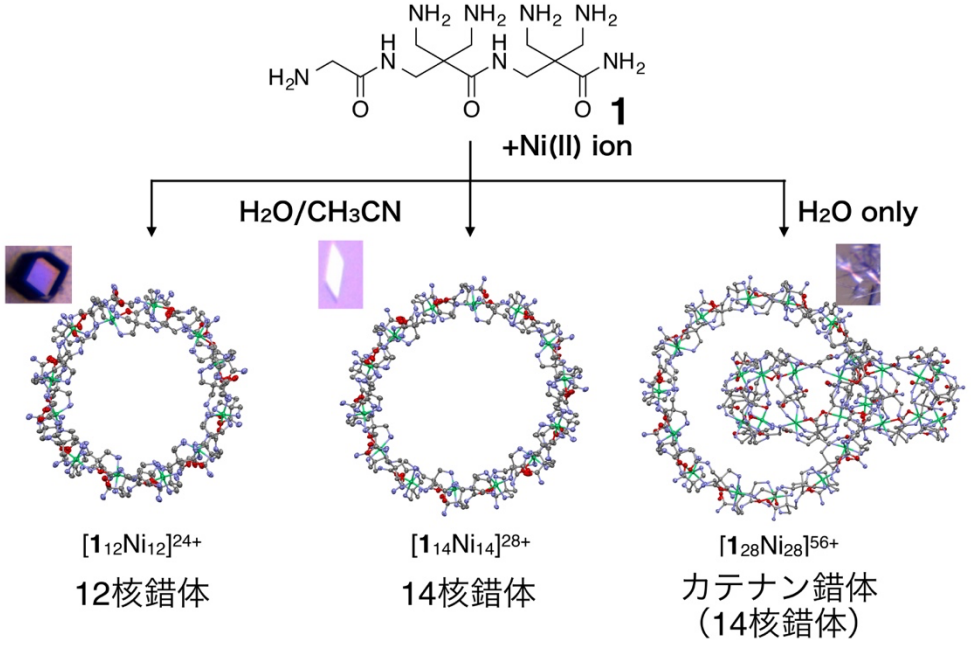


図 1. トリペプチド **1** から形成する３種類の巨大環状錯体の構造とその形成条件

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。

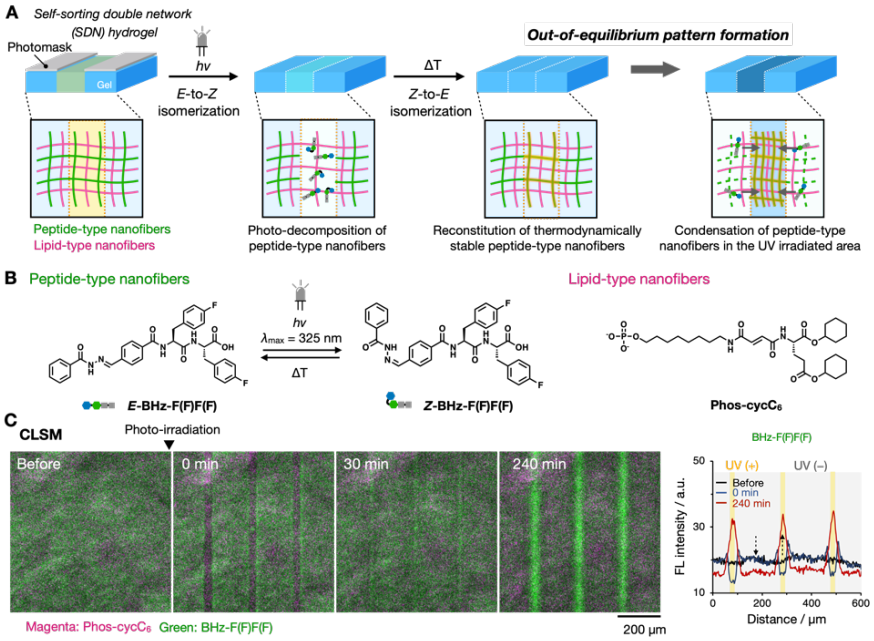


Fig. (**A**) Schematic illustration of this work (**B**) Chemical structures of the gelators (**C**) CLSM imaging of the out-of-equilibrium pattern formation

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)。

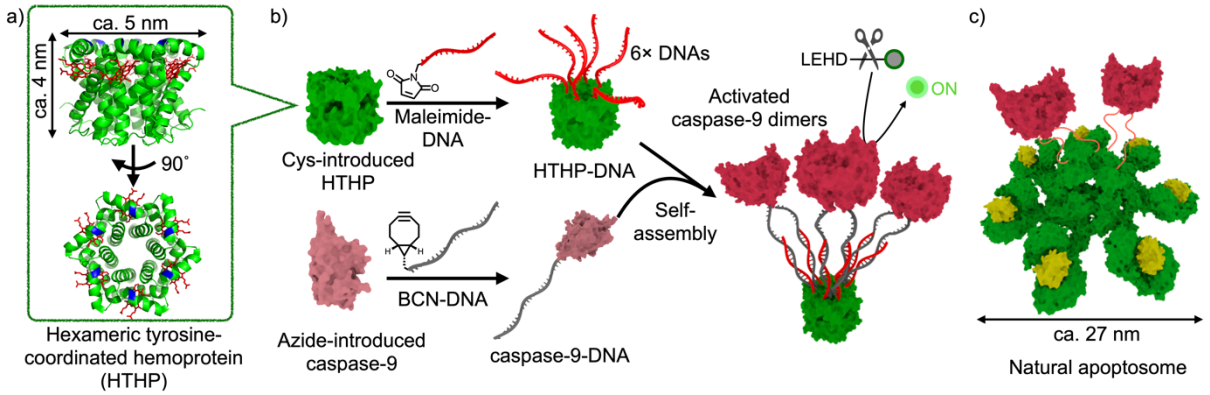


Figure 1. a) Crystal structure of HTHP (PBD ID: 2OYY), red molecules: heme b, blue parts: cysteine-introduced residue, V44. b) Schematic representation of preparation of ssDNA-introduced HTHP and Caspase-9 monomer (light red), and the assembled structure. Proximity-induced activity of caspase-9 dimers (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。

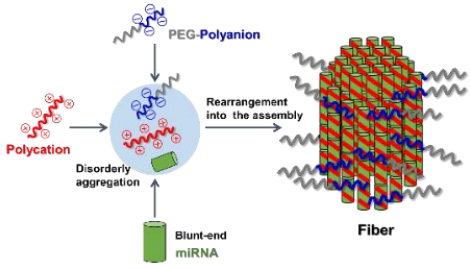


Fig. 1. Schematic Illustration of Fiber formation

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。

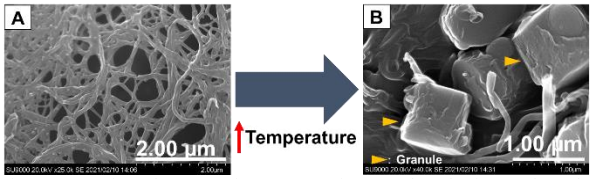


Fig. 2. Scanning electron microscopy micrographs of miRNA-based PICs: The fibrous structure (A) and granules (B).

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。

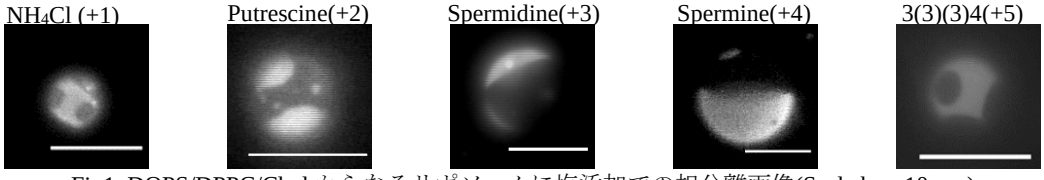


Fig1. DOPS/DPPC/Chol からなるリポソームに塩添加での相分離画像(Scale bar :10 μm)

【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。

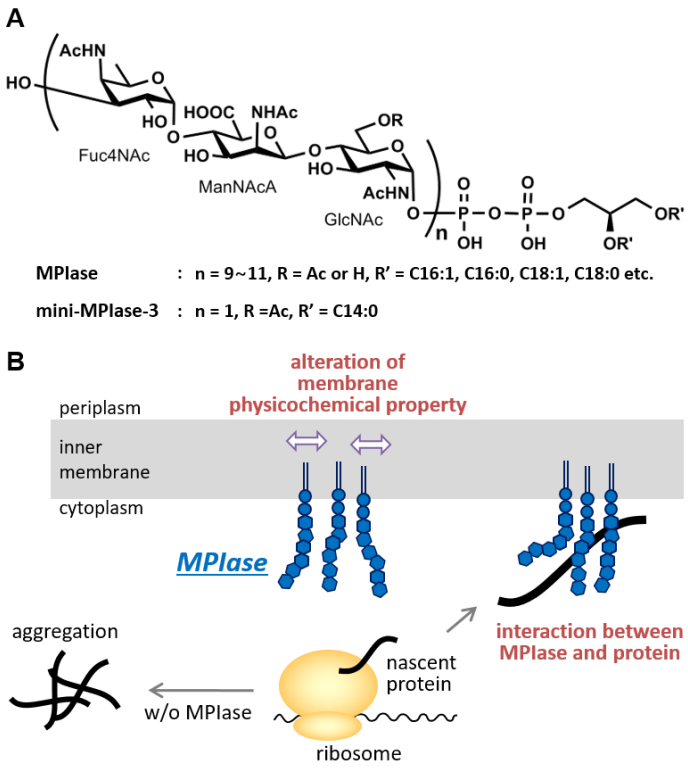


Fig 1. (A) Structure of MPIase and mini-MPIase-3. (B) Schematic illustration for the initial event of membrane protein integration in *E. coli* with MPIase. Glycans of MPIase capture nascent proteins and prevent them from aggregation.

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]。

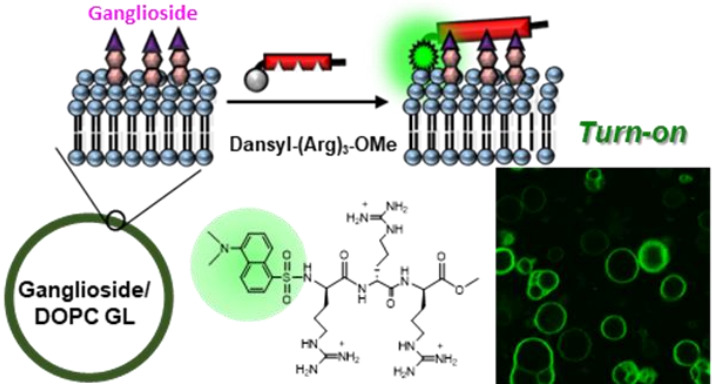


Figure 1. Illustration of fluorescence turn-on of Dansyl-$(Arg)_3$-OMe on giant liposome of DOPC containing gangliosides.

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]。

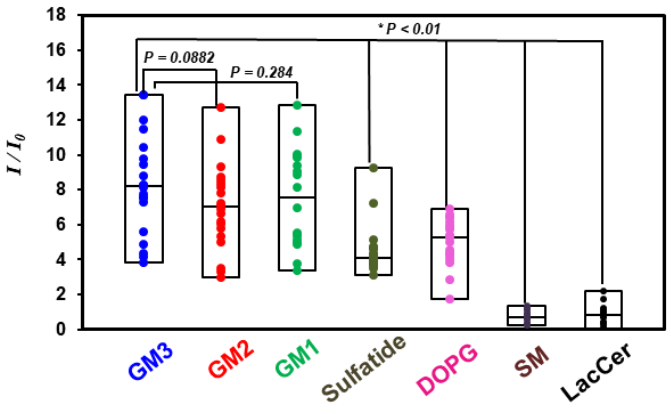


Figure 2. Box plot of fluorescence intensity distribution of 10 μM Dansyl-$(Arg)_3$-OMe on DOPC giant liposomes (N = 20 each) containing 40% gangliosides, sulfatide, DOPG, SM, or LacCer.

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。

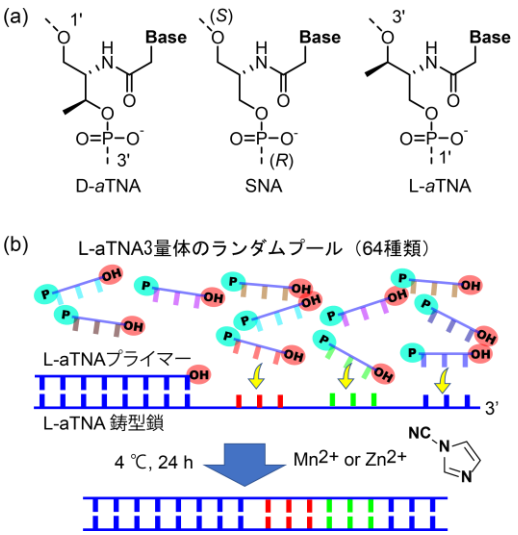


図 1 (a)非環状型人工核酸の構造と、(b) L-*a*TNA の擬似プライマー伸長反応の模式図

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。

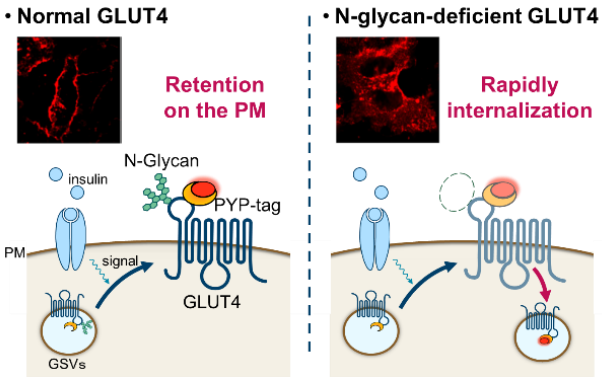


Fig 1. A role of GLUT4-N-Glycan[1)]

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。

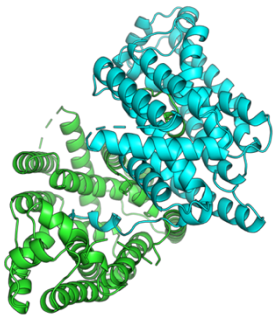


Fig 1. CqsB4 の全体構造

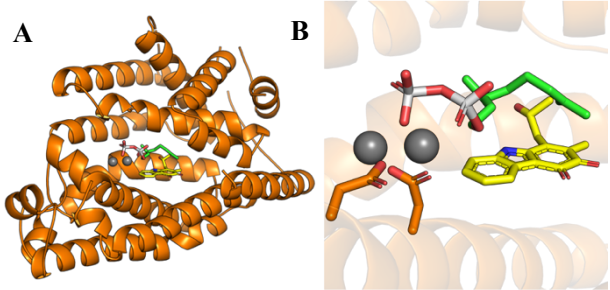


Fig 2. (A) LvqB4 の全体構造 (B)プレニルドナープレニルアクセプター結合様式

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）

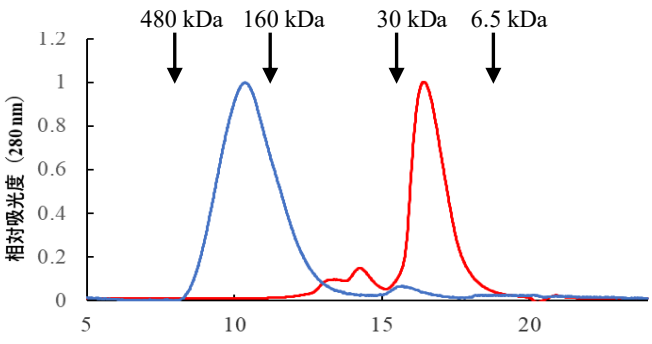


図 1 . HPPU と DOC 添加による Mb19f の会合状態変化のゲルろ過分析　青: 添加前、赤: 添加後

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。

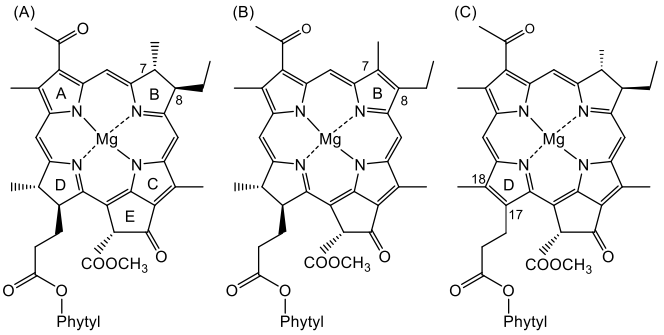


Fig.1: Molecular structures of BChl *a* (A), 3-acetyl-Chl *a* (B), and isomer of 3-acetyl-Chl *a* (C).

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。

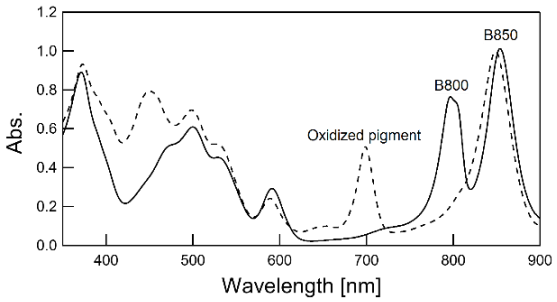


Fig.2: Electronic absorption spectra of native LH2 (solid curve) and oxidized LH2 (broken curve).

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。

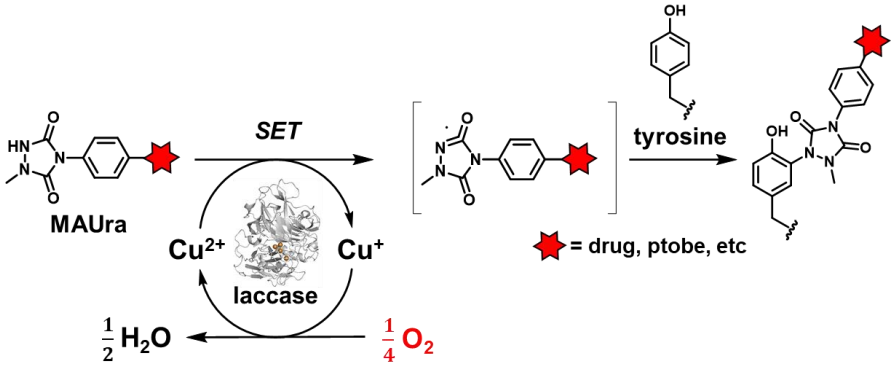


図 1.　laccase による高効率チロシン残基修飾反応

【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。

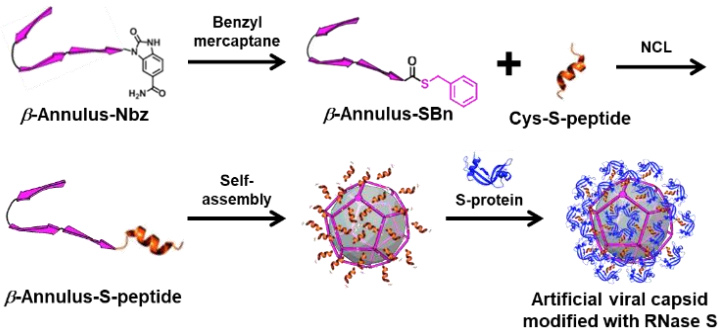


Fig. 1 Synthesis of β-annulus peptide with S-peptide sequence by native chemical ligation (NCL) and self-assembly of artificial viral capsid modified with ribonuclease S.

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)。

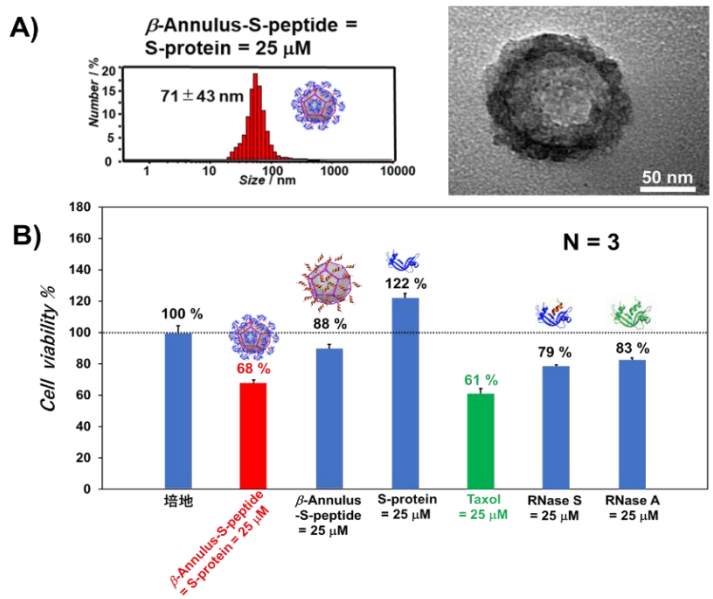


Fig. 2 A) DLS and TEM image of artificial viral capsid modified with RNase S at [β-annulus-S-peptide] = [S-protein] = 25 μM in phosphate buffer (pH 7.4). B) Cytotoxicity assessment by WST assay.

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)

©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

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。

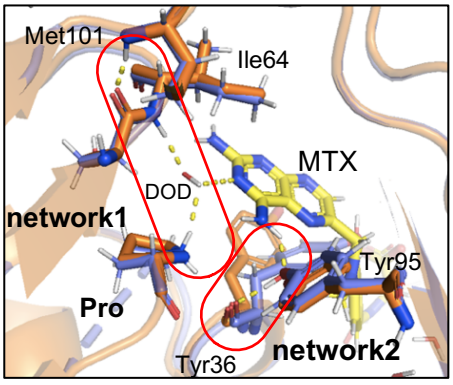


Fig. 1. Overlapped structure of MIF by neutron diffraction (orange) and MTX-MIF complex by X-ray diffraction (blue). The dotted line represents the predicted hydrogen bonding networks.

©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)。

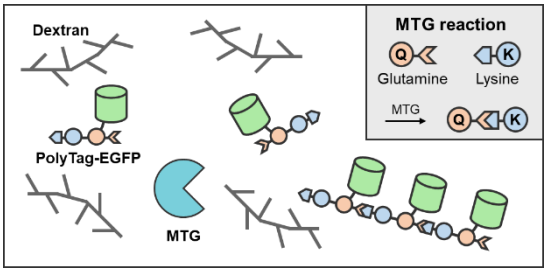


Fig. 1 Schematic illustration of this research.

【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。

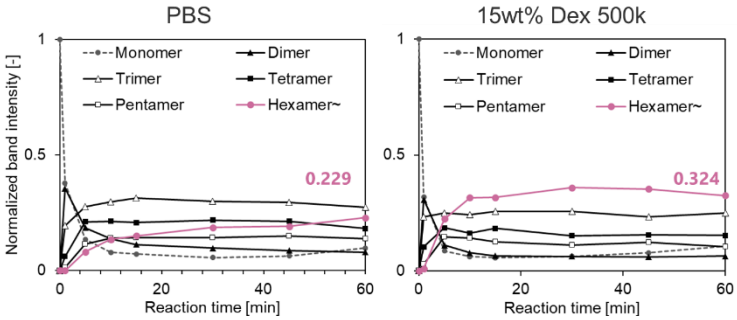


Fig. 2 Time course of product formation analyzed by SDS-PAGE band intensity measurements of the EGFP assembly catalyzed by MTG in PBS solution with or without Dex 500000.

【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。

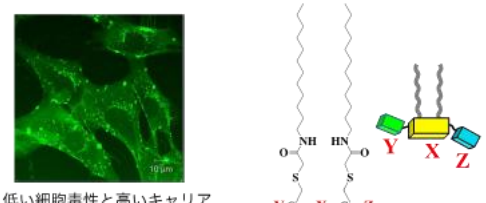


表　各cp-PGのX-, Y-, Z-部位のアミノ酸配列と膜透過性の比較

	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。

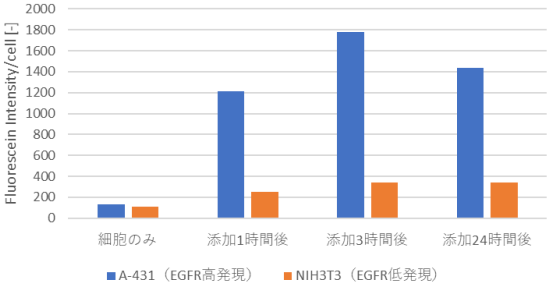


Fig.2 Comparison of the uptake amounts of FITC-labeled GE11-$DKDKC_{12}$-K_1 for A431 and NIH3T3 cells from FACS analysis.

[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。

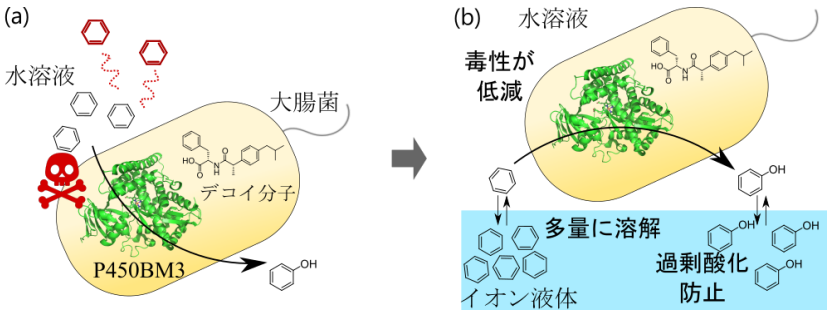


Fig 1.　(a)水溶液一相と(b)水/イオン液体二相でのベンゼン水酸化反応

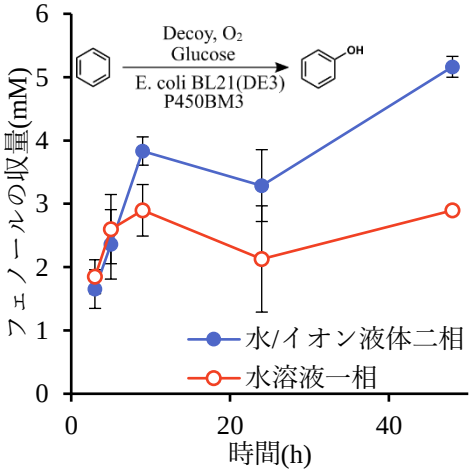


Fig 2.　イオン液体の有無による フェノール収量の変化

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。

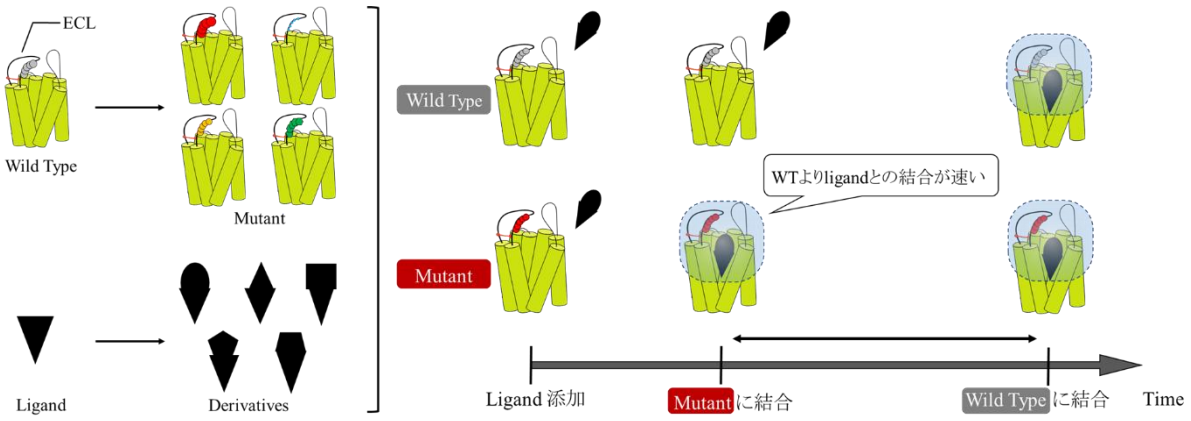


Fig. Overview of chemogenetic approach for regulating GPCR-ligand binding kinetics

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。

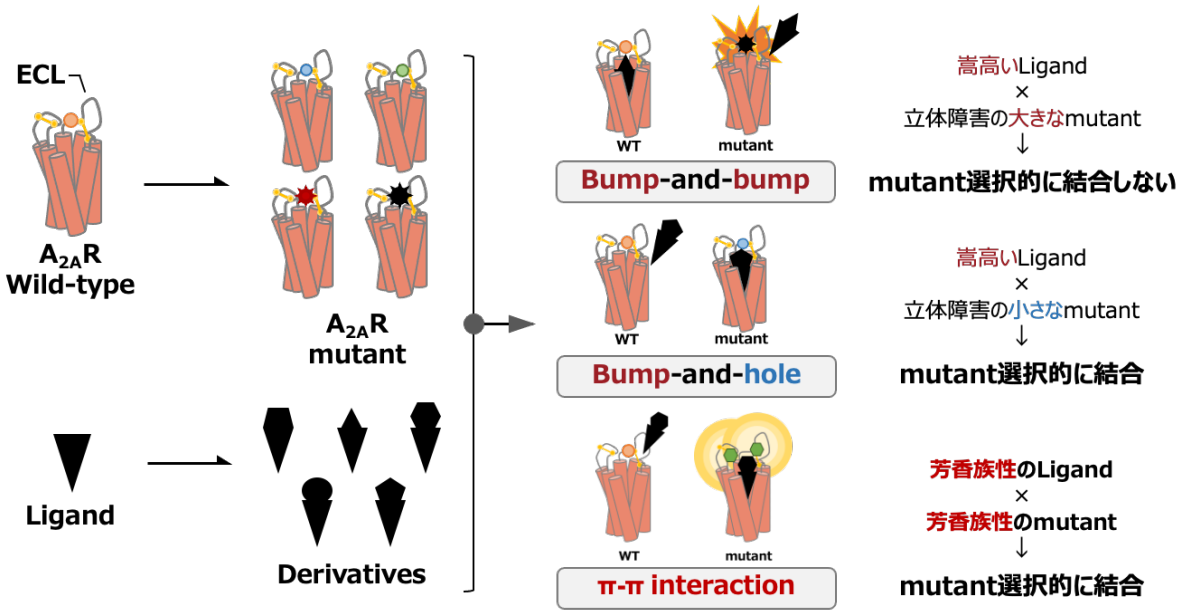


Fig. Outline of chemogenetic regulation of $A_{2A}R$ using ECL engineering

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。

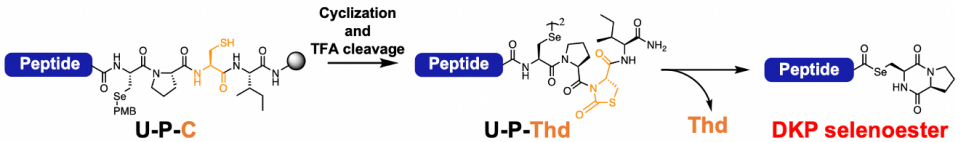


Fig 1. Scheme of peptide selenoester synthesis with diketopiperazine formation.

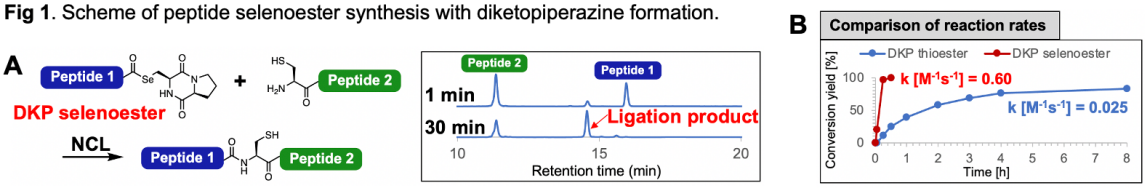


Fig 2. (A) Peptide ligation using peptide selenoester. (B) Kinetics studies of thioester and selenoester in NCL.

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。

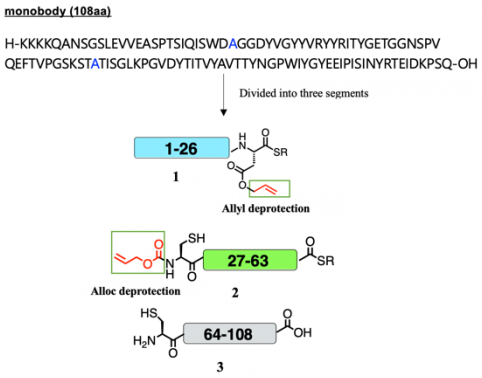


Fig 1. Monobody segment design

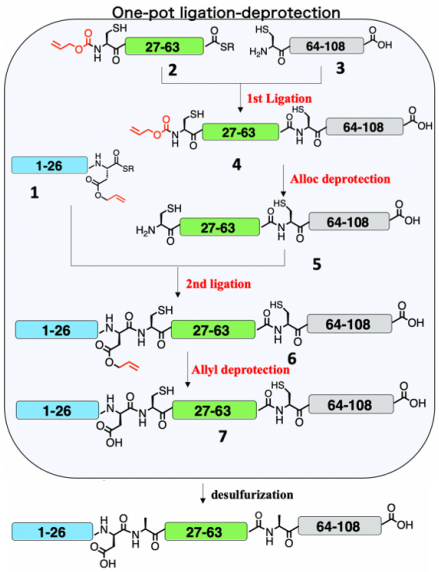


Fig 2. Peptide ligation scheme without purification

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。

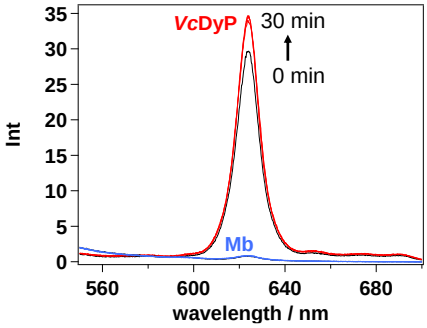


Fig. 1 PPIX generation by *Vc*DyP
black; before reaction, red or blue; after reaction

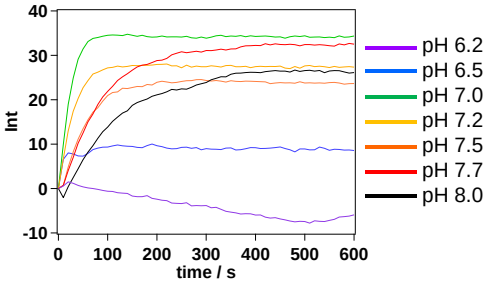


Fig. 2 Time course of intensity change in fluorescence from PPIX

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。

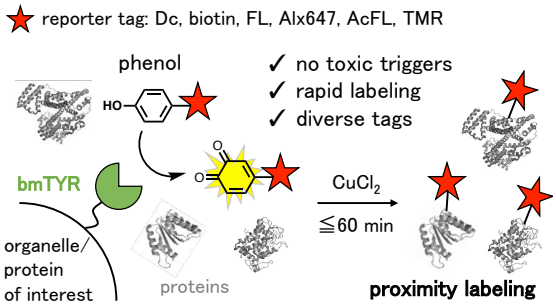


Fig 1. Schematic illustration of proximity labeling with tyrosinase

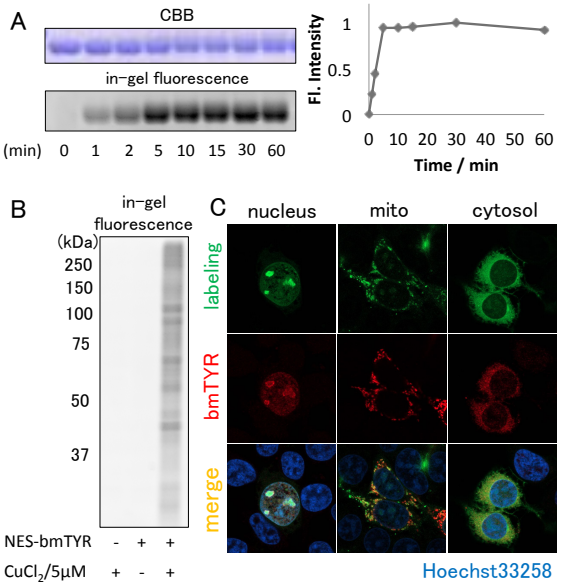


Fig 2. A) Time-dependent BSA labeling. B) and C) Proximity labeling in living cells with subcellular-localized bmTYR.

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。

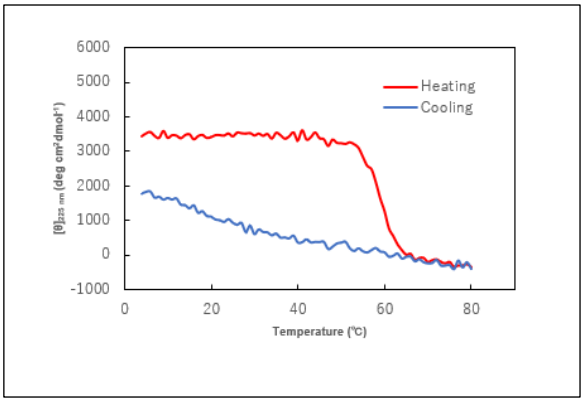


Fig.2. CMP-6 の熱変性温度測定結果

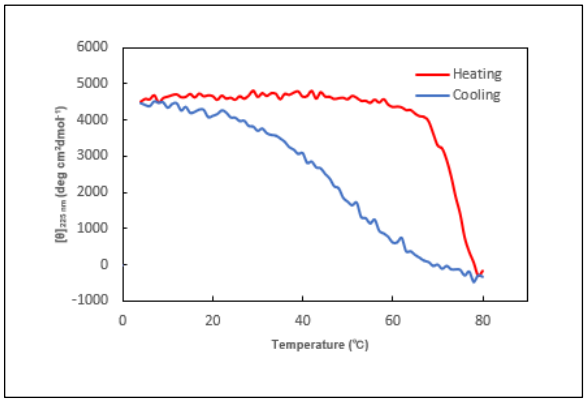


Fig.3. CMP-7 の熱変性温度測定結果

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。

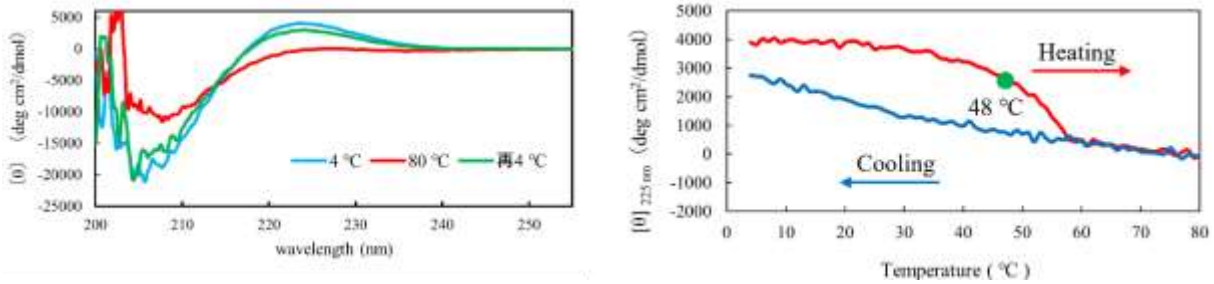


Fig. 2. CMP-8 の二次構造評価, [CMP-8] = 200 μM in 0.1 M Tris-HCl

[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。

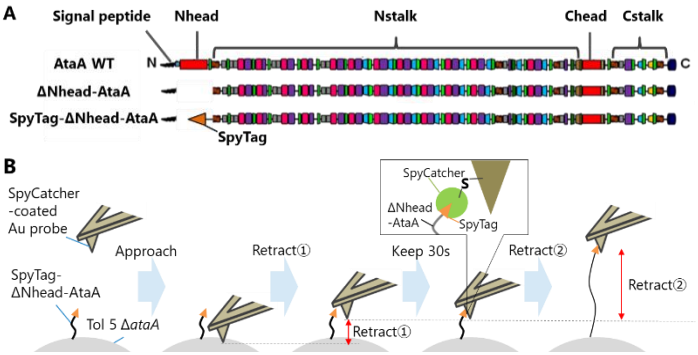


Fig. 1. (A) Schematic representation of AtaA, ΔNhead-AtaA and SpyTag-ΔNhead-AtaA. (B) The analytical method for the mechanical property of Spy-tagged AtaA using AFM.

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。

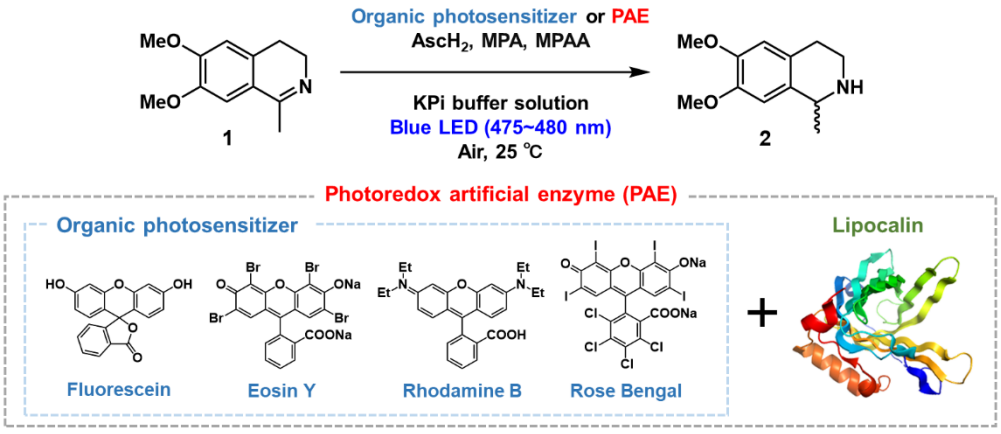


Fig 1. Imine reduction by each organic photosensitizer or photoredox artificial enzyme (PAE).

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。

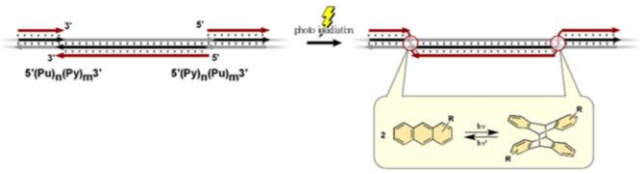


Fig. 1. Photo-induced triplex formation through the dimerization of anthracene-modified DNAs.

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。

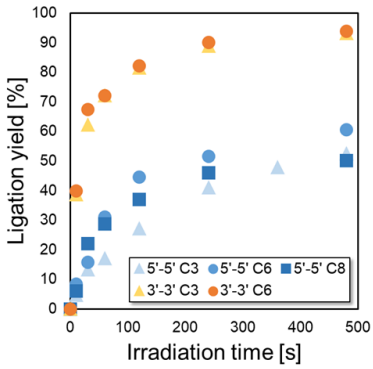


Fig. 2. Time course of the photo-dimerization.

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)。

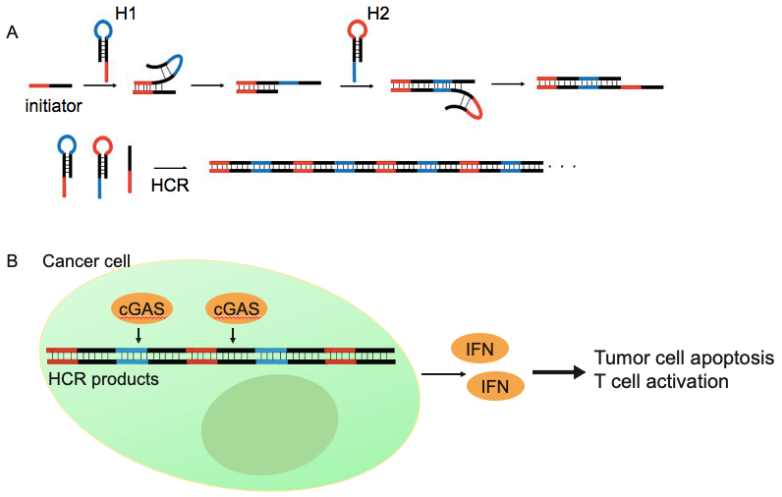


Fig 1. (A) Schematic illustration of HCR. (B) HCR products in cytoplasm induce immune stimulation and tumor cell death.

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

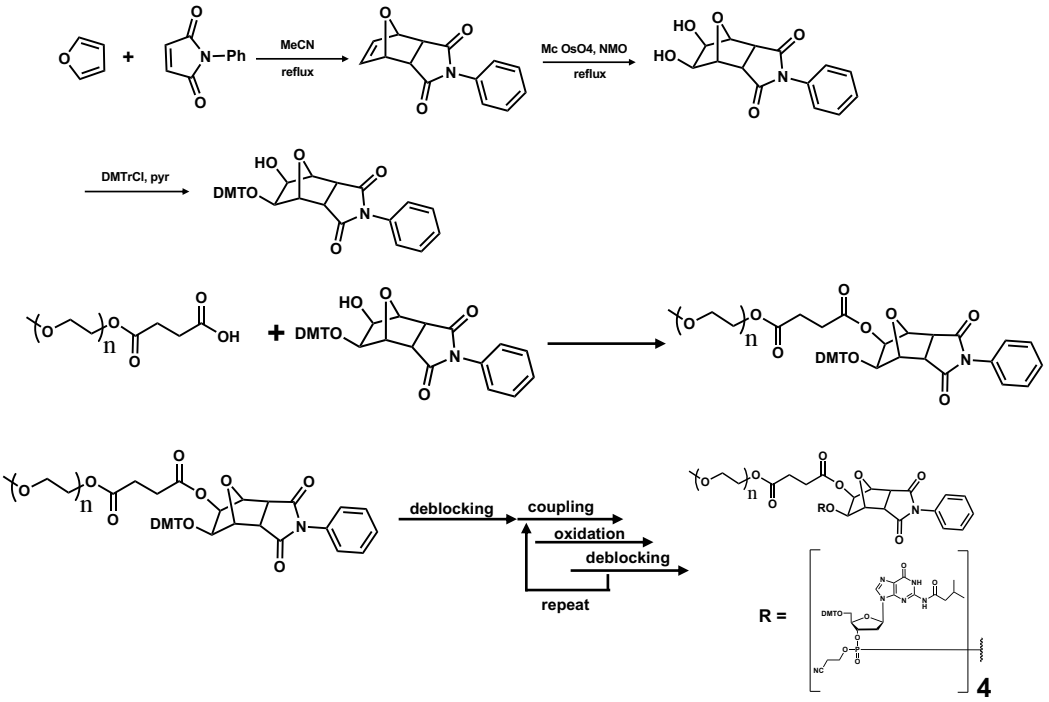
*Xuhao Huang[1], Kazuya Kabayama[1,2,4], Yuichiro Kadonaga[2,4], Atsushi Shimoyama[1,2,4], Kazuhiro Ooe[3,4], Atsushi Toyoshima[2,4], Atsushi Shinohara[2,5], Koichi Fukase[1,2,4] (1. Graduate School of Science, Osaka University, 2. Institute for Radiation Sciences, Osaka University, 3. Graduate School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

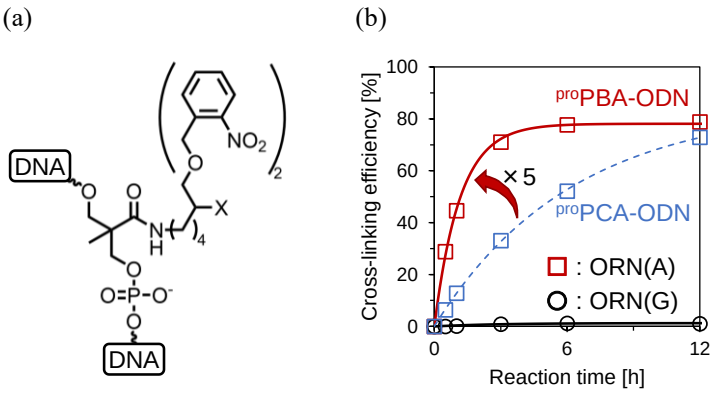


Figure 1. Photo-cross-linking studies on ODNs containing ^{pro}PBA. (a) Chemical structure of Photoresponsive ODNs. (^{pro}PCA-ODN:X=Cl, ^{pro}PBA-ODN:X=Br) (b) Time course of the photo-cross-linking reactions between ORNs and ^{pro}PXA-ODN.

(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。

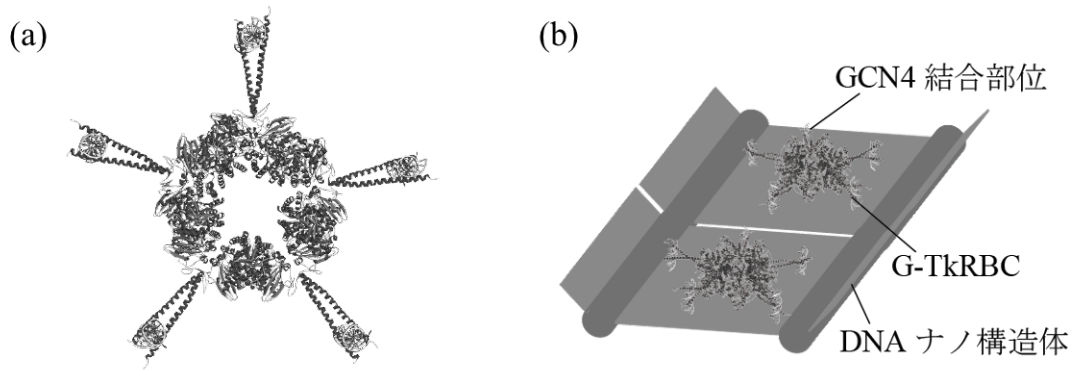


Figure. (a) 十量体 G-TkRBC および (b) GCN4 結合部位を含む DNA ナノ構造体との複合体の模式図

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.

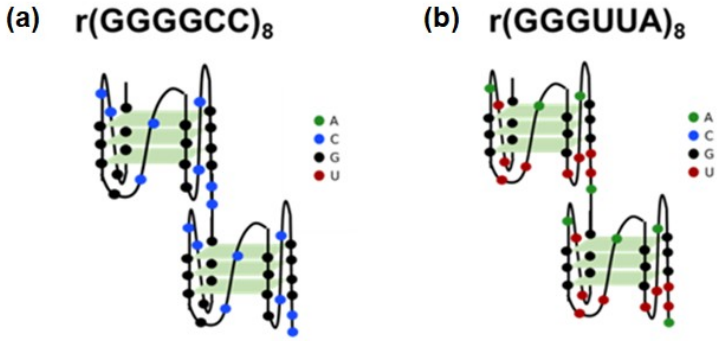


Figure 1. Expected structures of (a) $r(GGGGCC)_8$, and (b) $r(GGGUUA)_8$.

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。

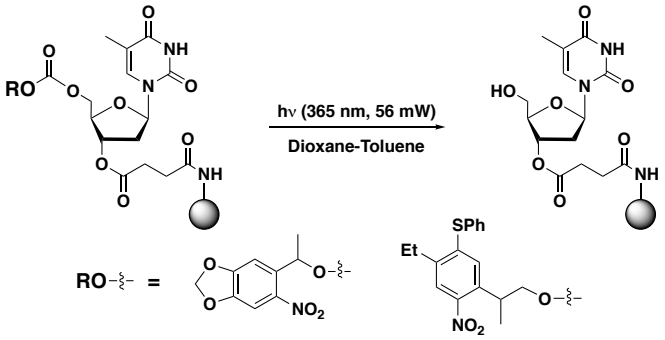


図 1

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。

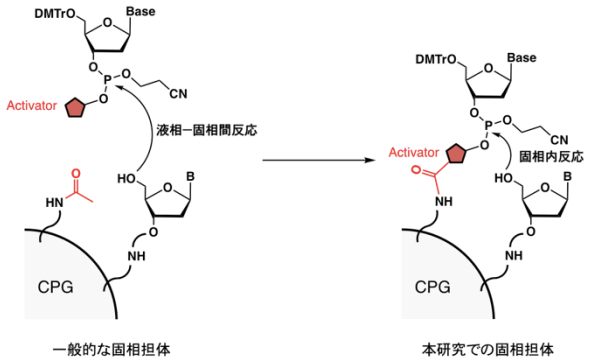


図 2

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.

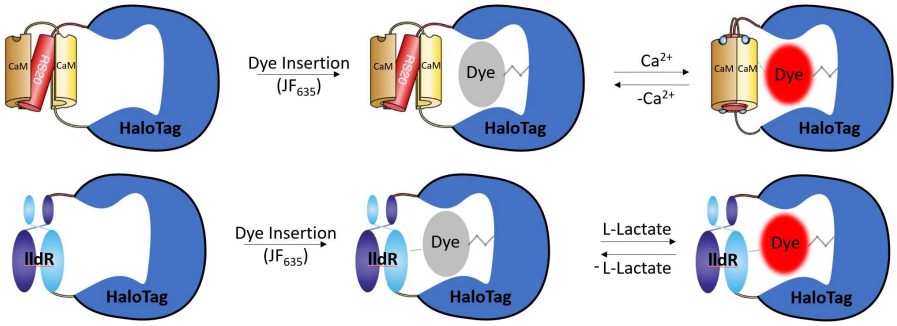


Fig. 1. Schematic illustration of our strategy for chemigenetic indicator development. A sensing domain protein is inserted into HaloTag such that after binding of JF_{635}-HTL, conformational change in the sensor protein domain alters fluorescence signal of the conjugated fluorophore.

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。

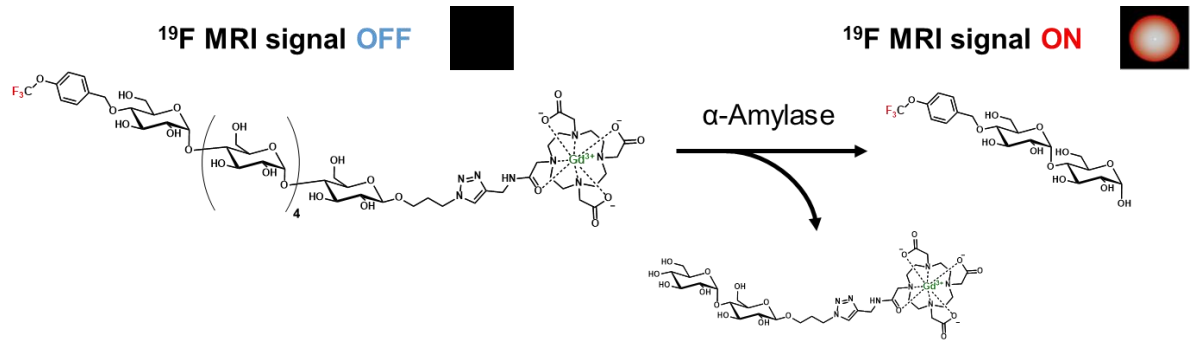


図 1. PRE 効果を利用した α-アミラーゼ活性検出 ^{19}F MRI プローブ

[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。

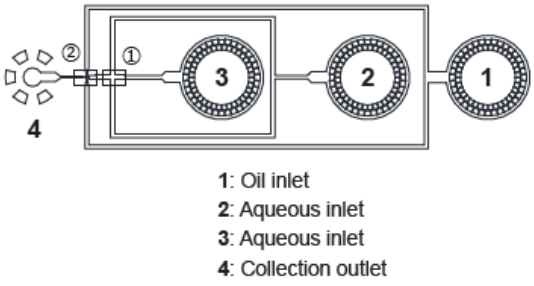


図 1. 微小液滴作製デバイスの概略図

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。

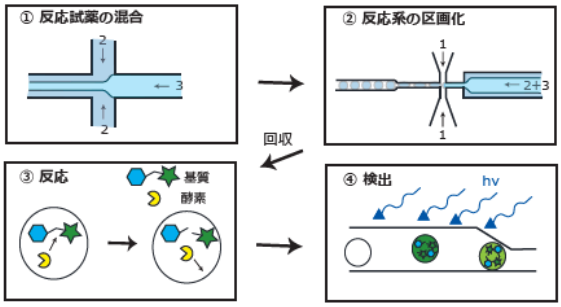


図 2. 酵素活性検出までの概略図

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。

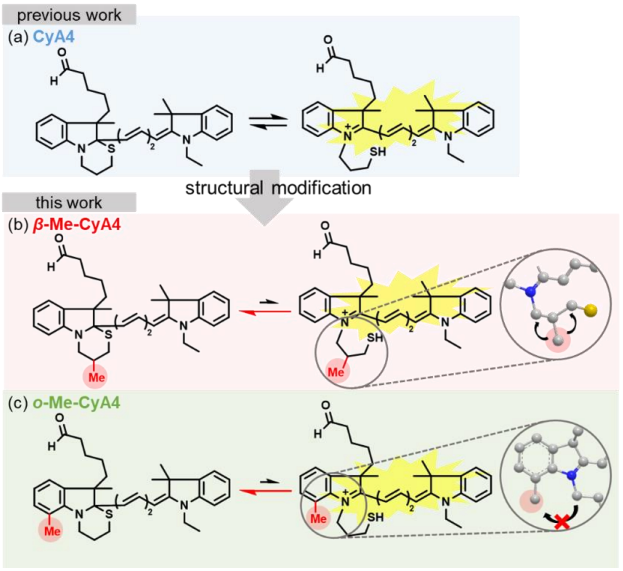


Figure 1. Equilibrium of (a) **CyA4**, (b) ***β*-Me-CyA4**, and (c) ***o*-Me-CyA4**.

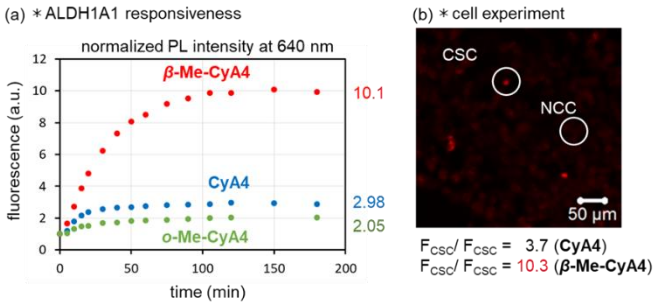


Figure 2. (a) Normalized fluorescence intensity of probes at 640 nm after treatment with ALDH1A1. (b) Representative confocal image of SUIT-2 cells incubated with 1.0 μM ***β*-Me-CyA4** ($\lambda_{ex}/\lambda_{det}$ = 633 nm/647−759 nm).

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。

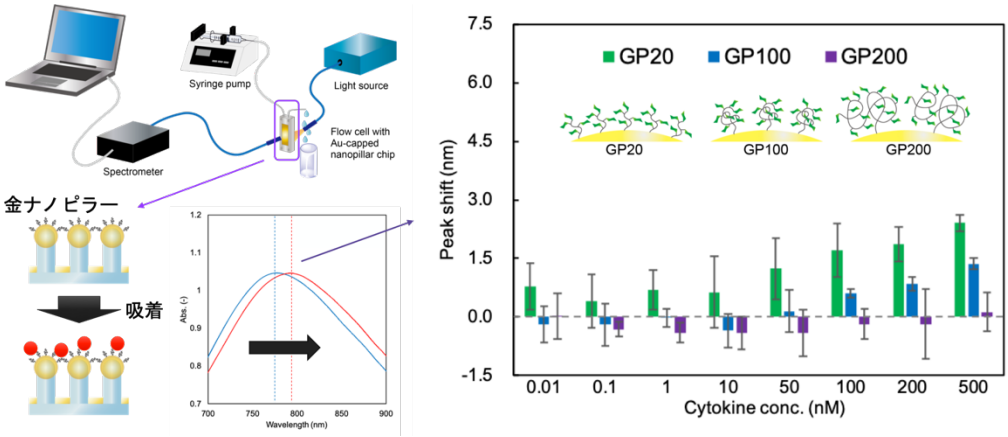


図 1. 糖鎖高分子固定化金ナノピラーを用いたサイトカインの LSPR バイオセンシング

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。

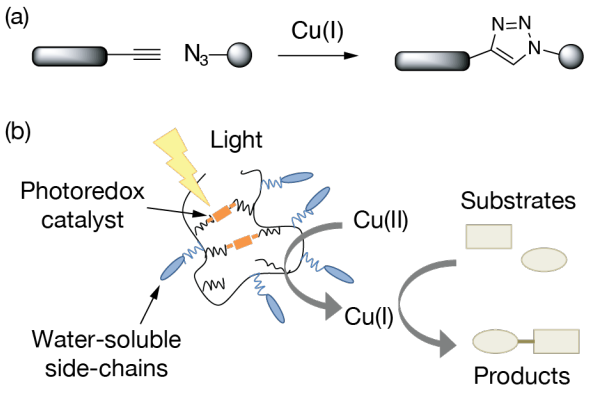


Fig 1. (a) Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) “click reaction”. (b) Water-soluble single-chain polymeric nanoparticles (SCNPs) with photoredox molecules catalyzing reduction of Cu(II) and the following click reaction.

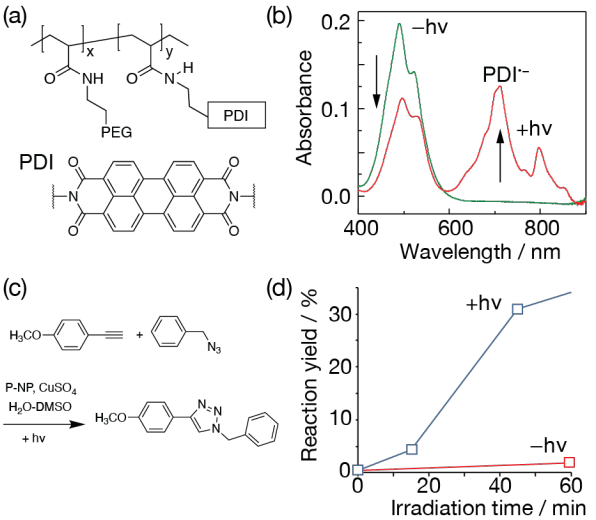


Fig 2. (a) Chemical structure of P-NP. (b) Photoreduction of P-NP. (c) Reaction scheme of photo-click reaction. (d) Reaction yield against the irradiation time.

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).

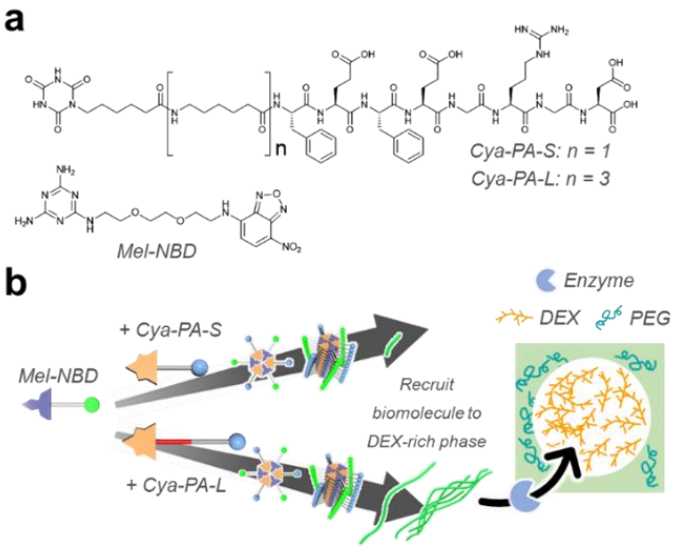


Fig. 1 (a) Molecular Structure (b) Schematic illustration.

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。

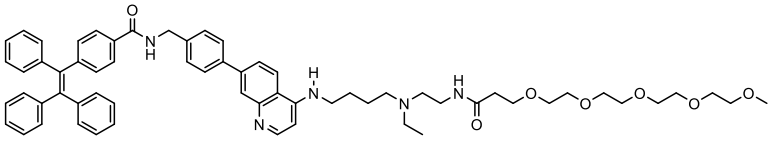


Fig. 1　TPE-4AQ-TeEG

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。

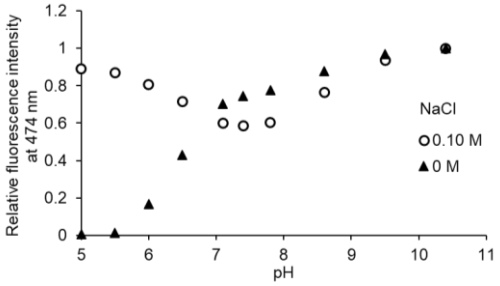


Fig. 2 pH-Dependent change in fluorescence intensity of TPE-4AQ-TeEG (10 μM) in 10 mM buffer (0.5% DMSO) containing 0 M or 0.10 M NaCl. λ_{ex} = 330 nm, 25 ºC.

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.

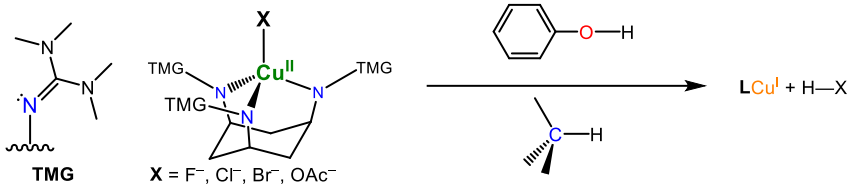


Figure 1. Oxidation reactions of $[Cu^{II}(TMG_3tach)(X)]^+$ (X = F^-, Cl^-, Br^-, AcO^-)

[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）

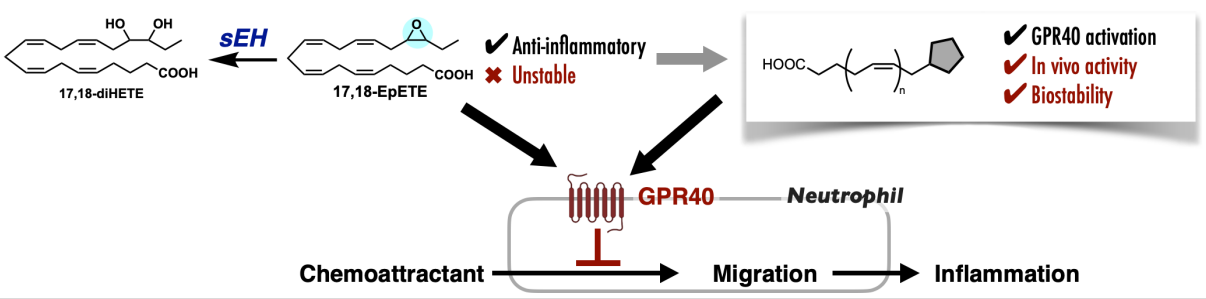
Synthesis of anti-inflammatory fatty acid metabolite 17,18-EpETE analogues with improved biostability

(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。

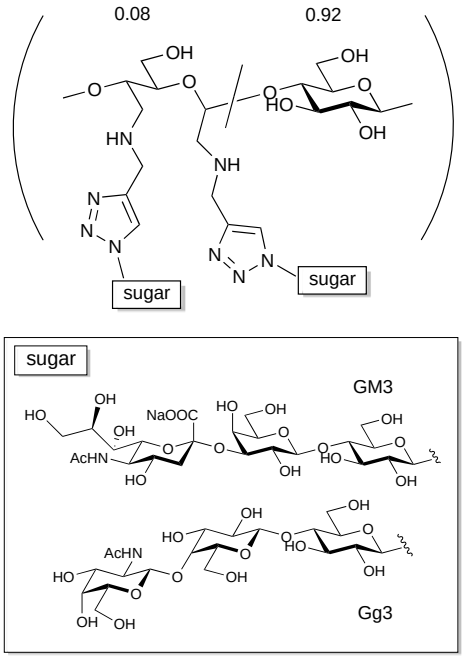


Fig 1. Structures of NDC-GM3 and NDC-Gg3.

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。

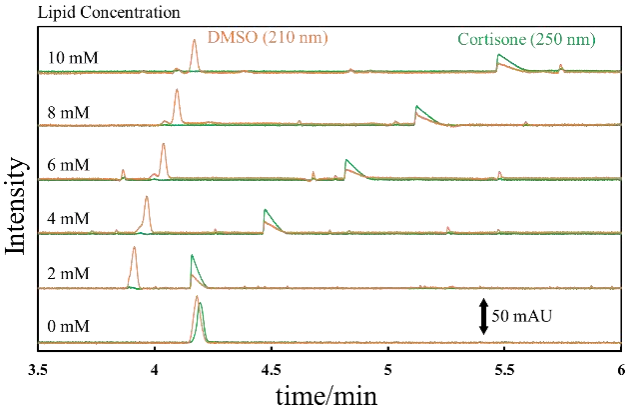


Fig.1 POPC/PS（60/40 mol%）リポソームを擬似固定相とする際のエレクトロフェログラム

【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。

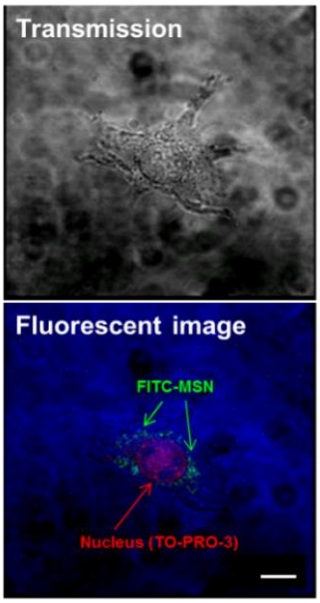


Fig 1. Fluorescent microscopic observation of DC2.4 cells after the incubation with FITC-MSN.

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。

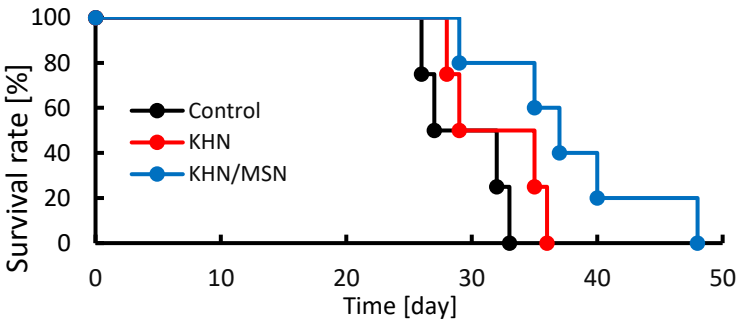


Fig 2. Survival curve of MSN-vaccined mice after the transplantation of E.G7-OVA cells.

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。

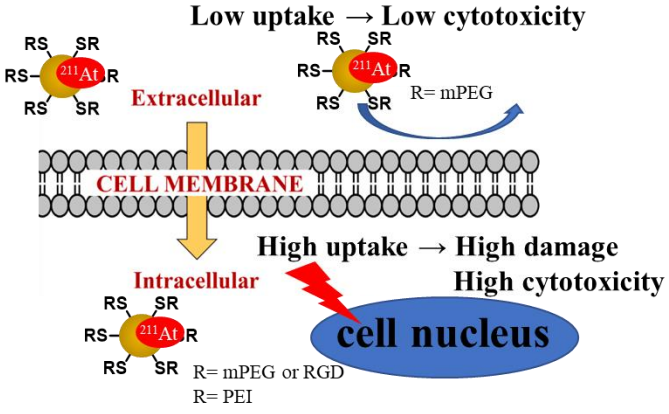


Fig.1 Schematic research concept

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。

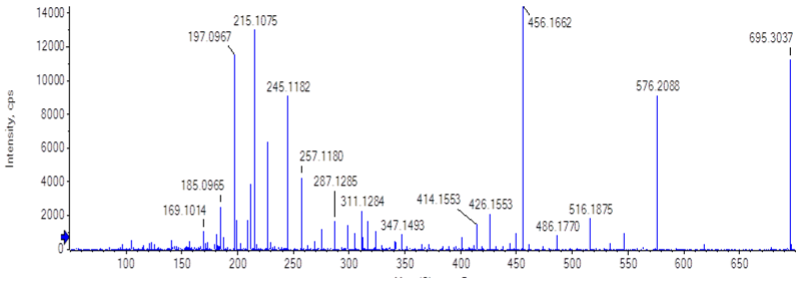


Fig. 1. T-2-G-OSu の LC-MS/MS 解

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。

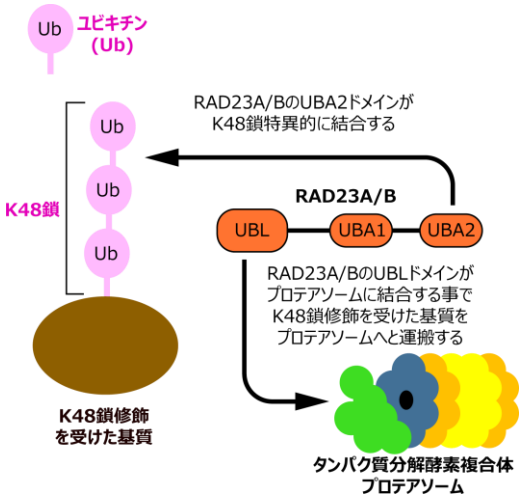


Fig.1 RAD23A/B の機能

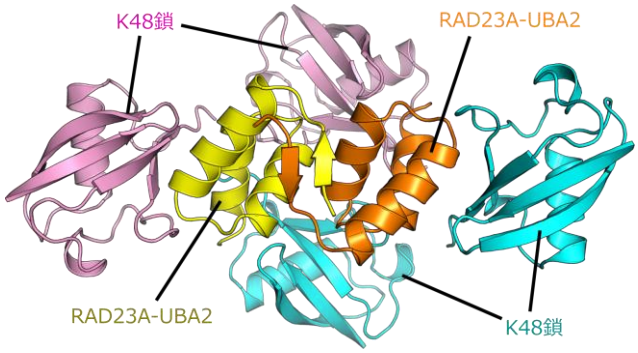


Fig.2 RAD23A-UBA2 と K48 鎖との複合体の結晶構造

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。

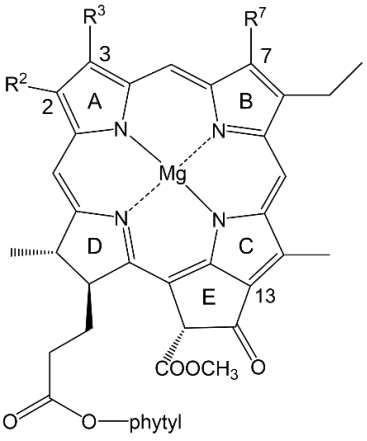
1) Y. Baba, K. Yamamoto, W. Yoshida, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 4765 (2019)
2) N. Taka, I. Karube, W. Yoshida, *Anal. Lett.*, **52**, 1258 (2019)
3) G. Veggiani, T. Nakamura, M. D. Brenner, R. V. Gayet, J. Yan, C. V. Robinson, M. Howarth, *PNAS*, **113**, 1202 (2016)

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.

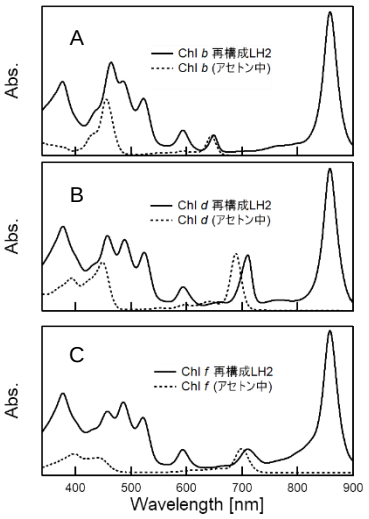


Fig. 2 Absorption spectra of reconstituted LH2 (solid curve) and chlorophylls in acetone (broken curve). A: Chl *b* B: Chl *d* C: Chl *f*.

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。

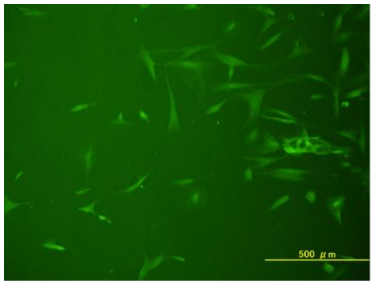


Fig 1. Morphological evaluation of hMSCs after 24 h of incubation on plates coated with B-CUBE. Scale bar = 500μm

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）。

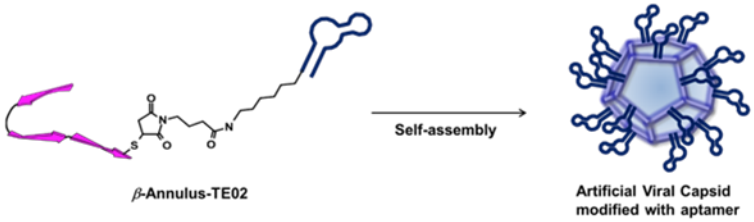


Fig.1 Schematic illustration of construction of artificial viral capsid modified with DNA aptamer.

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。

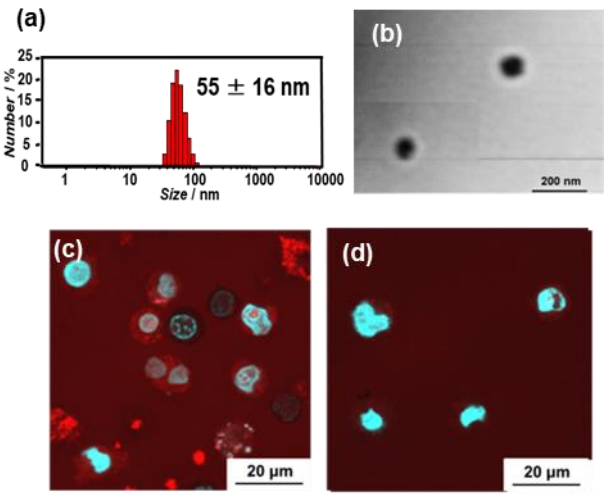


Fig.2 (a) DLS size distribution and (b) TEM image of artificial viral capsid modified with TE02 aptamer at 25 μM in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). (c, d) CLSM images of Daudi cells in the presence of TAMRA-labeled artificial viral capsid with (c) or without (d) TE02 aptamer.

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。

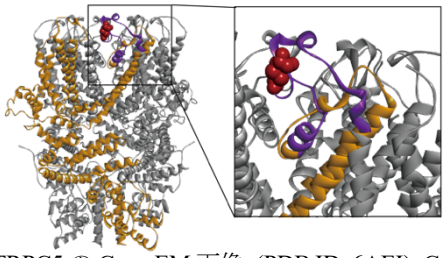


図 1. TRPC5 の Cryo-EM 画像 (PDB ID: 6AEI)。Cys553・Cys558 を CPK 表示で示した。

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。

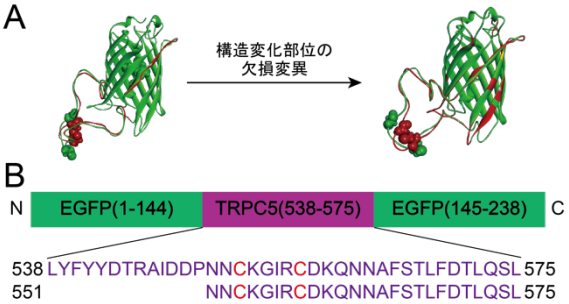


図 2. (A) 欠損変異のシミュレーション (B) EGFP-TRPC5 および欠損変異体の模式図および構造変化部位のアミノ酸配列

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。

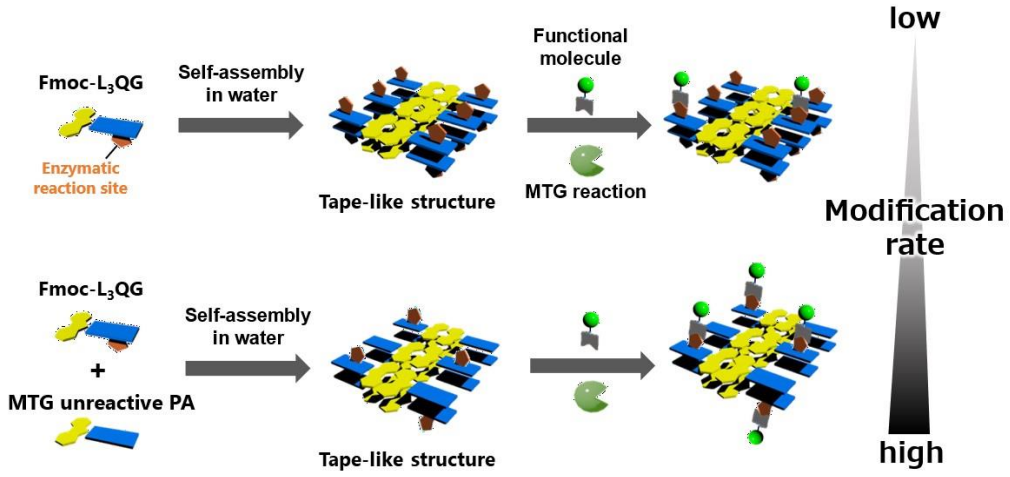


Fig. 1 Conceptual diagram of this study.

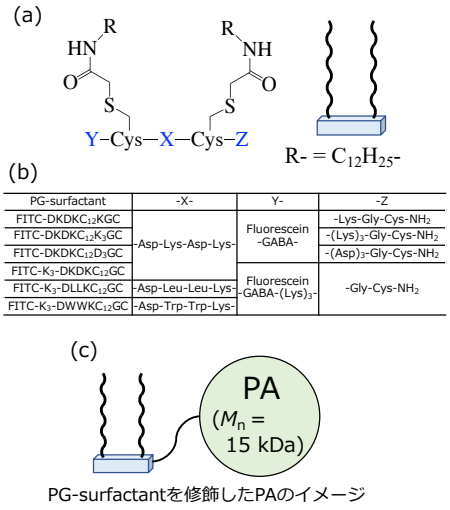
[1] R. Wakabayashi, *et. al*., *Chem. Commun*., **55**, 640-643 (2019)
[2] R. Wakabayashi, *et. al*., *Int. J. Mol. Sci*., **22**, 3459 (2021)

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。

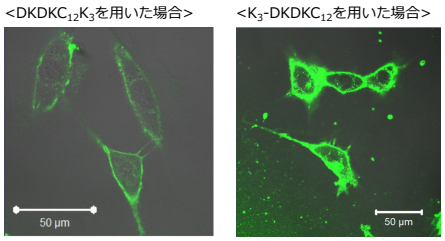


図２ PG-surfactant 修飾 PA の NIH3T3 細胞膜表面への分配挙動の評価（10 μM の濃度で添加１時間後に過剰な試薬を除いて、CLSM 測定した画像の比較）

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。

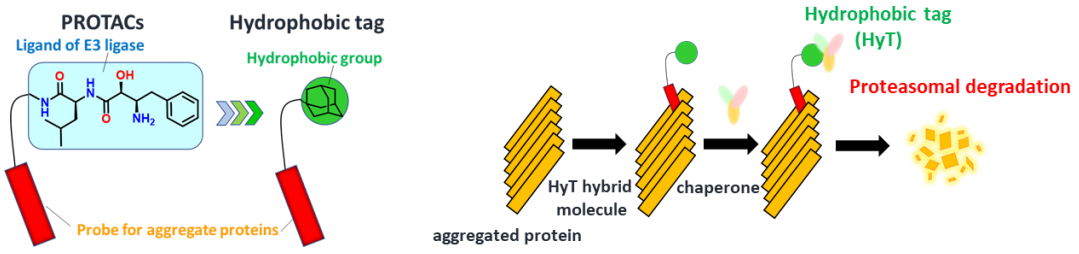


図１．疎水性タグ法による凝集タンパク質分解機構

【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。

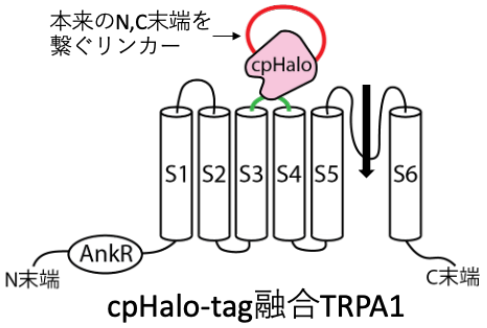


Fig. 1 Design of cpHalo-tag fused TRPA1 (cpHalo-TRPA1).

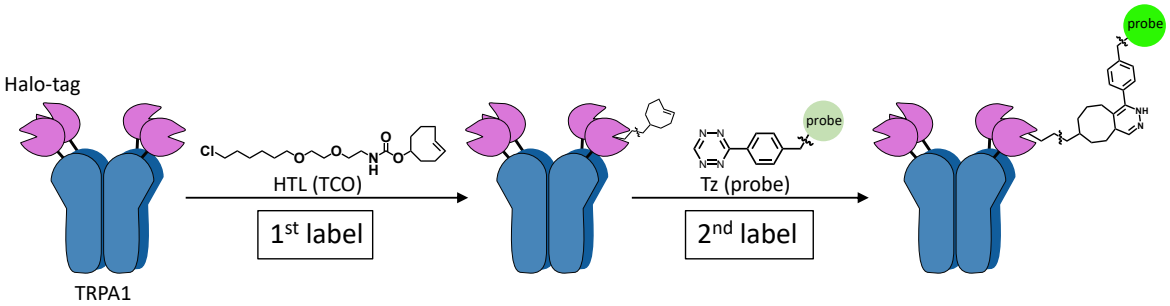


Fig. 2 Schematic illustration of bioorthogonal two-step labeling to cpHalo-TRPA1.

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。

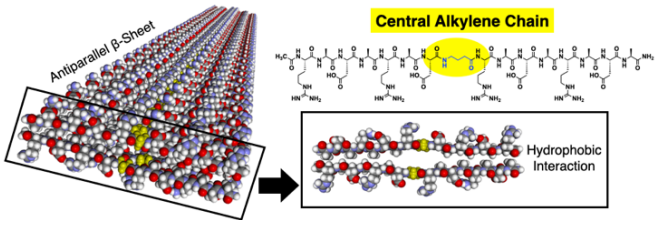


Fig. 1 A schematic image of packing structure of **A8Abu**.

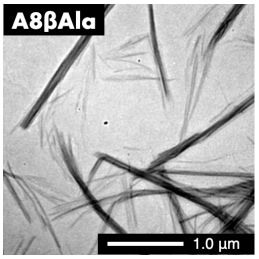


Fig. 2 A transmission electron micrograph of **A8βAla**.

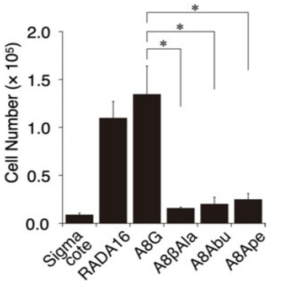


Fig. 3 A histogram displaying the number of fibroblasts attached on glass surfaces coated with Sigmacote and peptides.

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。

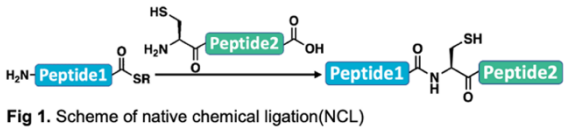


Fig 1. Scheme of native chemical ligation(NCL)

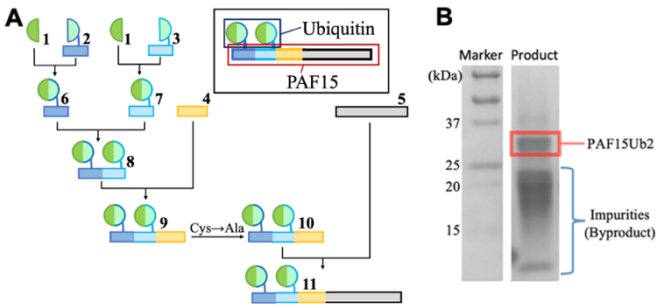


Fig 2. Synthesis of PAF15Ub2. (A) Ligation scheme of PAF15Ub2. (B) Result for SDS-PAGE analysis.

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。

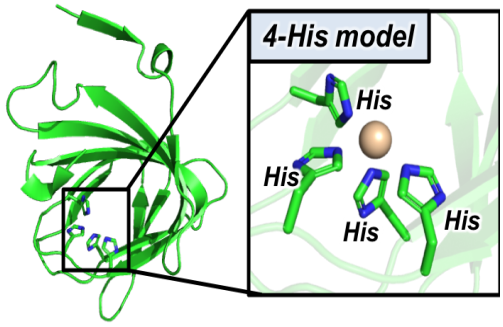


Fig 1. Cupin-type protein (TM1459)

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。

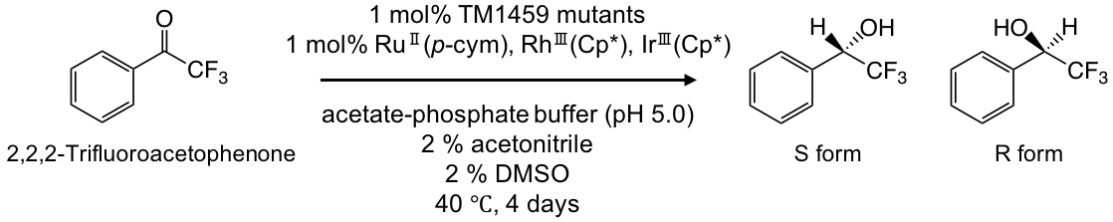


Fig 2. Model reaction employed in this study

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。

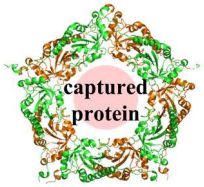


Fig 1. PRX1 and captured protein.

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。

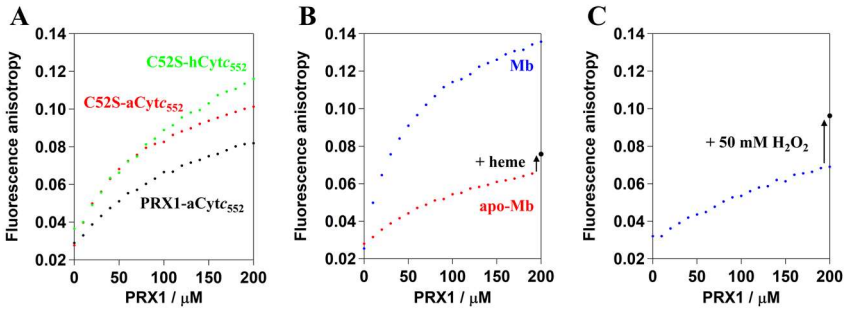


Fig 2. (A) PRX1 (wild-type or C52S)-induced fluorescence anisotropy change of cytochrome c_{552}. **(B)** PRX1 (C52S)-induced fluorescence anisotropy change of Mb in the absence and presence of heme **(C)** PRX1-induced fluorescence anisotropy change of Mb in the absence and presence of H_2O_2

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。

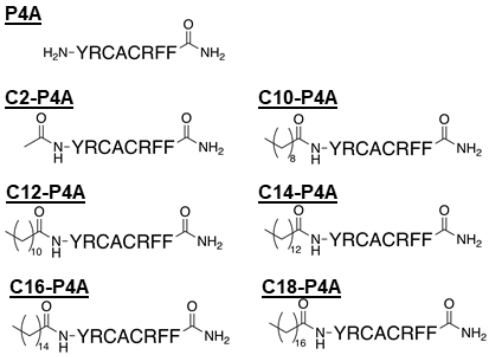


Fig. 1. Peptide sequences

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。

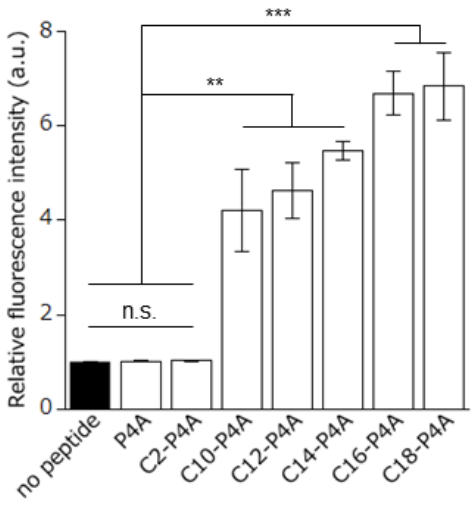


Fig 2. 70 kDa dextran uptake in the presence of serum.

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。

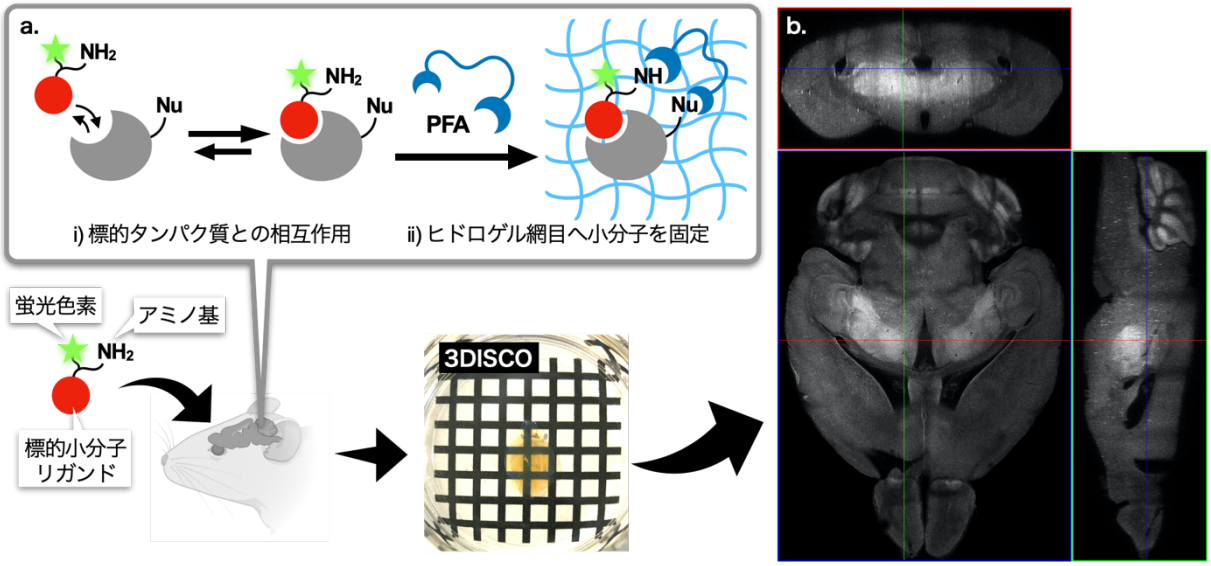


Fig. (**a**) Strategy of fixation-driven chemical crosslinking. (**b**) 3D CLSM imaging of mGlu1 ligand distribution in mouse whole brain.

©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。

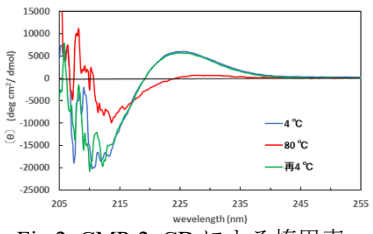


Fig 2. CMP-2 CD による楕円率

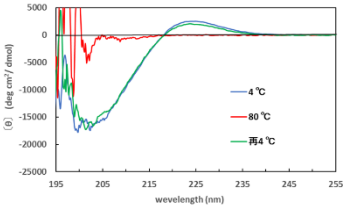


Fig 3. CMP-3 CD による楕円率

[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。

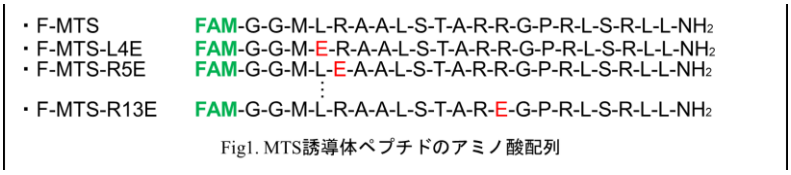


Fig1. MTS誘導体ペプチドのアミノ酸配列

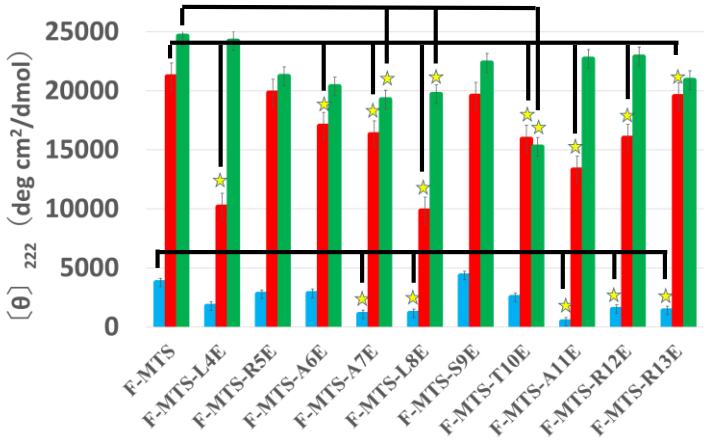


Fig2. MTS 誘導体ペプチドの 222 nm の残基楕円率。青 ; PBS, 赤 ; 10 mM SDSPBS 緑 ; TFE 星印は、それぞれ F-MTS を基準として P<0.01 を表している

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。

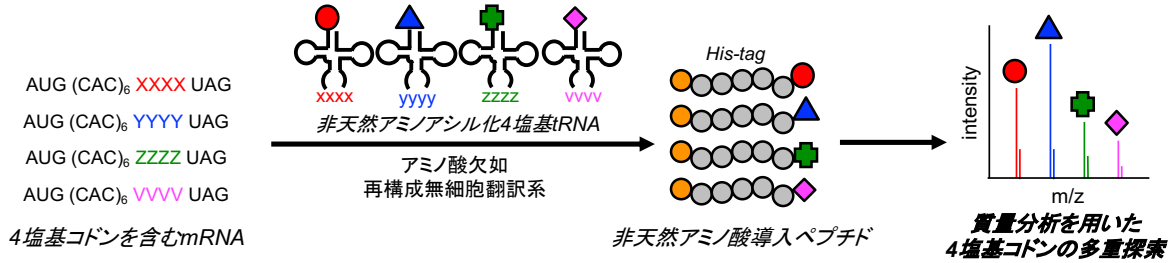


図１．翻訳可能な４塩基コドンの多重探索法

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。

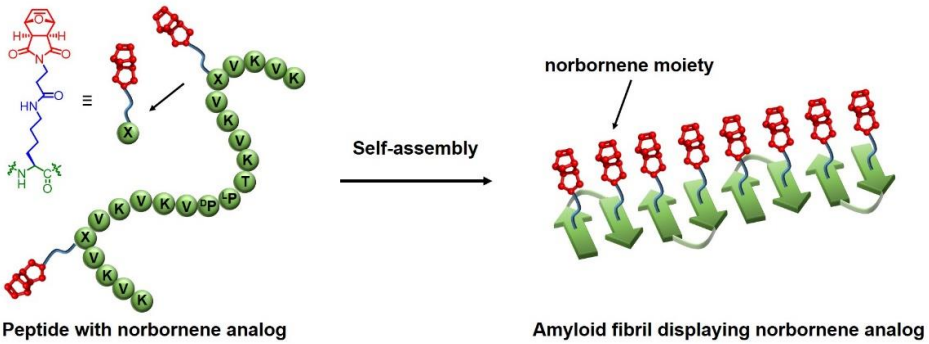


Fig. 1. Schematic representation of preparation for amyloid fibril displaying a norbornene analog.

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。

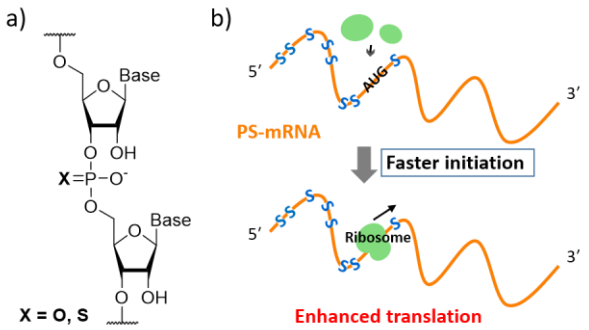


図 1. (a) ホスホロチオエート修飾を含む RNA 鎖の化学構造。(b) 本研究の概要。

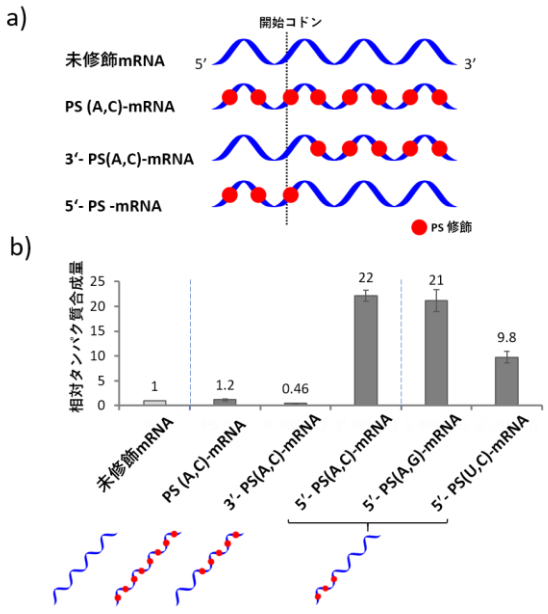


図 2 (a) PS 修飾を持つキメラ mRNA の設計。(b) 5′ 非翻訳領域のみに PS 修飾した mRNA (5′ -PS-mRNA)が高い翻訳効率を示した。

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。

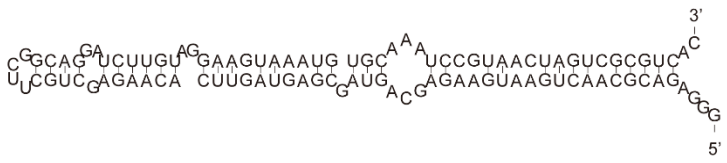


Fig.1 : RNA 構造予測プログラムによる 17-3 RNA の 2 次構造モデルの一例

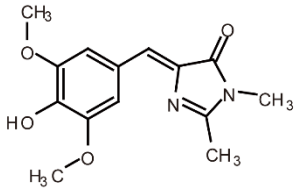
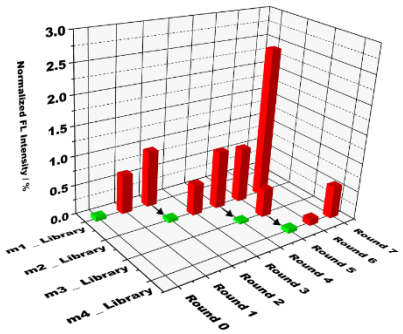


Fig.2 : DMHBI 構造式

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

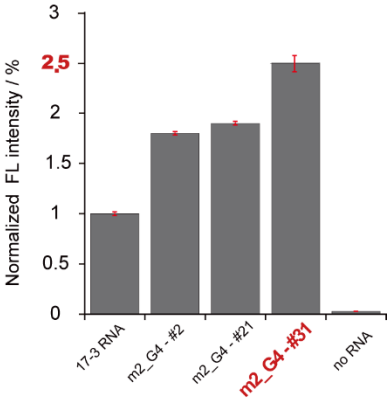


Fig.4 : 単離した 17-3 RNA 変異体蛍光活性比較

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。

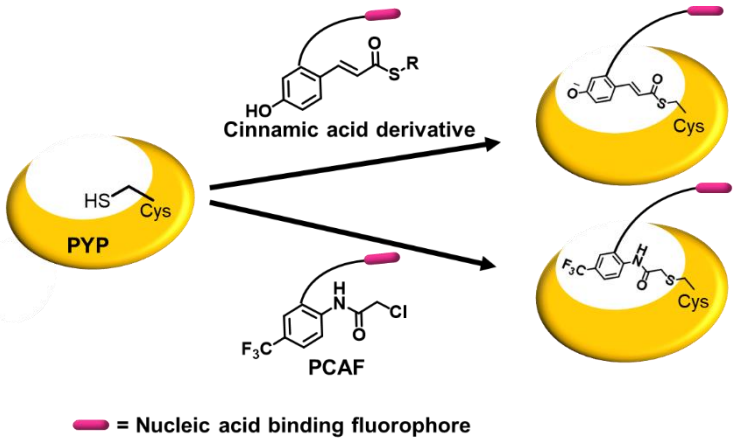


Fig 1. Labeling reaction of PYP with natural and designed ligands

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。

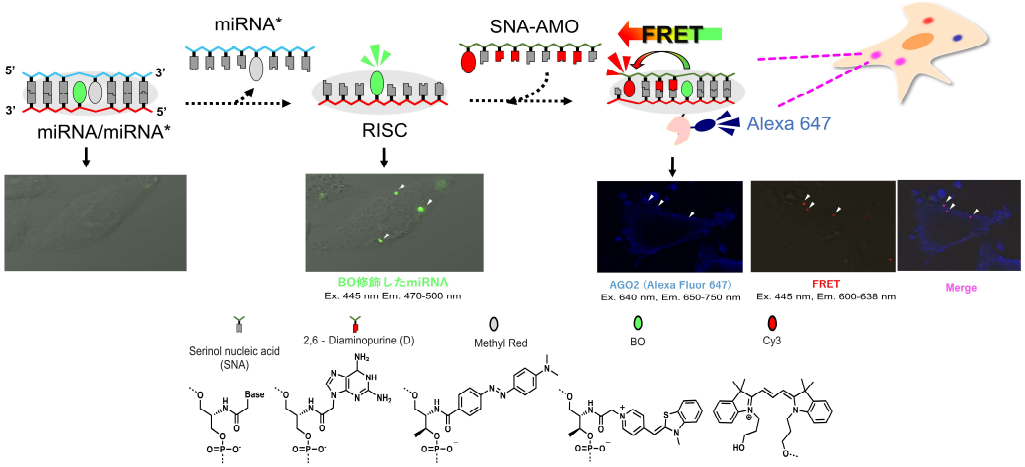


Fig. 1 SNA-AMO 作用機序可視化解析の設計と導入した色素

[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。

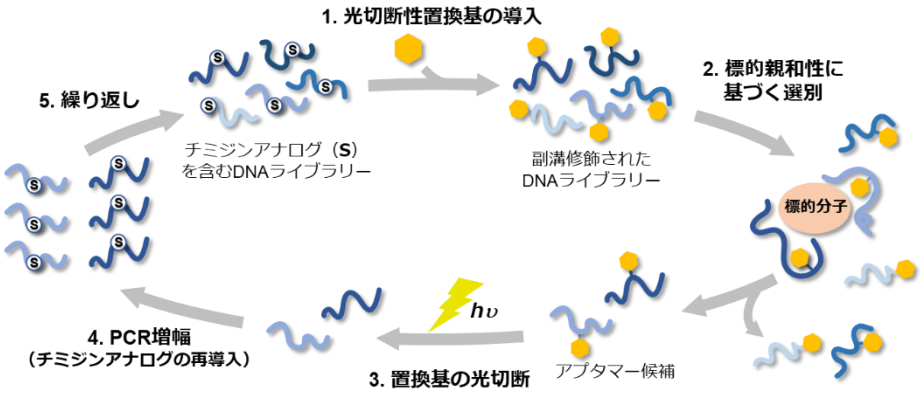


図 1. 置換基着脱可能な人工ヌクレオシドによる副溝修飾アプタマー探索法の設計概念

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。

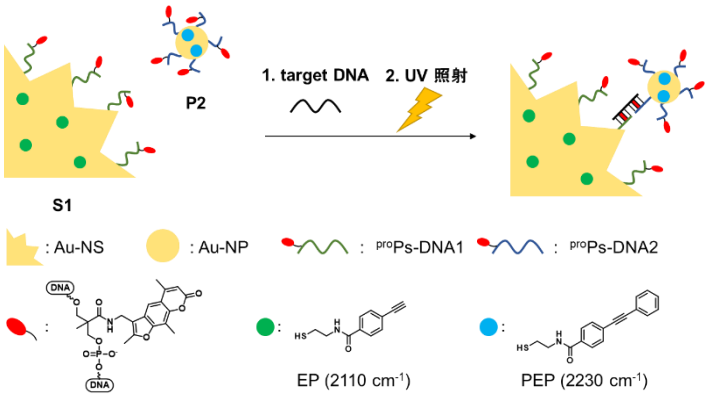


Fig 1. Procedure for detecting target DNA using S1 and P2.

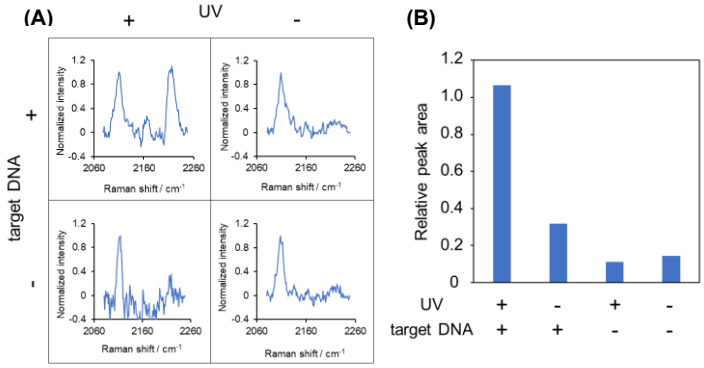


Fig 2. (A) Raman spectra of ratiometric SERS assay with different conditions. (B) Relative peak area of PEP in the different conditions.

(1) G. Maltzahn, *et al.*, *Cancer Res*, **2009**, *69,* 3892–3900.
(2) A. Kobori, *et al.*, *Chemistry Letters.*, **2009**, *38,* 272–273.

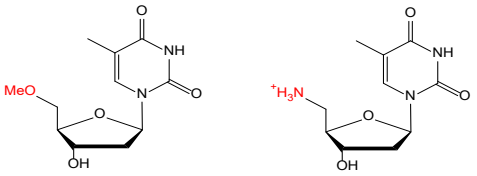
5’-末端化学修飾 siRNA のサイレンシング効果

○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’

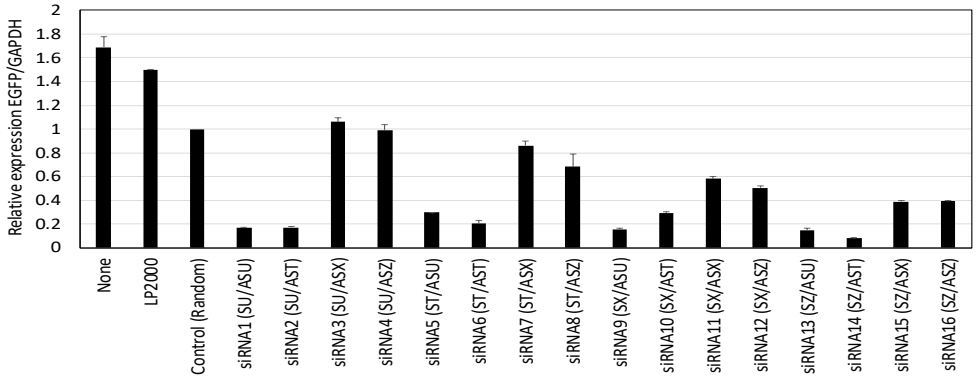


Figure 1. Silencing EGFP mRNA by 5’-Modified siRNA
[siRNA] = 100 nM, transfected by Lipofectamine 2000 HeLa(5 x 10^4 cells /well, 10 % FCS/MEM), 5% CO_2, 37°C, 24h

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。

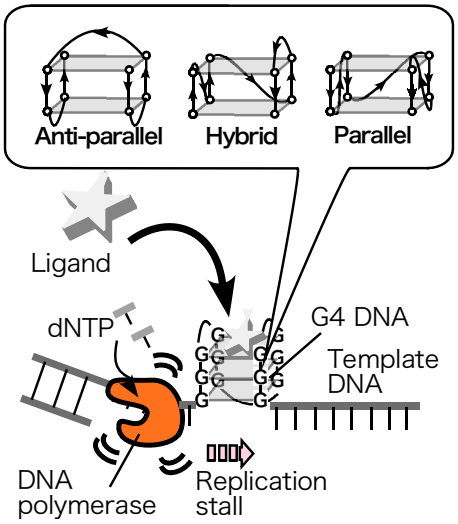


Figure 1 Schematic illustration of replication of G4 DNA having different topologies controlled by the binding of a G4 ligand.

[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)。

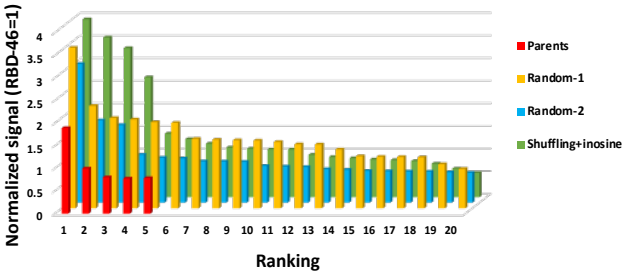


Fig.1 Binding ability of aptamer candidates against RBD. Dot intensity of RBD immobilized region was calculated using ImageJ and normalized as "the dot intensity of RBD-46 = 1". Ranking indicates that the sequences are ranked in order of the intensity of the normalized signal.

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。

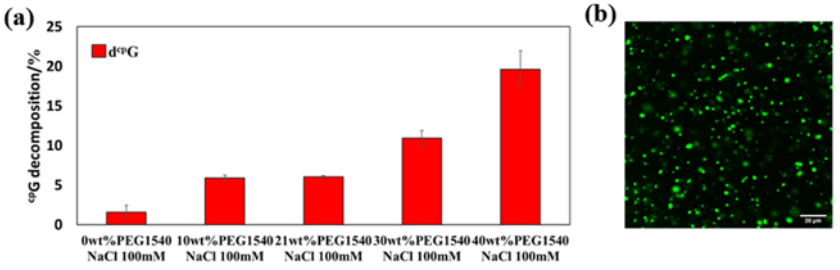


Fig. 1 (a) ^{cp}G decomposition percentages of pyrene-modified oligonucleotides (b) Flourescence images of liquid crystalline Ψ-DNA with intercalated SYBR Green I (scale bar 20 μm)

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**)。

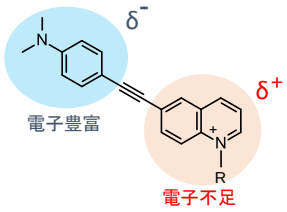


Figure 1. 新規なキノリニウム型蛍光色素の基本構造.

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。

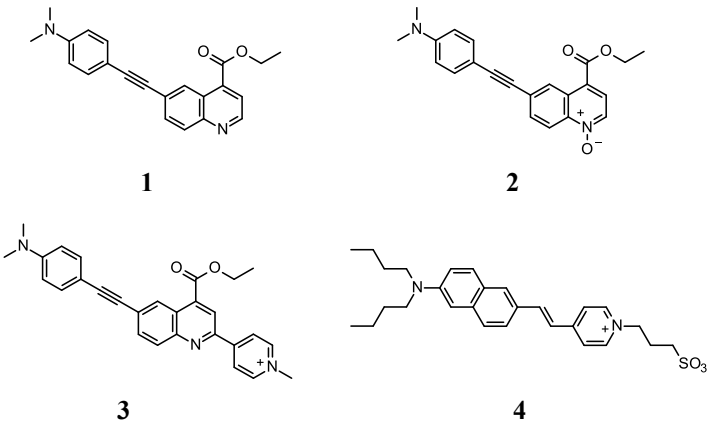


Figure 2. 各化合物の構造.

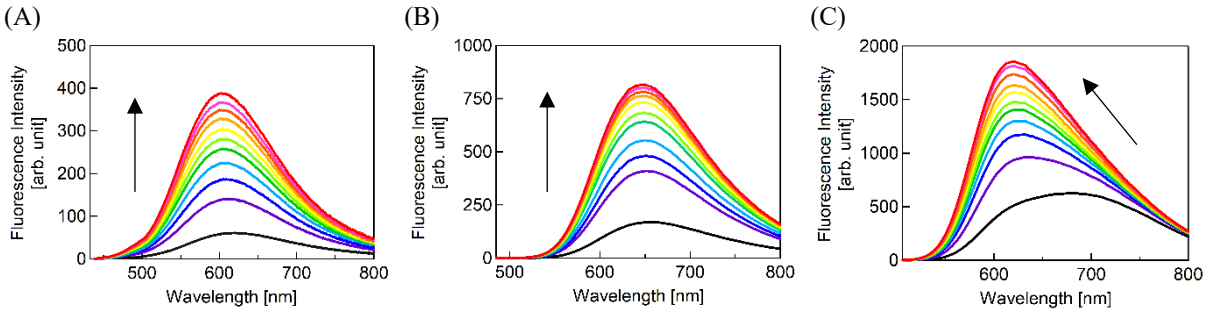


Figure 3. 各色素の 1 wt% SDS 水溶液に 10 wt% Na_2HPO_4 aq.を添加した時の蛍光発光スペクトル変化. (A) 化合物 **2**, λ_{ex} 423 nm; (B) 化合物 **3**, λ_{ex} 475 nm; (C) 化合物 **4**, λ_{ex} 496 nm. いずれも色素濃度は 10 μM, Na_2HPO_4 濃度は 0.5 wt%→3.3 wt%, 室温で測定.

©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)。

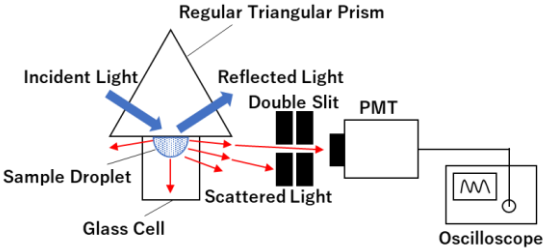


Fig.1 Measurement system for evanescent light excitation scattering.

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。

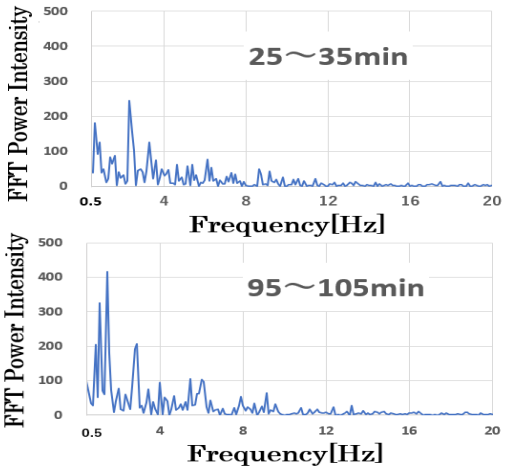


Fig.2 FFT Power spectra for HEWL solution with 4%(wt/v) NaCl.

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。

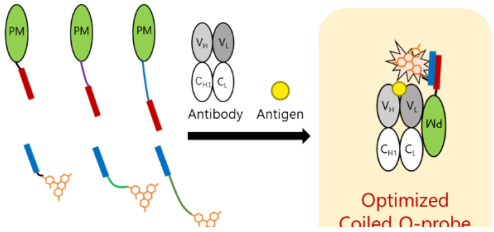


Fig 1. The strategy of rapid linker optimization

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。

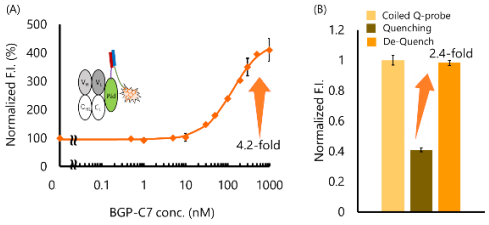


Fig. 2. (A) De-quenching of anti-BGP Fab by BGP-C7 epitope peptide (B) Quenching of anti-cortisol (CS) IgG and De-quenching by CS.

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）。

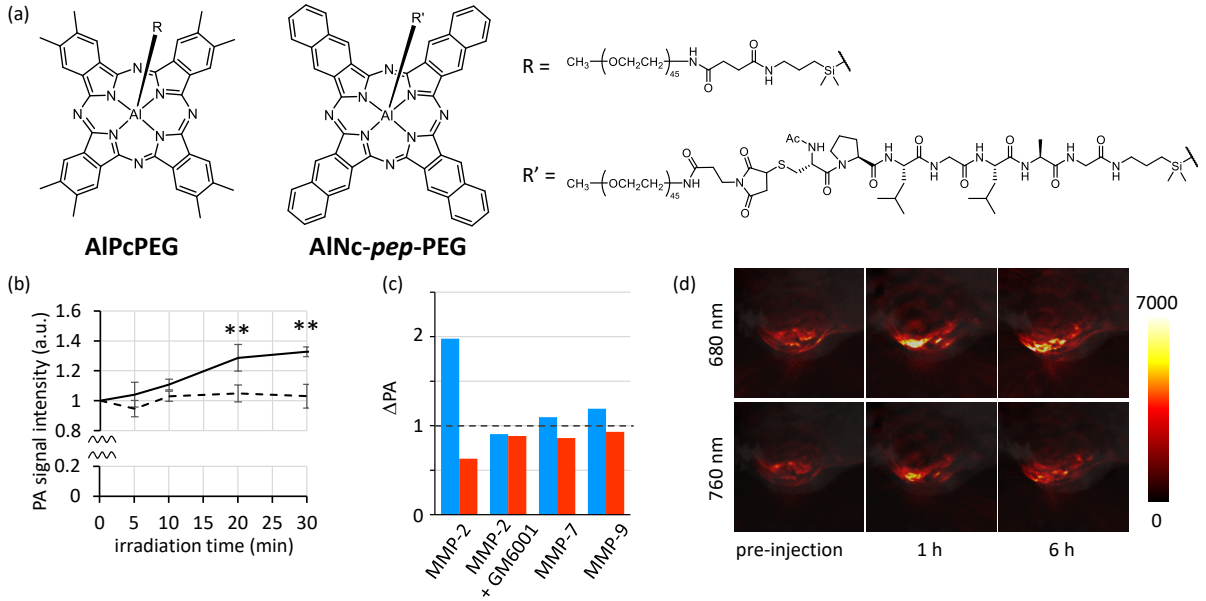


Figure 1. (a) Structure of **AlPcPEG** and **AlNc-*pep*-PEG**. (b) Time-dependent PA signal intensity change of **AlPcPEG** under photoirradiation at 730 nm (For PA signal generation: λ_{ex} = 680 nm). Vesicles (solid) or aggregates (dashed) of **AlPcPEG**. (c) PA signal intensity increment (ΔPA) of **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).

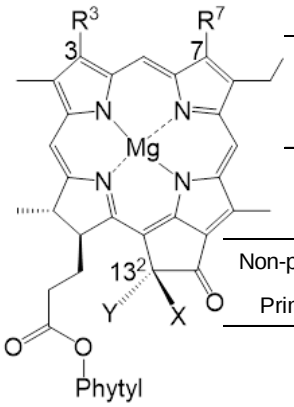
酸素発生型光合成生物のクロロフィル *b* の構造変換反応特性

○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。

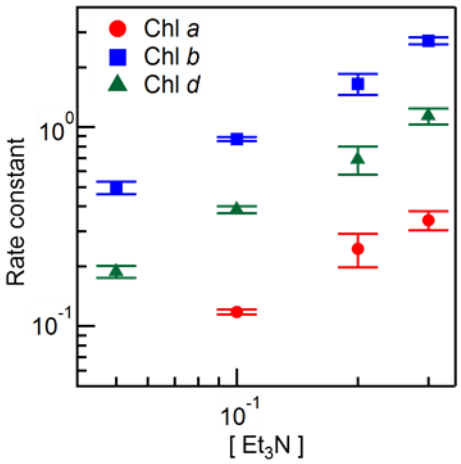


Fig. 2. The epimerization rate constants of three Chl pigments.

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）．

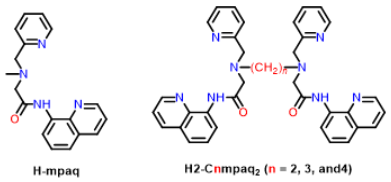


Chart 1. Structure of the ligands

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）．

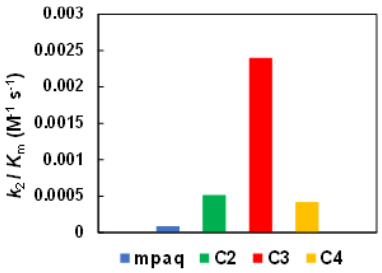


Figure 1. Second order rates for the reaction with hydrogen peroxide.

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。

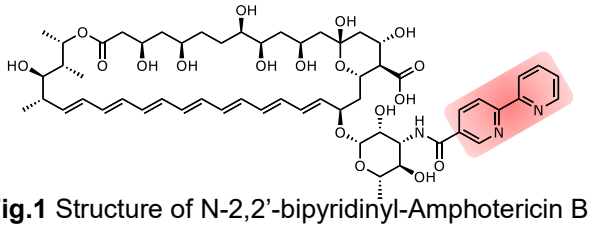


Fig.1 Structure of N-2,2'-bipyridinyl-Amphotericin B (bpy-AmB).

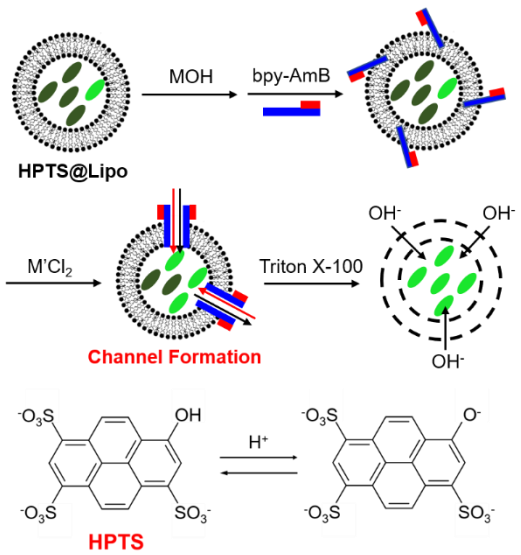


Fig.2 Schematic representation of the HPTS assay.

1) T. Koshiyama, Y. Inoue, S. Asada, K. Kawahara, S. Ide, K. Yasuhara, M. Ohba, *Chem.Comun*., **57**, 2895-2898 (2021).

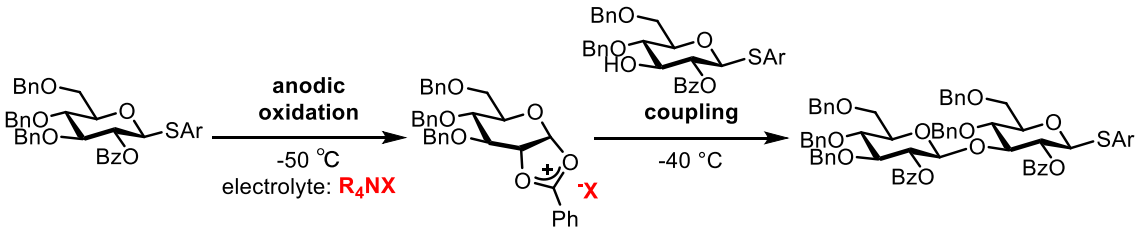
ジオキサレニウムイオン中間体を経由する電解グリコシル化反応における支持電解質の効果

○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。

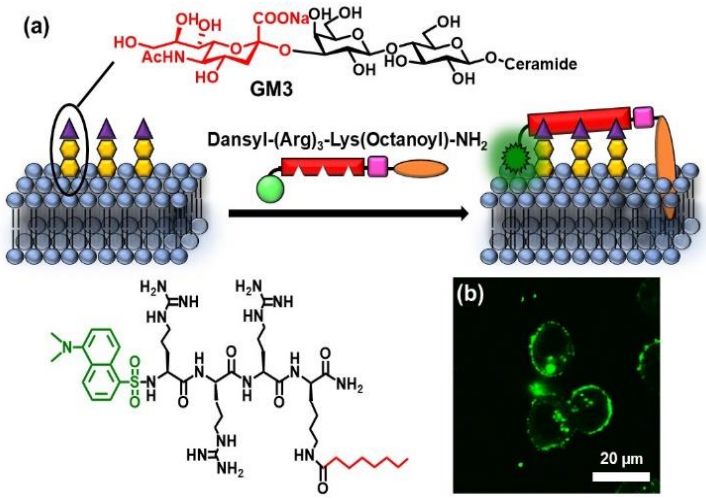


Fig 1. (a) Dansyl-$(Arg)_3$-Lys(Octanoyl)-NH_2 によるガングリオシドの蛍光イメージング (b) 20 μM Dansyl-$(Arg)_3$-Lys(Octanoyl)-NH_2 を添加した HepG2 細胞の CLSM 像 (Ex: 400 nm, Em: 524 nm)

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。

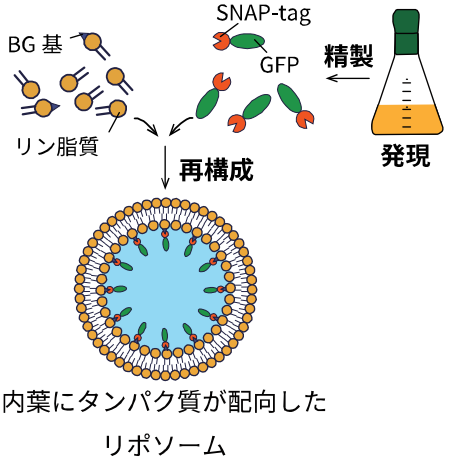


Fig. 1 Schematic illustration of the creation of the liposome with a regulated protein orientation.

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)。

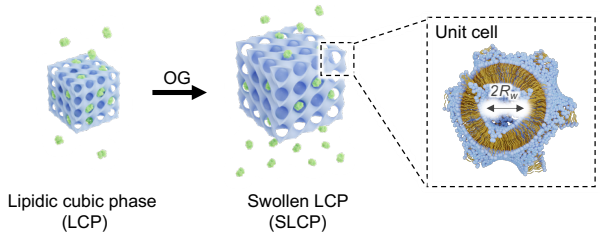


Fig. 1 Schematic illustration of this study

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。

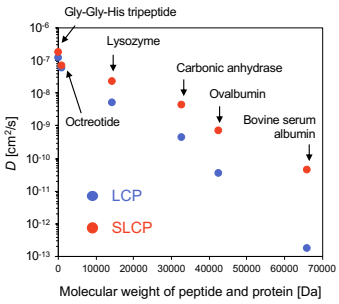


Fig. 2 Relation between D and molecular weight of peptides and proteins

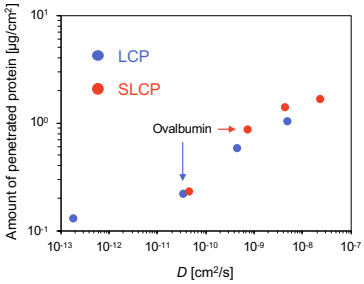


Fig. 3 Relation between skin penetration and D

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。

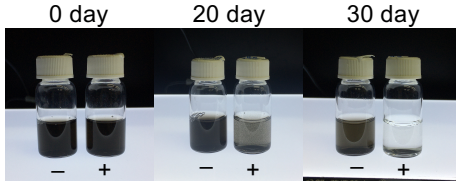


Fig. 1. Photographs of samples at different incubation times.

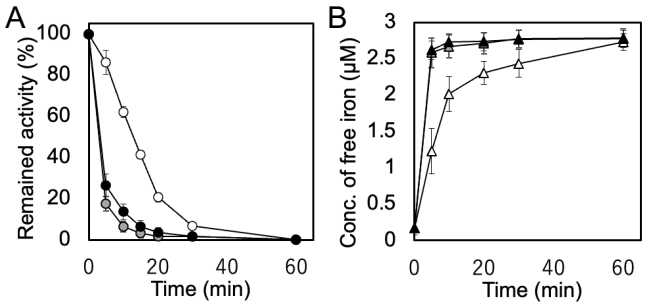


Fig. 2. Time course of enzyme activity of mt2DyP during incubation with CNTs. (B) Time course of free iron concentration in samples during incubation. The color of the marker indicates the concentration of H_2O_2: 1 mM (white), 10 mM (gray), 100 mM (black).

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

Oral

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Miki Imanishi (Kyoto Univ.)

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

[3A-01] Identification of degraders for epigenetic enzymes

*Yukihiro Itoh[1,2], Tetsuya Iida[1,2], Jiranan Chotitumnavee[1,2], Yukari Takahashi[2], Yasunobu Yamashita[1], Takashi Kurohara[1], Yuka Miyake[1], Makoto Oba[2], Takayoshi Suzuki[1,2] (1. SANKEN, Osaka University, 2. Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine)

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

[3A-02] Coordination chemogenetics for direct activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue

*Kento Ojima[1], Wataru Kakegawa[2], Masayuki Ito[2], Michisuke Yuzaki[2], Itaru Hamachi[1,3], Shigeki Kiyonaka[4] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. School of Medicine, Keio University, 3. ERATO, JST, 4. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

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

[3A-03] Induction of Programmed Cell Death in Cancer Cells by Cyclometalated Iridium(III) Complex-Peptide Hybrids and its Mechanistic Study

*Kenta Yokoi[1], Chandrasekar Balachandran[1,2], Jebiti Haribabu[1], Arisa Koyamada[1], Masakazu Umezawa[3], Koji Tsuchiya[3], Shin Aoki[1,2,3] (1. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2. Research Institute for Biomedical Sciences (RIBS), Tokyo University of Science, 3. Research Institute for Science and Technology (RIST), Tokyo University of Science)

エピジェネティクス関連酵素に対する分解誘導薬の創製

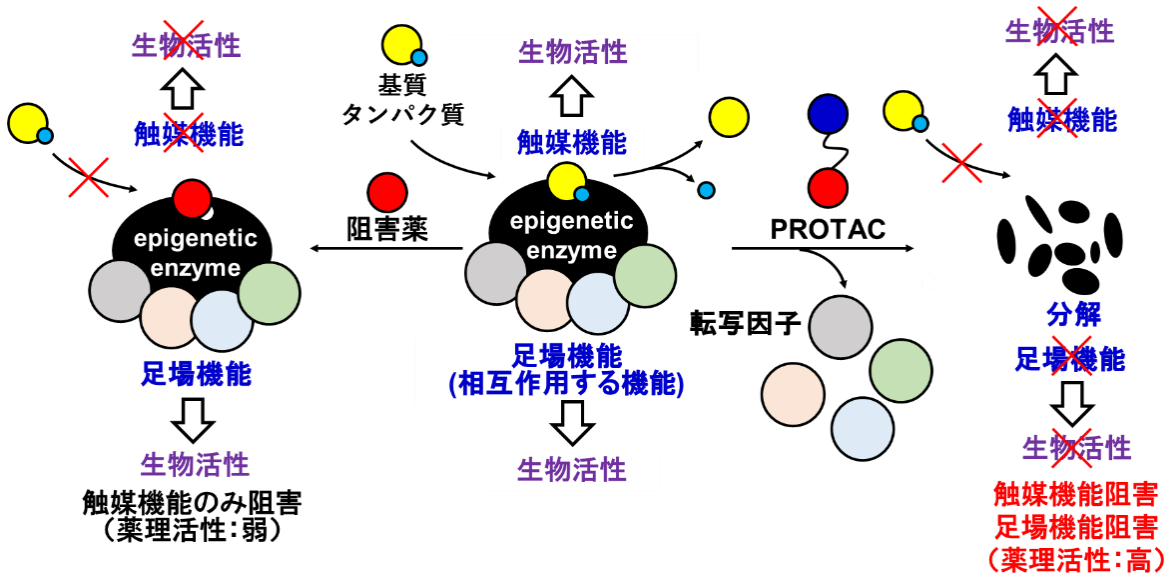
○伊藤幸裕[1,2]，飯田哲也[1,2]，Jiranan Chotitumnavee[1,2]，高橋ゆかり[2]，山下泰信[1]，黒原崇[1]，三宅由花[1]，大庭誠[2]，鈴木孝禎[1,2]（[1]阪大産研、[2]京都府立医大院医）

Identification of degraders for epigenetic enzymes ([1]SANKEN, Osaka University, [2]Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine)

ITOH, Yukihiro[1,2]; IIDA, Tetsuya[1,2]; CHOTITUMNAVEE Jiranan[1,2]; TAKAHASHI, Yukari[2]; YAMASHI, Yasunobu[2]; KUROHARA, Takashi[1]; MIYAKE, Yuka[1]; OBA, Makoto[2]; SUZUKI, Takayoshi[1,2]

ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）やヒストン脱メチル化酵素（KDM）は、エピジェネティクスを制御する重要な酵素として知られており、様々な遺伝子の発現を制御している。これらの酵素は、タンパク質リシン残基における翻訳後修飾を制御する触媒機能に加え、他の転写因子であるタンパク質と複合体を形成する足場機能を有しており、エピジェネティクスを多角的に制御している。また、エピジェネティクス関連酵素の多くは、それぞれ種々のがん細胞で過剰発現しており、その増殖に関与すると考えられていることから、創薬標的として興味深い。したがって、これらの酵素に対する阻害薬創製が盛んに行われてきた。しかし、従来の阻害薬は、酵素の活性部位に作用するため、触媒機能のみを阻害し、足場機能を阻害できない。このように、酵素の機能を完全に阻害できないため、従来の阻害薬では十分な薬理活性を示さない場合がある。以上の背景から、我々は、近年盛んに研究されているタンパク質分解誘導薬（PROTAC）であれば[1]、触媒機能のみならず、足場機能も阻害でき、従来の阻害薬よりも高い薬理活性を示すことができると期待した。本研究では、特に、急性 T 細胞性白血病に関与するとされる HDAC8 と前立腺がんに関与するとされる KDM5C に着目し、HDAC8 分解誘導薬および KDM5C 分解誘導薬の創製を試みた。

独自に見出した HADC8 選択的阻害薬[2]ならびに KDM5C 選択的阻害薬[3]を基に、HDAC8 分解誘導薬および KDM5C 分解誘導薬の創製を試みた。その結果、HDAC8 分解誘導薬[4]および KDM5C 分解誘導薬[5]は従来の HDAC8 阻害薬および KDM5C 阻害薬に比べて、高い抗がん作用を示した。



【References】1) Y. Itoh, *Chem. Rec.* **2018**, *18*, 1681; 2) T. Suzuki, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9562; 3) Y. Miyake, *et al.*, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 5383. 4) J. Chotitumnavee, *et al.*, Manuscript in preparation; 5) T. Iida, *et al.*, *ChemMedChem* **2021**, *16*, 1609.

©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

記憶メカニズムの解明に向けた配位ケモジェネティクスによる代謝型グルタミン酸受容体の直接活性化

○小島憲人[1]・掛川渉[2]・伊藤政之[2]・柚崎通介[2]・浜地格[1,3]・清中茂樹[4]（[1]京大院工、[2]慶応医、[3]JST ERATO、[4]名大院工）

Coordination chemogenetics for direct activation of GPCR-type glutamate receptors in brain tissue

(Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], School of Medicine, Keio University[2], ERATO JST[3], Graduate School of Engineering, Nagoya University[4]) OJIMA Kento[1]; KAKEGAWA Wataru[2]; ITO Masayuki[2]; YUZAKI Michisuke[2]; HAMACHI Itaru[1,3]; KIYONAKA Shigeki[4]

代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)は、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸をリガンドとするGタンパク質共役型受容体(GPCR)であり、配列相同性などから8つのサブタイプに分類される。その中でもmGlu1は小脳や視床、海馬など脳内に広く分布し、記憶や学習といった高次脳機能を司っている。また、パーキンソン病など様々な神経疾患との関与も明らかとなっており、mGlu1の詳細な機能解析が望まれる。しかし、mGluRのサブタイプ間の相同性の高さから、mGlu1を選択的に活性化可能なリガンドは存在せずmGlu1の生理・病理機能解明の障壁となっている。当研究室では、配位化学と遺伝子工学を組み合わせた人為的な受容体活性化法である「配位ケモジェネティクス」を開発した。本手法では、mGlu1のリガンド結合ドメイン近傍に配位性アミノ酸の変異導入を施すことで本来の受容体機能を保ったままPd(bpy)錯体の処置によってHEK293細胞に発現させたmGlu1の活性化に成功している。

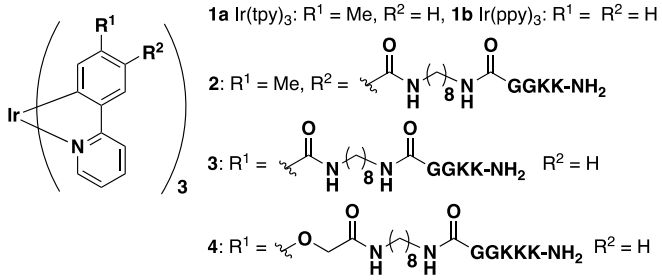
本発表では、mGlu1の機能解明に向けて「配位ケモジェネティクス」の動物組織への適用拡大を目指した。従来用いていたPd(bpy)錯体を神経様細胞(PC12細胞)および初代培養神経細胞に処置すると、一定濃度以上では細胞増殖阻害・神経細胞の異常な細胞内シグナルが見られ動物組織への適用に際してPd錯体の毒性の軽減が必要であることがわかった。その分子機構として核酸への結合が考えられた。そこで配位子であるbpyの誘導化を行い、親水性を向上させ細胞膜透過性を軽減したPd(bpy)錯体の作成を行なった。その結果、bpyにスルホン酸を1つ導入したPd(sulfo-bpy)錯体でmGlu1への活性は保ったまま細胞増殖阻害および神経細胞毒性を軽減することに成功した。次にCRISPR-Cas9システムによりmGlu1に対して該当する配位性アミノ酸をノックインしたマウスを作成した。このノックインマウスにおいては変異導入によるフェノタイプの異常は見られずmGlu1の機能が保たれていることがわかった。得られたマウスに対してPd(sulfo-bpy)錯体を急性小脳スライスに処置することで運動記憶の基盤として知られるchemical LTD(長期抑圧)の惹起に成功した。

シクロメタレート型イリジウム錯体—カチオン性ペプチドハイブリッドによるがん細胞のプログラム細胞死誘導と分子メカニズム解明

○横井健汰[1]・Balachandran Chandrasekar[1,2]・Haribabu Jebiti[1]・小山田有沙[1]・梅澤雅和[3]・土屋好司[3]・青木伸[1,2,3]（[1]東京理大薬、[2]東京理大生命医科学研究所、[3]東京理大総合研究院）

Induction of Programmed Cell Death in Cancer Cells by Cyclometalated Iridium(III) Complex-Peptide Hybrids and its Mechanistic Study (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science,[1] Research Institute for Biomedical Sciences (RIBS), Tokyo University of Science,[2] Research Institute for Science and Technology (RIST), Tokyo University of Science[3]) YOKOI, Kenta[1]; BALACHANDRAN, Chandrasekar,[1,2]; HARIBABU, Jebiti[1]; KOYAMADA, Arisa[1]; UMEZAWA, Masakazu[2]; TSUCHIYA, Koji[2]; AOKI, Shin[1,2,3]

シクロメタレート型イリジウム(Ir)錯体は高い燐光発光効率と長い発光寿命を有し、優れた発光材料として有機 EL 素子等に応用されている。また、その優れた発光特性を利用した、バイオイメージングプローブなどの生物学的応用が注目されている。当研究室では、Ir 錯体を基盤とするがん細胞選択的な抗がん剤の開発を行っており、*fac*-Ir(tpy)$_3$ (tpy: 2-(4'-tolylpyridine)) **1a** の 5'位または *fac*-Ir(ppy)$_3$ (tpy: 2-phenylpyridine) **1b** の 4'位にカチオン性ペプチド鎖(KKGG, K:リシン、G:グリシン)を導入した両親媒性のハイブリッド錯体(IPHs)**2–4** がヒト白血病性がん細胞（Jurkat 細胞）の細胞死を誘導し(EC_{50} = 1.5–7.4 μM)、死細胞を発光により検出できること、細胞死誘導メカニズムの解析により、プログラム細胞死の一つであるパラトーシスを誘導することを見出した。[1-3] また、ペプチド鎖の導入数と細胞死誘導活性に正の相関があることも報告した。[4] パラトーシスはミトコンドリア内のカルシウムイオン(Ca^{2+})濃度の上昇とそれに伴う細胞質の空胞化が特徴として報告されている。IPHs によるパラトーシスについて検討したところ、細胞内 Ca^{2+}の貯蔵庫である小胞体(ER)からミトコンドリアへの直接的な Ca^{2+}輸送を誘導することが示唆された。[3,5] これらの結果について報告する予定である。



Scheme. The structures of Ir complexes and their peptide hybrids **1–4**.

References

1) Hisamatsu, Y.; Suzuki, N.; Masum, A.-A.; Shibuya, A.; Abe, R.; Sato, A.; Tanuma, S.; Aoki, S. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 507–523.

2) Yokoi, K.; Hisamatsu, Y.; Naito, K.; Aoki, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 5295–5309.

3) Yokoi, K.; Balachandran, C.; Umezawa, M.; Tsuchiya, K.; Mitrić, A.; Aoki S. *ACS Omega*, **2020**, 5, 6983–7001.

4) Haribabu, J.; Tamura, Y.; Yokoi, K.; Balachandran, C.; Umezawa, M.; Tsuchiya, K.; Yamada, Y.; Karvembu, R.; Aoki, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2021**, 1796–1814.

5) Balachandran, C.; Yokoi, K.; Naito, K.; Haribabu, J.; Umezawa, M.; Tsuchiya, K.; Yoshihara, T.; Tobita, S.; Aoki, S. *Submitted for publication.*

Oral

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

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Shigeki Kiyonaka (Nagoya Univ.)

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

[3A-04] Construction of Tumor Tissue Models Using Functionalized Peptide Hydrogel Materials for Anticancer Drug Test

*Hiroshi Tsutsumi[1], Yea Jyh Chia[1], Takayuki Miki[1], Hisakazu Mihara[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

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

[3A-05] Improvement of Neutralization Activity for SARS-CoV-2 and Variants of Concerns by Affinity Maturation of Monobody.

*Taishi Kondo[1], Kazuhiro Matsuoka[2], Tomoshige Fujino[1], Shun Umemoto[1], Gosuke Hayashi[1], Yasumasa Iwatani[2,3], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Naoya University, 2. Department of Infectious Diseases and Immunology, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, 3. Division of Basic Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

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

[3A-06] The development of the artificial insulin receptors that have the ability of self-assembly on Au surface.

*Yusuke Murai Murai[1], Hiroya Sato[2], Eiji Arita[2], Takeshi Ikeda[1], Takenori Isida[1], Ryuichi Hirota[1], Akio Kuroda[1], Hisakage Funabashi[1] (1. Hiroshima University, 2. Terumo corporation)

機能性ペプチドゲルを用いた腫瘍組織モデルの構築と抗がん剤試験

○堤　浩・Chia Jyh Yea・三木卓幸・三原久和（東工大生命理工）

Construction of Tumor Tissue Models Using Functionalized Peptide Hydrogel Materials for Anticancer Drug Tests (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) Hiroshi Tsutsumi; Chia Jyh Yea, Takayuki Miki, Hisakazu Mihara

マイクロプレート上で培養したがん細胞は、抗がん剤を簡便かつハイスループットにスクリーニングする上で有用である。一方で、生体内のがん細胞は薬剤耐性を示し、スクリーニングにより見出された候補薬物の多くが効果を示さないことも指摘されている。この一因として、培養環境の違いが挙げられている。腫瘍組織中において、がん細胞は非がん細胞や間質組織などとともに三次元構造を構成し、低酸素・低栄養などの過酷で腫瘍に特徴的な微小環境で増殖している。そのため、マイクロプレート上での二次元的な培養法は、がん細胞が本来もっている特性を再現できないと考えられる。

当研究室では、水中でナノファイバー構造に自己集合してヒドロゲルを形成する設計ペプチド$(FFiK)_2$を開発し、ヒドロゲルを足場材料とした細胞の三次元培養を行っている[1]。本研究では、$(FFiK)_2$に細胞の機能を制御する生理活性配列を導入することにより高機能性の足場材料を創製するとともに、機能性ペプチドゲルを足場としてがん細胞を三次元培養することで腫瘍組織モデルを構築し、抗がん剤試験への応用について検討した。

生理活性配列として、フィブロネクチン由来の細胞接着促進配列である RGDS と PHSRN、およびラミニン由来でがん細胞の接着・増殖・遊走などを誘導する配列である AG73 (RKRLQVQLSIRT)と C16 (KAFDITYVRLKF)を選択し、Fmoc 固相法により合成した。3 残基の Gly リンカーを伸長した後、N 末端にブロモアセチル基を導入し、$(FFiK)_2$ 前駆体と固相担体上で反応させることにより、生理活性配列を導入した$(FFiK)_2$誘導体（図 1）を合成した。

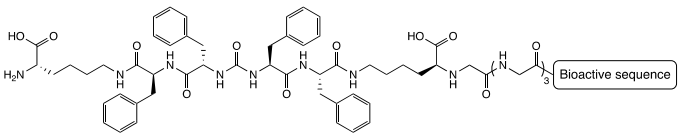


図 1. 生理活性配列を導入した$(FFiK)_2$誘導体の構造

次に、ナノファイバー上への生理活性配列の提示を透過型電子顕微鏡(TEM)観察により評価した。ビオチン標識した生理活性配列導入$(FFiK)_2$と$(FFiK)_2$を混合して共集合化させ、金ナノ粒子標識ストレプトアビジンで生理活性配列の可視化を行った（図 2）。その結果、ナノファイバーに沿って金ナノ粒子が観察され、生理活性配列が提示されていることが確認された。4 残基の短い RGDS だけでなく、12 残基の AG73 でも、共集合によりナノファイバー上に提示できることがわかった。

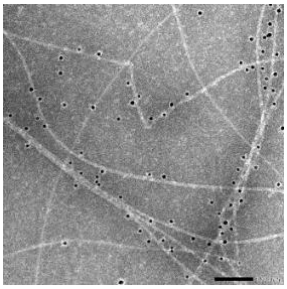


図 2. ビオチン標識した AG73 を提示したペプチドナノファイバーの TEM 画像

次に、sfGFP を安定発現する MCF7（乳がん）細胞株を樹立し、生理活性配列を提示した$(FFiK)_2$ヒドロゲル内に包埋して三次元培養を行った。いずれのヒドロゲルにおいても MCF7 が増殖し、三次元培養可能であることがわかった。$(FFiK)_2$-RGDS や$(FFiK)_2$-PHSRN ヒドロゲル中では、MCF7 はスフェロイドを形成しながら増殖した。一方、$(FFiK)_2$-AG73 ヒドロゲル中では、MCF7 はスフェロイドを形成せず、ゲル内を遊走するように広がって増殖した。これらの結果から、用いる生理活性配列を変えることにより、三次元培養環境で細胞の挙動を制御可能であることがわかった。

最後に、$(FFiK)_2$-RGDS ヒドロゲル中で培養した MCF7（スフェロイド）と$(FFiK)_2$-AG73 ヒドロゲル中で培養した MCF7（遊走）に対して、抗がん剤の 1 つであるドキソルビシン(DOX)を投与して殺細胞活性（IC_{50}）を評価した。比較としてマイクロプレート上で培養した MCF7 を用いた。MCF7（スフェロイド）は MCF7（プレート）より 78 倍高い IC_{50} 値を示し、スフェロイド形成により薬剤耐性が誘導されることがわかった。また、MCF7（遊走）の IC_{50} 値は MCF7（スフェロイド）の 1/5 以下であり、遊走状態の MCF7 が DOX に対して感受性であることがわかった。

1)　H. Tsutsumi, K. Tanaka, J. Y. Chia, H. Mihara, *Pept. Sci.*, e24214 (2020).

©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 に対する Monobody の親和性成熟による従来株及び変異株に対する中和活性の向上

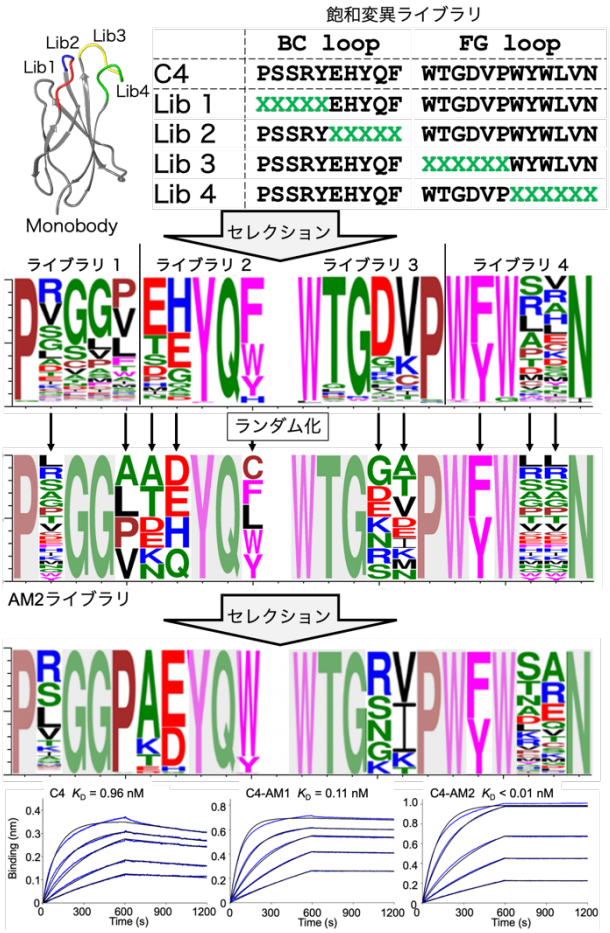
○近藤太志[1]・松岡和弘[2]・藤野公茂[1]・梅本駿[1]・林剛介[1]・岩谷靖雅[2,3]・村上裕[1,4]（[1]名大院工、[2]名医セ、[3]名大院医、[4]名大ナノライフ）

Improvement of Neutralization Activity for SARS-CoV-2 and Variants of Concerns by Affinity Maturation of Monobody. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Department of Infectious Diseases and Immunology, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center[2], Division of Basic Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University[3], Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University[4]) KONDO, Taishi[1]; MATSUOKA, Kazuhiro[2]; FUJINO, Tomoshige[1]; UMEMOTO, Shun[1]; HAYASHI, Gosuke[1]; IWATANI, Yasumasa[2,3]; MURAKAMI, Hiroshi[1,4]

COVID-19 を克服するために治療薬の開発が必要となっている。SARS-CoV-2 は表面に存在するスパイクタンパク質の Receptor Binding Domain (RBD) が細胞表面のアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) に結合し、感染する。そのため RBD に対する抗体は、感染や増殖を防ぐ中和抗体として治療薬への応用が期待できる。また、日本国内でも中和抗体が治療薬として特例承認されている。しかし、抗体は 150 kDa 以上の多量体であり、生産コストが高く大量生産に課題が残る。

昨年、我々は大腸菌で発現効率の良い 10 kDa の Monobody 骨格を用いて TRAP 提示法によって、RBD に対して高い親和性を持つ 7 種類の Monobody を 4 日間で選択することに成功した [1)]。また、4 種類のクローンが、RBD と ACE2 の結合を強く阻害した。

今回、RBD/ACE2 結合阻害活性を示したクローン C4 について細胞を用いて中和活性を測定した結果、SARS-CoV-2 の従来型に対して IC_{50} = 6.6 nM、Alpha 型 IC_{50} = 0.17 nM と強い中和活性を示した。一方で、免疫逃避株と言われる Beta 型、Gamma 型では、中和活性が測定不能レベルまで低下した。そこで、C4 に対して親和性成熟による中和活性の向上を試みた。C4 の BC、FG ループを分割しランダム化した 4 種類の飽和変異ライブラリを構築した。そのライブラリを用いて、TRAP 提示法によって RBD に対して人工抗体を選択し、次世代シーケンサによる配列解析を行った。各ライブラリで出現割合が最も高かった配列を用いた C4-AM1 では解離定数が約 9 倍に改善した。さらに、出現頻度上位のクローンにおける、アミノ酸の出現割合の情報から、結合に重要と考えられるアミノ酸を固定し、アミノ酸が収束しておらず最適化の余地が残る部分を再度ランダム化した変異ライブラリ (AM2 ライブラリ) を構築し親和性成熟を行った。2 回目の親和性成熟で得られた C4-AM2 は、B.1.1 型 IC_{50} = 46 pM、Alpha 型 IC_{50} = 77 pM、 Beta 型 IC_{50} = 540 pM、 Gamma 型 IC_{50} = 550 pM と従来株と変異株に対して中和活性を大幅に向上することに成功した。



1) Kondo, T., et al, Sci. Adv. 2020, 6 (42), eabd3916.

金表面への自己集積能を有する人工インスリンレセプターの開発

○村井優祐[1]・佐藤嘉哉[2]・有田栄次[2]・池田丈[1]・石田丈典[1]・廣田隆一[1]・黒田章夫[1]・舟橋久景[1]
（広島大学[1]、テルモ株式会社[2]）

The development of the artificial insulin receptors that have the ability of self-assembly on Au surface.

Yusuke Murai[1], Hiroya Sato[2], Arita Eiji[2], Takeshi Ikeda[1], Takenori Ishida[1], Ryuichi Hirota[1], Akio Kuroda[1], Hisakage Funabashi[1] (Hiroshima Univ.,[1] Terumo corp.[2])

糖尿病は、世界中で患者数が増え続けている疾患である。糖尿病の根底的な治療法は確立されておらず、特にⅠ型糖尿病では不足するインスリンを頻繁に自己注射で補う対症療法が主に行われている。インスリンの注射量は血糖値、食事量、運動量などから計算されるが、残存する血中インスリン濃度をこれらに加えることでより望ましい血糖コントロールが可能になると我々は考えている。しかし、インスリンを患者自身が測定する簡便な方法はまだ確立されていない。

当研究室では、インスリン受容体のインスリン結合ドメインであるαCT セグメントと L1 ドメインを、生物発光タンパク質（Nluc）および蛍光タンパク質（Ypet）と遺伝子工学的に融合したインスリン認識プローブタンパク質（NαLY）の開発に成功している[1)]。このタンパク質はインスリンを認識すると構造変化を起こし、Nluc – Ypet 間の距離が変化する。この変化に伴う生物発光共鳴エネルギー移動(BRET)効率の変化をセンシングシグナルとして検出する。しかしこの手法では、発光基質の添加、直後の観察など Point of Care Testing(POCT)にはやや不向きである。そこで本研究では、このプローブのインスリン結合ドメインを活用し、POCT のプラットフォームとして有望な、バイオチップや電気化学バイオセンサのセンシング部位として応用可能な人工インスリンレセプターの開発を目的とした。

本研究では、インスリン認識部位には、NαLY のインスリン認識部位を活用した。金表面への修飾を可能にするために、金への自己集積能が報告[2)]されている金結合ペプチド（GBP）の配列を 3 回繰り返したドメインを利用した[3)]。金への自己集積能を付加することで、バイオチップや電気化学バイオセンサで用いられている金表面への配向集積が可能になると期待される。これらの機能ドメインを遺伝子工学的に融合し、得られた新奇人工インスリンレセプターをそれぞれ 3GαL, αL3G と名付けた(図 1)。これらの人工レセプター金表面へ集積し、インスリン認識に伴う構造変化を検出することでインスリンの検出が可能であると考えられる(図 2)。

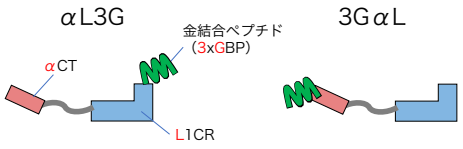


図 1. 人工インスリンレセプターのデザイン

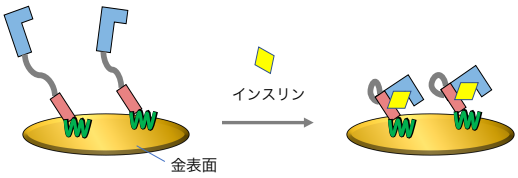


図 2. インスリン認識によるレセプターの構造変化

まず、本レセプターの金結合能を QCM-D を用いて評価した。コントロールとして GBP を有さない、インスリン認識部位のみをリンカーで連結したタンパク質（αL）を用いた。金センサ表面上にそれぞれのタンパク質溶液を流入し、生じた周波数シフトを指標に金結合能を評価した。GBP を持たないαL では、周波数シフトがほとんど観察されなかったのに対し、3GαL、αL3G では、それぞれ大きな周波数シフトが観察された。このことから、3GαL、αL3G は金表面への自己集積能を有することが示された。

次に、金表面でのインスリン認識能を評価するために、本人工レセプターを表面集積した金電極を作製した。この修飾電極のインスリンに対する電気化学的応答を、電気化学インピーダンス分光法(EIS)を用いて評価した。両人工レセプター修飾電極ともに、インスリンを測定溶液に添加した場合、インピーダンスの値はインスリン濃度に応じて増加した。人工レセプターがインスリンを認識し構造変化を起こした結果、界面電子移動を阻害したためと考えられる。このことから本人工レセプターは金表面へ自己集積しても構造変化を伴うインスリン認識能を維持していることが示唆された。

以上のことから、金表面への自己集積能を有する人工インスリンレセプターの開発に成功し、これを修飾した電極を用いることによってインスリンが検出可能であることが示された。

1) H. Shigeto, T. Ikeda, A. Kuroda, H. Funabashi *Anal. Chem.* 87, 5, 2764-2770(2015)
2) Brown, S. *Nat. Biotechnol.* 15 (3), 269–272(1997)
3) Urartu Ozgur Safak Seker et al. *Bioacromolecules*. 15, 7, 2369-2377(2014)

Oral

Fri. Sep 10, 2021 11:20 AM - 12:00 PM JST | Fri. Sep 10, 2021 2:20 AM - 3:00 AM UTC | Room A
Zoom

Peptides, Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Inaba (Tottori Univ.)

11:20 AM - 11:40 AM JST | 2:20 AM - 2:40 AM UTC

[3A-07] Crucial amino acid residues concerning the catalytic activity of the human super-catalytic antibody (H34 clone) degrading the immune checkpoint PD-1 molecule

*Taizo Uda[1], Testuro Minagawa[2], Hiroaki Taguchi[3], Emi Hifumi[4] (1. ISIT, 2. Graduate School of Engineering, Oita University, 3. Suzuka University of Medical Science, 4. Research Promotion Institute, Oita University)

11:40 AM - 12:00 PM JST | 2:40 AM - 3:00 AM UTC

[3A-08] Study on the production of super catalytic antibody against the conserved sequence of virus and the antiviral effect

*Emi Hifumi[1], Tamami Nonaka[1], Ayuka Tanaka[2], Haruna Tsuda[2], Hiroaki Taguchi[3], Taizo Uda[4] (1. Research Promotion Institute, Oita University, 2. Graduate School of Engineering, Oita University, 3. Suzuka University of Medical Science, 4. Institute of Systems, Information Technologies, and Nanotechnologies)

免疫チェックポイント PD-1 分子を分解するヒト型スーパー抗体酵素 (H34 clone)の触媒活性に関与する重要なアミノ酸残基

○宇田泰三[1,4]・皆川哲郎[2]・田口　博明[3]・一二三恵美[4]([1]九州先端研、[2]大分大院工、[3]鈴鹿医療大、[4]大分大全学研究推進機構)

Crucial amino acid residues concerning the catalytic activity of the human super-catalytic antibody (H34 clone) degrading the immune checkpoint PD-1 molecule (Institute of Systems, Information Technologies, and Nanotechnologies (ISIT)[1], Graduate School of Engineering, Oita University[2], Suzuka University of Medical Science[3], Research Promotion Institute, Oita University[4]) UDA, Tarizo[1,4]; MINAGAWA, Tetsuro[2]; TAGUCHI Hiroaki[3]; HIFUMI, Emi[4]

【緒言】免疫チェックポイント PD-1(T 細胞上に発現)は、1992 年に本庶らが発見したがん細胞の免疫逃避機構に関わる分子であり [1]、抗体医薬の新しいターゲットとして世界的に注目されている (Fig.1)。PD-1 に対する抗体は、がん細胞上に発現している PD-L1 による PD-1 への結合阻害を惹起し、幅広いスペクトルを持つ抗体医薬として有効な抗癌剤となっている。ただ、奏功率が 20-30%程度である事や、高額、さらには、予期しない副作用が生じる等、いくつかの課題もある事から、これらを克服出来るスーパー抗体酵素の開発に取り組んだ。H34 クローンは PD-1 に対する分解活性を示すヒト型スーパー抗体酵素で、当研究室のヒト軽鎖ライブラリーから見出した [2]。本研究では PD-1 の分解に関与する H34 クローンの重要なアミノ酸残基が特定できたので報告する。

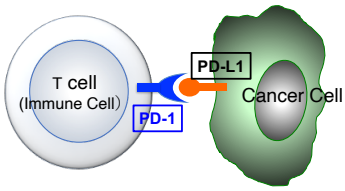


Fig. 1 T cells quit to attack the cancer cell when PD-L1 of cancer cells bind to PD-1.

【実験】PD-1を分解する抗体酵素のスクリーニングには合成FRET-PD1を用いた(18mer)。PD-1タンパク質の分解にはrecombinant PD-1(ENZO Life Sciences Inc. (aa 25–167))を用いて、SDS-PAGE(銀染色)で分解断片を確認した。変異体の作製には、KOD-Plus-Mutagenesis Kit(TOYOBO)を用い、野生型(wt)と同様に大腸菌BL21(DE3)pLysSで発現させた。H34可変領域の構造は分子モデリングソフトDiscovery Studio 3.5(BIOVIA)を使用した。

【結果と考察】H34 クローンはヒト kappa 型軽鎖の subgroup I（Kabat 分類）に属し、His が可変領域内に存在せず、酵素活性サイトとなる触媒三つ組み様残基(Asp-Ser-His)を持たないが、抗原分解活性を発揮するのが特徴である。一方で、超可変領域(CDR)-3 に Pro95 を変異導入すると、その活性はほぼ消失する [2]。そこで本研究では、分子モデリングに基づき、主として H34 の超可変領域(CDR)-3 を含むいくつかのアミノ酸残基に変異導入を行った。その結果、T97A 変異体では wt に比べて大幅な酵素活性の向上が見られた (Fig. 2)。逆に、R96A や T93A 等の変異体では酵素活性が大きく低減した。そこで、各変異体の免疫学的性質を ELISA により調べてみると、R96A では PD-1 に対する結合能がほぼ消失していた。これは、Arg96 が抗原認識に深く関与している事を意味している。一方で、分解活性が大幅に向上した T97A 変異体の PD-1 に対する親和性は wt に比べて 3 倍近く増加していた。さらに興味深い事に、抗原認識能(affinity constant)と抗原分解活性との間には良い相関がみられた。こうした一連の結果を総合すると、T97A は kcat の向上も然る事ながら、抗原認識能が高まった事が高い抗原分解活性を獲得できた一要因であると推定される。

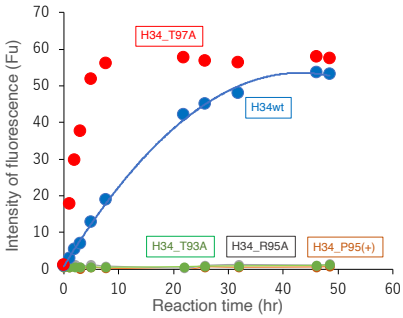


Fig. 2 Reaction profile for decomposition of FRET-PD1 substrate by several mutants of H34 clone.

1) Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, T. Honjo, *EMBO J.,*1992, 11, 3887–3895.

2) E. Hifumi, H. Taguchi, T. Nonaka, T. Harada, T. Uda, T. *RSC Chemical Biology,* **2**(13), 2021.

ウイルスの保存領域に対するスーパ抗体酵素の作製と抗ウイルス作用に関する研究

○一二三恵美[1]・野中玲実[2]・田中歩佳[2]・津田春菜[2]・田口　博明[3]・宇田泰三[1,4]
([1]大分大全学研究推進機構、[2]大分大院工、[3]鈴鹿医療大、[1,4]九州先端研）

Study on the production of super catalytic antibody against the conserved sequence of virus and the antiviral effect (Research Promotion Institute, Oita University [1], Graduate School of Engineering, Oita University[2], Suzuka University of Medical Science[3], Institute of Systems, Information Technologies, and Nanotechnologies (ISIT) [4]) HIFUMI, Emi [1,4]; NONAKA, Tamami[2]; TANAKA, Ayuka[2]; TSUDA, Haruna[2]; TAGUCHI Hiroaki[3]; UDA, Tarizo [1,4]

RNA ウイルスの変異は避けられない現象で、パンデミックの要因として危惧され続けてきた。昨年来の新型コロナウイルスの流行により、その驚異を実感させられている。ウイルスの変異はランダムに起こるけれども、生存に必須な部分に変異が入った粒子は淘汰されるため、現存するウイルスには保存領域が存在する。従って、この保存領域を標的として、当該タンパク質の機能を消失させることが出来れば、RNA ウイルスの感染予防策になり得る。

一方、我々は「Pro95 欠失による抗体軽鎖の酵素化」という新たな技術を見出した [1)]。本研究では、この技術を A 型インフルエンザウイルスのヘマグルチニン（HA）保存領域に対するモノクローナル抗体に応用し、興味ある結果を得たので報告する。

InfA15 mAb は、HA の HA_2 ドメインの保存領域である ^{16}GMVDGWYG^{23} をハプテンとして取得したモノクローナル抗体である [2)]。この領域は季節性の変異が入らないのは勿論のこと、亜型間でも保存されている領域である。完全抗体に対するキャラクタリゼーションでは、抗原ペプチドのみならず、H1, H3, H5 型の組み替え HA_2 タンパクや、H1N1 および H3N2 型ウイルス破砕液中の同タンパクに対する免疫学的反応性が確認されたものの、ウイルスに対する中和活性を検出することは出来なかった。加えて軽鎖（InfA15-L）には Asp1-Ser27a-His93 より成る典型的な触媒三ツ組残基の存在が示唆されたものの、軽鎖全長、ScFv、V_L-V_L などの各種組み替えタンパクにおいて、酵素活性を検出することは出来ず、中和活性も認められなかった。そこで、InfA15-L に対して上述の新しい酵素化手法を試みた。本クローンの場合、95 番目と 96 番目に連続して Pro が存在することから、欠のパターンを変えた 4 種類の変異体を作製したところ、Pro95 と Pro96 を欠失させた P95ΔP96Δに最も高い酵素活性が現れた。Plaque assay によりウイルスに対する感染抑制能を調べると、酵素活性との間に相関があり、P95ΔP96Δは H1N1 型ウイルスの MDCK 細胞への感染を約 30%の割合で阻害することが確認できた。これは、スーパー抗体酵素の「ウイルスの変異に対する新たなツールとしての可能性」を示唆している。また、免疫学的反応性の検討では、変異導入により抗原ペプチドに対する親和性が強くなる傾向が認められた。95・96 番目は CDR3 のループ部分に当たることから、Pro を欠失させることでループ構造に揺らぎが生じ、induced-fit が起こり易くなったのではないかと考えられた。

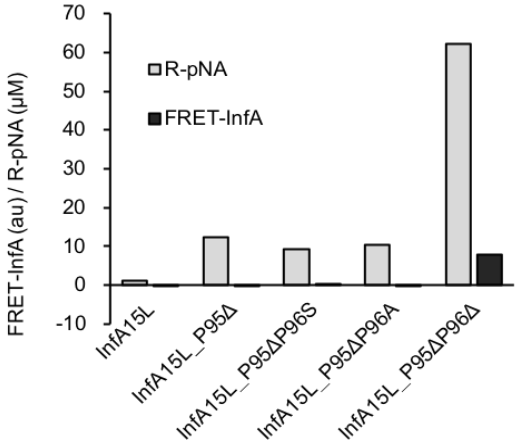


Fig. 1　Catalytic activities of InfA15-L and the mutants

1) Hifumi, E., Taguchi, H., Tsuda, H., Minagawa, T., Nonaka, T., Uda, T. *Science Advances*, **6**(13), eaay6441(2020).
2) Hifumi, E., Fujimoto, N., Ishida, K., Kawawaki, H., Uda, T., *J. Biosci. Bioeng.,***109**(6), 598-608(2010).

Oral

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

Nucleic acids

Chair: Tatsuya Nishimura (Aoyama Gakuin Univ.)

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

[3B-01] Development of DNA hybridization-responsive BRET system

*Fumiaki Takano[1] (1. Intelligent Molecules Lab,Kansai University)

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

[3B-02] Real-time tracking of G4 DNA formation by using DNA structure selective dual-color fluorescence “switch-on” probe

*Takashi Sakamoto[1], Zehui Yu[2], Yuto Otani[1] (1. Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University, 2. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

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

[3B-03] Application of Chimeric Artificial Nucleic Acids for Efficient Suppression of Functional RNA for Controlling of Cellular Functions

Masaki Nishijima[1], Masahito Inagaki[3], Nozomu Ishiwata[1], Toshiyuki Sato[1], Akira Yano[1], Hironori Hayashi[2], Yasuyuki Araki[1], Eiichi Kodama[2], *Takehiko WADA[1] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. IRDeS, Tohoku University, 3. Graduate School of Science, Nagoya University)

DNA ハイブリダイゼーション依存型 BRET システムの開発

○高野　史章・乾　俊輝・葛谷　明紀（関西大学化学生命工）

Development of DNA hybridization-responsive BRET system (Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai Univ.)　TAKANO Fumiaki; INUI Toshiki; KUZUYA Akinori

蛍光色素で標識を行う顕微鏡観察法では，強い励起光の照射に伴う蛍光色素の退色や，細胞毒性が問題になる。そこで励起光の必要の無い発光タンパク質を用いることで，これらの問題を回避することができる。しかしながら，ホタルルシフェラーゼをはじめとする発光タンパク質の発光は，基質に依存して，その波長が固定されている。これらを生体発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を使って波長変調を行うためには，発光タンパク質と蛍光タンパク質を適切なリンカーを介して融合タンパクとすることが必須である [1]。また，効率的な発光，波長変調のためには，遺伝子組換え実験によるリンカーの配列，長さの最適化が必要となる。

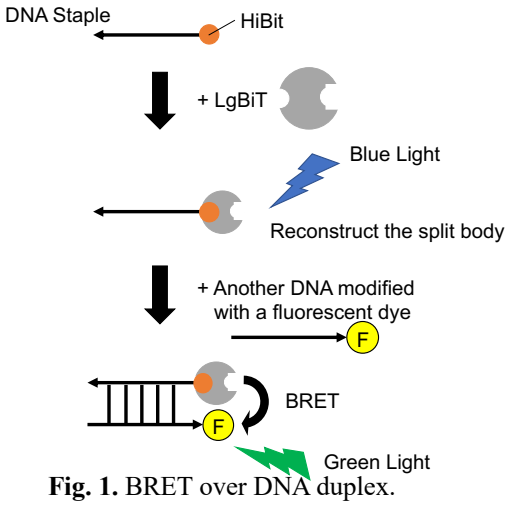


Fig. 1. BRET over DNA duplex.

本研究では，リンカーとして相補鎖な二本の DNA 鎖，蛍光タンパク質のかわりに DNA 鎖に結合した蛍光色素を活用することで，発光の色調を容易かつ自在に変化させることができる発光標識剤を開発した。発光タンパク質を断片化した split 体のうち，小断片側のペプチド鎖を化学合成 DNA と結合する [2]。大断片側を系中に加えることにより，発光タンパク質が DNA 鎖の末端で再構築される。これと相補な鎖にエネルギー移動のアクセプターとなる蛍光色素を結合しておき，DNA 鎖のハイブリダイゼーションにより，蛍光色素を発光タンパク質の近傍に局在化させることで，BRET を誘導した。

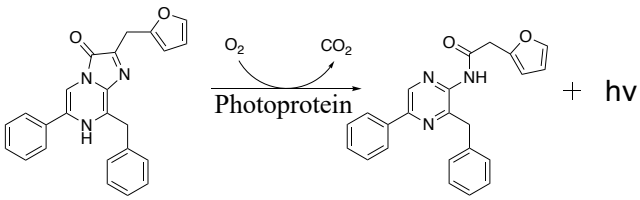


Fig. 2. Mechanism of bioluminescence from furimazine.

まずDNA自動合成機を用いて，5’末端にDibenzylcyclooctyne (DBCO) を修飾したDNAを合成した。このDBCO修飾DNA鎖に対してC末端をアジド化した小断片側のペプチド鎖を銅フリークリック反応で結合させることによりBRETのドナーとなるペプチド修飾DNAの合成を行った (Fig. 3)。相補鎖にはエネルギー移動のアクセプターとなるFAMを，市販のCPGを用いて3’末端に導入した。次に，2本のDNA鎖をハイブリダイゼーションし，蛍光色素を発光タンパク質の近傍に局在化させた。系中に大断片側である市販のLgBit溶液を加えて発光タンパク質を再構築した。15分後，発光基質となるFurimazineを加えて，BRETを誘導した。その後，マイクロプレートリーダーにより発光スペクトルを測定し，暗室で長時間露光撮影によって溶液の色を観察した。

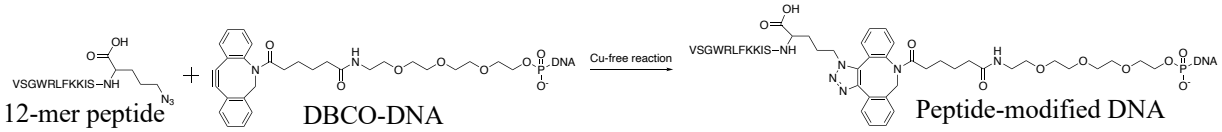


Fig. 3. Synthesis of Peptide-modified DNA.

1)　S. Sihuai, *et al., Int. J. Mol. Sci*, **2016**, *17*, 1704.
2)　A. S. Dixon, *et al., Anal. Chem.* **2016**, *11*, 400-408.

©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

DNA 構造に選択的な２色蛍光スイッチオンプローブを用いた４重鎖構造形成のリアルタイム追跡

○坂本隆[1,2]・于ゾウ慧[1]・大谷悠人[2]（[1]和歌山大システ工、[2]和歌山大院システ工）

Real-time tracking of G4 DNA formation by using DNA structure selective dual-color fluorescence “switch-on” probe (Faculty of Systems Engineering, Wakayama University[1], Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University[2]) SAKAMOTO, Takashi[1,2]; YU, Zehui[1]; OTANI, Yuto[2]

４重鎖（G4）DNA に代表される非標準的な核酸構造は、遺伝子発現の制御や疾患に関わることが指摘され、これらの生物学的意義や疾患との関連に注目が集まっている。また、G4 構造をとる RNA（G4 RNA）が細胞内に存在することも明らかとなり、G4 核酸の機能解明は生命科学研究の大きなターゲットの一つとなっている。G4 核酸構造は動的であり、かつ局所的に存在すると考えられる。そのため、これらの機能解明には、G4 核酸を生細胞内で直接イメージングできる蛍光分子プローブが重要な役割を果たすと期待されている。最近、我々は２重鎖 DNA（dsDNA）と G4 DNA、それぞれに結合したときに異なる波長の蛍光スイッチオン応答を示す、３脚型キノン－シアニン蛍光色素 $QCy(MeBT)_3$ の開発に成功した（図１）。本研究では、$QCy(MeBT)_3$ による dsDNA から G4 DNA への構造変化の追跡を実証するために、dsDNA と G4 DNA との構造のスイッチが可能なヘアピン型オリゴ DNA（DS/G4 hpODN）を用いたモデル実験（図２）を行った。

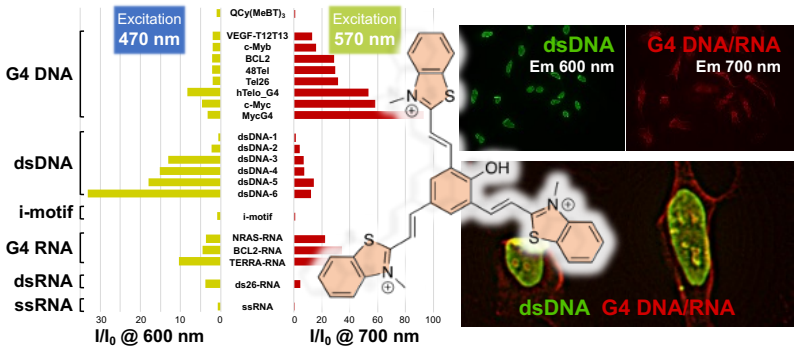


図１．$QCy(MeBT)_3$ の構造、核酸に対する蛍光応答、およびこれを用いた細胞内 G4 と dsDNA の同時色分け蛍光イメージ

図２a に示す通り、DS/G4 hpODN は K^+を含まない中性バッファー溶液中では AT リッチな２重鎖を形成するため、$QCy(MeBT)_3$ の 600 nm 蛍光（F_{600}）の増加が期待できるが、ここに K^+を添加すると G4 形成が誘導され、AT リッチな２重鎖が崩壊する。これにより F_{600} の減少と F_{700} の増加が同時に起こり、この構造変化の蛍光による追跡が期待できる。また、G4 形成後に G4 形成ドメインと相補的な ODN（cODN G4）を添加することで、G4 構造の崩壊と AT リッチ２重鎖の再形成が起こり、F_{600} の増加と F_{700} の減少が同時に起こると期待できる。実験の結果（図２b）、想定通りの蛍光強度変化が観測されたことから、$QCy(MeBT)_3$ を用いることで２重鎖/G4 DNA 構造形成のダイナミクスを追跡できることが判明した。発表では $QCy(MeBT)_3$ による生細胞内 G4 形成の追跡結果についても議論する。

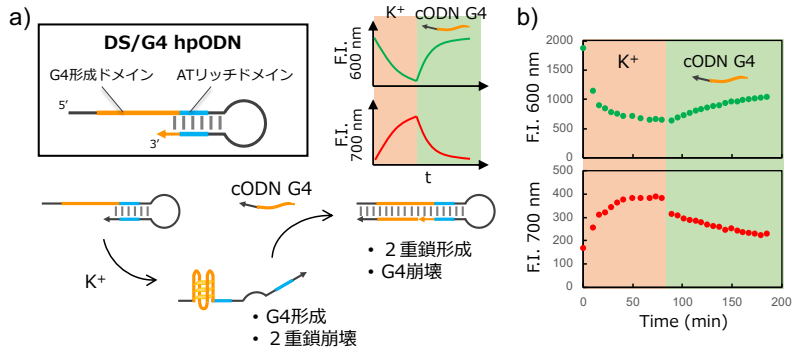


図２．$QCy(MeBT)_3$ を用いた２重鎖/G4 DNA 構造ダイナミクスの追跡．a) DS/G4 hpDNA の構造変化とそれに伴う $QCy(MeBT)_3$ の蛍光応答の模式図．b) $QCy(MeBT)_3$ 蛍光の時間変化．[DS/G4 hpDNA] = [$QCy(MeBT)_3$] = 1.0 μM in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), [KCl] = 10 mM, [cODN G4] = 1 μM. λ (em/ex) = 600/470 or 700/570.

細胞機能制御を目指した高効率 RNA 情報抑制バイオ高分子の創製
−セラピューティック・ウィンドウ拡大を指向したキメラ人工核酸開発−

○西嶋政樹[1]・稲垣雅仁[2]・石渡望[1]・佐藤俊幸[1]・矢野輝[1]・林宏典[3]・荒木保幸[1]・
児玉栄一[1]・和田健彦[1]（[1]東北大多元研、[2]名大院理、[3]東北大災害研）

Application of Chimeric Artificial Nucleic Acids for Efficient Suppression of Functional RNA for Controlling of Cellular Functions ([1]IMRAM, Tohoku University, [2]Graduate School of Science, Nagoya University, [3]IRDeS, Tohoku University) NISHIJIMA Masaki[1];INAGAKI Masahito[1]; ISHIWATA Nozomu[3]; SATO Toshiyuki[1]; YANO Akira[1]; HAYASHI Hironori[1]; ARAKI Yasuyuki[1]; KODAMA Eiichi[3]; WADA Takehiko[1]

核酸医薬は、抗体医薬に続く次世代型分子標的薬として近年大きな期待が寄せられ、精力的に研究されている。特にアンチセンス核酸や siRNA は比較的容易に化学合成可能で、抗体医薬では困難な細胞質・核内でも薬効発現が期待されるため抗体医薬と相補的な分子標的医薬としても有望視されている。これまでにアンチセンス核酸や siRNA へと応用すべく数多くの有用な人工核酸/修飾核酸が開発され、筋ジストロフィーなど難治性疾患に対しても適用可能で、臨床応用に向け研究が推進されている。しかし、核酸医薬が非標的細胞内で非標的配列 RNA などとの結合に基づく *off-target* 効果と呼ばれる副作用の発現は、核酸医薬の実用化を阻む大きな障害の一つとして指摘されている。

このような背景を踏まえ、我々は核酸医薬の適用候補疾患として認識されているガンや脳梗塞など虚血性疾患に特有な低酸素環境、それによって誘起される細胞質 pH の低下をトリガーとし、虚血細胞選択的に薬効発現可能な虚血細胞選択的核酸医薬の開発を目指し、ペプチドリボ核酸（PRNA）と名付けた人工核酸を提案し、pH 変化による複合体形成制御の実証に成功した。

本研究では、PRNA をより実用的な核酸医薬として展開するために、触媒的核酸医薬としての応用も検討した。PRNA による効率的な標的 RNA 切断を達成するため、DNA と RNA が形成する A 型のヘテロ二重らせん錯体を基質とし、ヘテロ二重鎖の RNA 鎖のみを選択的に切断する RNase H の PRNA･RNA 錯体の基質化に取り組んだ。RNase H と DNA/RNA 複合体の X 線構造ならびに報告されている RNaseH の RNA 切断機構構に基づき、効率的な RNA 切断には 1. DNA･RNA ヘテロ二重鎖の DNA 鎖リン酸と RNase H の塩基性アミノ酸チャネルとの効果的な静電相互作用形成に基づく高い結合性の確保、2. 切断サイクルにおいて高いターンオーバー特性獲得に資する切断後 RNA の迅速解離の 2 点が鍵となる要素であると仮定した。この仮説に基づき PRNA と DNA を融合したキメラ人工核酸の設計を考案した。このキメラ分子が条件 1. を満たすためには、複合体構造から DNA 領域は 6 残基程度必要で有り、かつ 2. を満足するためには標的 RNA の中央付近での選択的切断が有効であると推定した。この仮説ならびに複合体構造から、PRNA モジュールの *C* 末端に DNA を 6 残基程度のモジュールを結合し、RNA との複合体に適切な安定性付与を目的にペプチド核酸 (PNA)モジュールを挿入した PRNA-(PNA)-DNA キメラ分子（P_RPD）を設計した。PRNA の導入により PRNA-PNA と RNA の錯体は A 型二重らせん構造を優先することを見出しており、DNA モジュール導入キメラ分子も標的 RNA と A 型二重らせんを形成し、RNaseH に対する高い親和性が期待される。さらにキメラの DNA･RNA 複合体における DNA 部位のリン酸基と RNaseH の有する塩基性アミノ酸チャネルの静電的相互作用により、キメラ分子の PRNA-PNA と DNA のジャンクション領域が RNaseH の切断サイトに位置することが期待され、このジャンクションと水素結合を形成する RNA 領域が結合サイトに取り込まれ当該部位特異的な標的 RNA 切断が期待され、その結果キメラ分子･RNA 二重らせんの安定性が急激に低下し、切断後の RNA の迅速かつ効率的な解離が期待される。このようなジャンクション付近に位置する標的 RNA の部位特異的切断は、最近報告されている RNaseH 切断に基づく *off-target* 効果回避にも有効である事が期待される。

今回は、P_RPD が触媒的遺伝子治療薬としての高いポテンシャルを有することを示す実験結果を発表する。

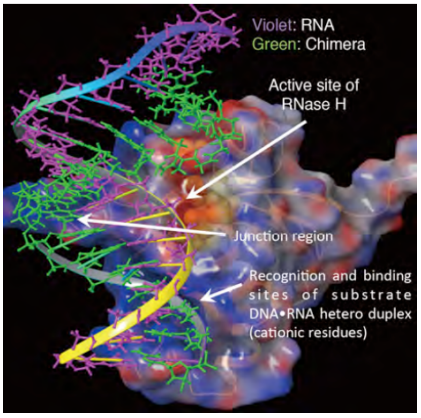


Fig. Structure of chimeric DNA-PNA-PRNA.

Oral

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

Nucleic acids

Chair: Takehiko Wada (Tohoku Univ.)

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

[3B-04] Inhibition of miRNA maturation through triplex formation by peptide nucleic acid (PNA) containing unnatural nucleobases

*Tamaki Endoh[1], Nikita Brodyagin[2], Dziyana Hnedzko[2], Eriks Rozners[2], Naoki Sugimoto[1,3] (1. FIBER, Konan University, 2. Binghamton University, The State University of New York, 3. FIRST, Konan University)

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

[3B-05] Unusual topological RNA G-quadruplex formed of RNA duplex: Implications for dimerization of COVID-19 mRNA

*Yan Xu[1], Yi Song[1], Shi-Yu Wang[1] (1. Division of Chemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Miyazaki)

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

[3B-06] Nucleic Binding Selectivity of RGG Domain in TLS/FUS Regulated by Arginine Methylation

*Tatsuki Masuzawa[1], Ryota Yagi[2], Shinnosuke Kawai[2], Takanori Oyoshi[2] (1. Graduate school of Science and Technology, Shizuoka University, 2. Graduate school of Integrated Science and Technology, Shizuoka University)

非天然塩基含有 PNA による三重らせん構造を介した miRNA の成熟阻害

○遠藤玉樹[1]・BRODYAGIN Nikita[2]・HNEDZKO Dziyana[2]・ROZNERS Eriks[2]・杉本直己[1,3]（[1]甲南大 FIBER、[2]Department of Chemistry, Binghamton University、[3]甲南大 FIRST）

Inhibition of miRNA maturation through triplex formation by peptide nucleic acid (PNA) containing unnatural nucleobases (Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), Konan University[1], Department of Chemistry, Binghamton University, The State University of New York [2], Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University [3]) ENDOH, Tamaki[1]; BRODYAGIN, Nikita [2]; HNEDZKO, Dziyana [2]; ROZNERS, Eriks [2]; SUGIMOTO, Naoki [1, 3]

近年、遺伝子の発現調節に関与する RNA の新たな機能が次々と明らかになってきている。マイクロ RNA（miRNA）は、1990 年代になってから発見された短鎖の機能性 RNA であり、生物としての機能（個体の発生など）に重要な役割を果たしているだけではなく、癌などの疾患の発症と進行にも関連していることから、創薬標的として注目を集めている。miRNA の構造的な特徴として、細胞内で合成される miRNA 前駆体（pre-miRNA）のほとんどが、ステムループ型の二次構造を形成することが挙げられる。また、この二次構造は pre-miRNA から miRNA への成熟反応に関わるタンパク質による認識にも必要な基本構造となっている。一方で、個々の pre-miRNA の二次構造領域（ステム領域）には、それぞれに特徴的な塩基対の並びが存在している。そのため、この塩基対の並びを特異的に認識して強く結合できる分子を構築できれば、特定の pre-miRNA を標的に miRNA への成熟とその機能を阻害することができると考えられる。

我々はこれまでに、非天然塩基を有するペプチド核酸（PNA）を開発し、任意の配列を有する RNA のステム領域に対して特異的に三重らせん構造を形成できることを示してきた[1)]。また、人工的に設計した実験系ではあるものの、メッセンジャーRNA（mRNA）の非翻訳領域を標的とし、合成した PNA を用いて細胞内でのタンパク質合成を特異的に抑制できることも示している[2)]。本研究では、細胞内在性の miRNA を標的とした PNA を合成し、三重らせん構造の形成を介して pre-miRNA から miRNA への成熟過程を阻害することを試みた（図 1）。その結果、癌細胞の増殖や炎症性の皮膚疾患などとの関連性が報告されいている miRNA（miR-197）の成熟を特異的に抑制できることが示された[3)]。遺伝子の発現調節に関与する機能性 RNA は、多くの場合特徴的な高次構造を形成してその機能を発揮するが、高次構造が形成されるためには、土台となる二次構造の形成が必要となる。そのため、この二次構造領域を標的とした PNA を用いることで、様々な RNA の機能の発現を人為的に制御することが可能になると期待される。

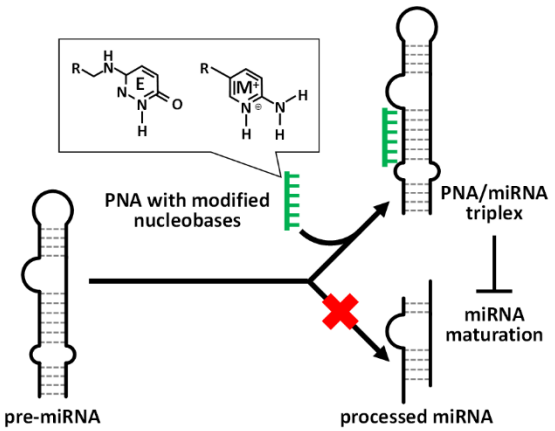


図 1 PNA による miRNA の成熟阻害概念図

【参考文献】1) (a) C. Annoni, T. Endoh, D. Hnedzko, E. Rozners, and N. Sugimoto, *Chem. Commun.*, **2016**, 52, 7935; (b) T. Endoh, C. Annoni, D. Hnedzko, E. Rozners, and N. Sugimoto, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, 18, 32002. 2) T. Endoh, D. Hnedzko, E. Rozners, and N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 899. 3) T. Endoh, N. Brodyagin, D. Hnedzko, N. Sugimoto, and E. Rozners, *ACS Chem. Biol.*, **2021**, 16, 1147.

RNA 二重鎖から形成される新規 RNA G-quadruplex：COVID-19 mRNA の二量体化への影響

宋藝・王詩宇・○徐岩（宮大医学部）

Unusual topological RNA G-quadruplex formed of RNA duplex: Implications for dimerization of COVID-19 mRNA (Division of Chemistry, Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki 889-1692, Japan) Yi Song, Shi-Yu Wang, Yan Xu*

RNA は多様なコンフォメーションを形成し、多くの生物学的機能や細胞プロセスを果たしている。RNA のグアニン（G）に富む配列により形成される G-quadruplex 構造はヒト細胞に存在することが示された。特に転写制御、翻訳プロセス、テロメア末端の保護など重要な役割を果たすことを実証した。また、RNA G-quadruplex が一部のウイルスに存在し、ウイルスのライフサイクルを調節したことも示唆されている。バイオインフォマティクス分析により COVID-19 mRNA が RNA G-quadruplex を形成するいくつかの潜在的な配列があることが示唆されている。COVID-19 mRNA の構造を解析することは、このウイルスの分子機構を理解し、候補薬と治療法を開発するために不可欠である。

この研究では、NMR などにより COVID-19 mRNA の nucleocapsid 遺伝子領域に位置する 17-mer RNA の構造を調べた。その結果、17-mer RNA が二重鎖から形成される新規 RNA G-quadruplex 構造を形成することを示唆している。またこの RNA G-quadruplex により COVID-19 mRNA を二量体化することが明らかになった。これらの結果は、COVID-19 に対する新規抗ウイルス薬の開発に新たな洞察を与えると期待される。

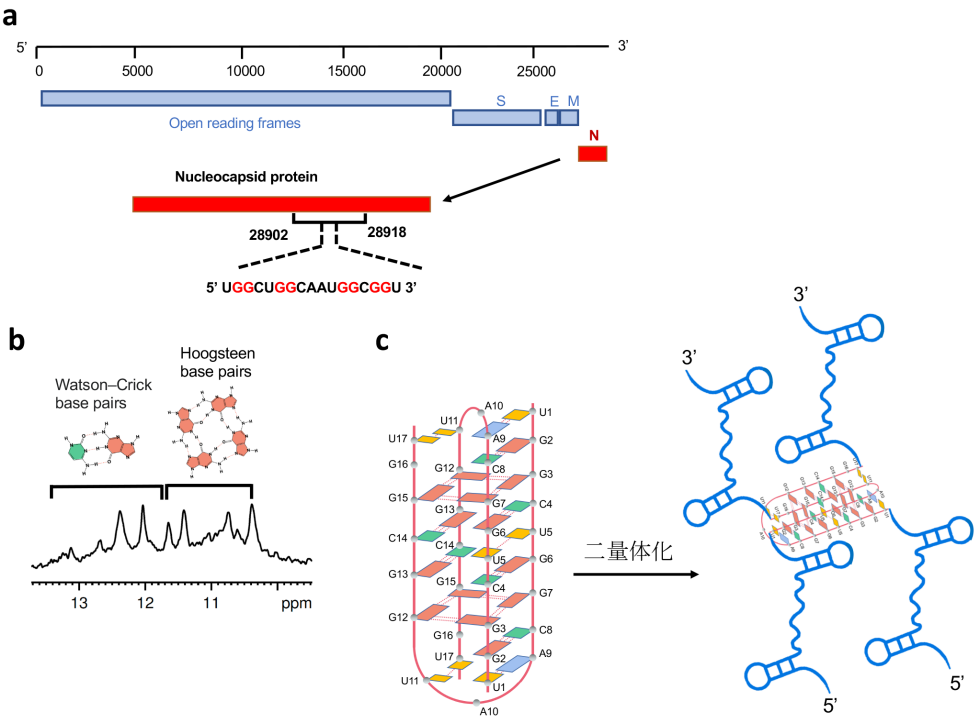


Figure 1. (**a**) A 17-mer RNA located on region of the nucleocapsid gene from 28902 to 28918. (**b**) The imino region of the proton NMR spectrum of virus RNA. The guanosine imino protons resonating in the range of 10.39 and 11.64 ppm are characteristic of Hoogsteen G: G base pairs, and those between 11.6-13.5 ppm are typical of Watson-crick G:C base pairs. (**c**) Schematic structure of 17-mer RNA and dimerization.

TLS/FUS の RGG 領域の核酸結合性のアルギニンメチル化による制御

○増澤樹[1]・八木涼太[2]・河合信之輔[2]・大吉崇文[1,2]（[1]静大院創造、[2]静大院理）

Nucleic Binding Selectivity of RGG Domain in TLS/FUS Regulated by Arginine Methylation (Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University [1], Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University [2]) MASUZAWA, Tatsuki[1]; YAGI, Ryota[2]; KAWAI, Shinnosuke[2]; OYOSHI, Takanori[1,2]

本研究は、TLS/FUS のグアニン四重鎖（G4）結合性に対するアルギニンメチル化の効果を明らかにすることを目的とする。これまでに我々は、TLS/FUS が核内のテロメア領域において G4 構造依存的にヒストン修飾を制御することを明らかにした [1)]。さらに、TLS/FUS 中のアルギニン―グリシン―グリシン繰り返し（RGG）領域の G4 構造特異的な結合性に、RGG 領域がβスパイラル構造を形成することが重要であることを見出している [2)]。一方で、細胞内の TLS/FUS は核内だけでなく、細胞質中でも多くの生物学的機能を果たしている。細胞内の TLS/FUS の局在は、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素（PRMT）によるメチル化によって制御されているが、PRMT によるメチル化が TLS/FUS の核酸結合性にどのように影響しているかについては明らかになっていない。そのため、我々はメチル化された TLS/FUS の核酸結合性について明らかにすることを本研究の目的とした。

TLS/FUS の核酸結合性に対するメチル化の影響を調べるために、ゲルシフトアッセイ法によりメチル化されていない TLS/FUS とメチル化された TLS/FUS の核酸結合性について調べた。その結果、メチル化されていない TLS/FUS は G4 核酸に特異的に結合したが、メチル化された TLS/FUS は一本鎖核酸と結合した（Figure）。この結果から、アルギニンのメチル化によって TLS/FUS の核酸結合性は変化することが分かった。さらに、メチル化された RGG 領域の二次構造について明らかにするために、メチル化されていない、もしくはされた RGG 領域の CD スペクトルを測定した。その結果、メチル化されていない RGG 領域はβスパイラル構造に特徴的な 202 nm のネガティブピークを示した。一方で、メチル化された RGG 領域の 202 nm のピークは減少していた。これらの結果より、RGG 領域が形成するβスパイラル構造は PRMT1 によるアルギニンメチル化により形成が抑制されることがわかった。

以上から、TLS/FUS の RGG 領域が有する G4 結合性は PRMT1 によるメチル化によって一本鎖核酸結合性へと変化することが明らかになった。これらの発見は hnRNP A1 や Nucleolin のようなほかの RGG 領域を有する G4 結合タンパク質のメチル化による制御機構の理解につながることが期待される。

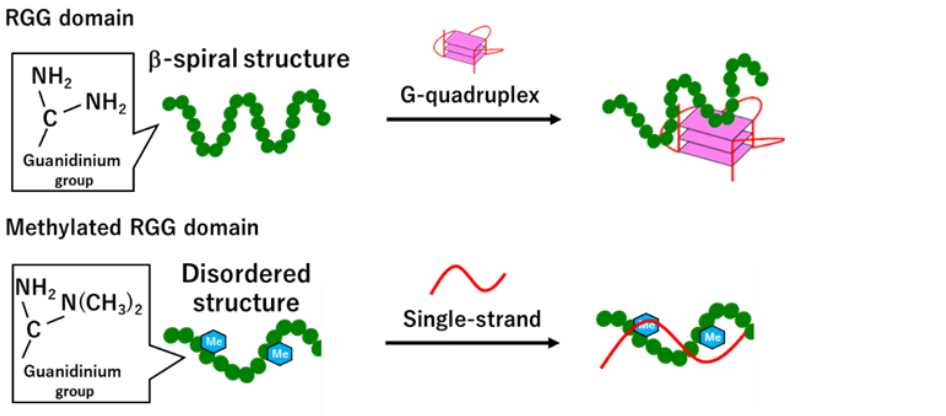


Figure : Arginine methylation alters nucleic acid binding ability of RGG domain in TLS/FUS

1) Takahama, K., *et al.*, (2013), *Chem. Biol.*, 20, 341-350
2) Yagi, R., *et al.*, (2018), *Nucleic Acids Res.*, 46, 5894-5901

Oral

Fri. Sep 10, 2021 11:20 AM - 12:00 PM JST | Fri. Sep 10, 2021 2:20 AM - 3:00 AM UTC | Room B
Zoom

Nucleic acids

Chair: Takashi Sakamoto (Wakayama Univ.)

11:20 AM - 11:40 AM JST | 2:20 AM - 2:40 AM UTC

[3B-07] Development of Fluorophosphoramidate as a New Biocompatible Transformable Functional Group and its Application as a Phosphate Prodrug for Nucleoside Analogs

*Yasuaki Kimura[1], Yuki Yoshida[1], Fumiaki Tomoike[6], Fumitaka Hashiya[1], Tetsuro Suzuki[7], Shuto Hirota[2], Yuriko Saiki[2], Akira Horii[2], Akiyoshi Hirayama[3], Tomoyoshi Soga[3], Hiroshi Abe[1,4,5] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. School of Medicine, Tohoku University , 3. Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 4. JST CREST, 5. Institute for Glyco-core Research, 6. Department of Life Science, Gakushuin University, 7. School of Medicine, Hamamatsu University)

11:40 AM - 12:00 PM JST | 2:40 AM - 3:00 AM UTC

[3B-08] Development of 4'-thiomodified cyclic dinucleotide analogs

*Mao Kinoshita[1], Noriko Tarashima[1], Noriaki Minakawa[1] (1. Pharmaceutical sciences, Tokushima University)

フルオロリン酸アミデート基の開発と核酸アナログのプロドラッグへの応用

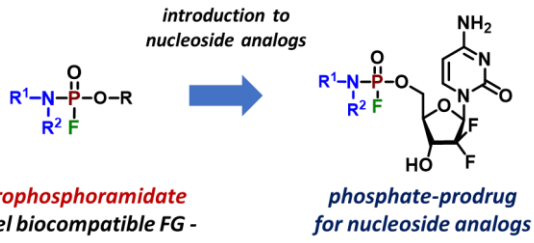
○木村康明[1]・吉田祐希[1]・友池史明[2,3]・橋谷文貴[2]・鈴木哲朗[4]・廣田嵩人[5]・齋木由利子[5]・堀井明[5]・平山明由[6]・曽我朋義[6]・阿部洋[1,7,8]　([1]名大院理, [2]名大物質科学国際センター, [3]学習院大理, [4]浜松医科大医, [5]東北大院医, [6]慶応義塾大 先端生命研究所, [7]JST CREST, [8]糖鎖生命コア研究拠点 (iGCORE))

Development of Fluorophosphoramidate as a New Biocompatible Transformable Functional Group and its Application as a Phosphate Prodrug for Nucleoside Analogs ([1]Graduate School of Science, Nagoya University, [2]Research Center for Materials Science, Nagoya University, [3]Department of Life Science, Gakushuin University, [4]School of Medicine, Hamamatsu University, [5]School of Medicine, Tohoku University, [6]Institute for Advanced Biosciences, Keio University, [7]CREST, Japan Science and Technology Agency, [8]Institute for Glyco-core Research (iGCORE))
Yasuaki Kimura[1], Yuki Yoshida[1], Fumiaki Tomoike[2, 3], Fumitaka Hashiya[2], Tetsuro Suzuki[4], Shuto Hirota[5], Yuriko Saiki[5], Akira Horii[5], Akiyoshi Hirayama[8], Tomoyoshi Soga[8], Hiroshi Abe[1, 9, 10]

リン酸ベースの人工的官能基は、生体活性分子の機能を生体内で制御するために重要である。本研究では、P-F結合およびP-N結合の2つの特徴的な化学結合を有する新たな生体適合性リン酸アナログ; フルオロホスホロアミデート（FPA）官能基の開発を行った。

FPAは以下の手法で合成を行った。塩化ホスホリルに１等量のアミンを作用させアミノ基を導入し、続いてフッ化銀により対応するジフロリド体を調製した。これを核酸アナログの一種であるgemcitabineの5’-水酸基に導入し、FPA基を有する核酸アナログを合成した。続いてこのFPA-gemcitabineの化学的性質を評価したところ、第1級アミノ基を持つFPAは水溶液中で比較的不安定で速やかにモノリン酸に変換されるのに対し、第2級アミノ基を持つFPAは安定であることが明らかとなった。更にFPAのアミノ基の構造最適化を行うことで, FPA基が核酸アナログのリン酸プロドラッグとして機能することが明らかとなった。

様々なFPA-gemcitabine誘導体を合成し、その抗がん活性を評価したところ、gemcitabineやそのProTide型プロドラッグを上回る優れた抗がん活性を示した。このFPA基は、抗がん剤や抗ウイルス剤として利用される各種核酸アナログに幅広く適用可能な有用な官能基であると期待される。



ヌクレオチド糖部 4'位に硫黄原子を有する環状ジヌクレオチドアナログの創製

○木下真緒・田良島典子・近藤明希・南川典昭（徳島大院薬）

Development of 4'-thiomodified cyclic dinucleotide analogs (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University) KINOSHITA, Mao; SAITO-TARASHIMA, Noriko; KONDO, Aki; MINAKAWA, Noriaki

環状ジヌクレオチド類とは、ヌクレオチド 2 分子から構成される環状化合物であり、例えば、アデノシン一リン酸 (AMP) 2 分子からなる場合、c-di-AMP と呼ばれる。2011 年、Burdette らにより環状ジヌクレオチド類がヒト細胞内において stimulator of interferon genes (STING) への結合を介し、自然免疫系を強く活性化することが報告された (Figure 1)[1]。このため、環状ジヌクレオチド類は、がん免疫療法における医薬候補化合物として大きな期待が寄せられている。しかし、その医薬応用にむけては、1) 細胞膜透過性の乏しさ、ならびに 2) ホスホジエステラーゼ (PDE) による速やかな分解が問題となる。したがって、膜透過性ならびに PDE 抵抗性の高い環状ジヌクレオチドアナログの創製が求められている。

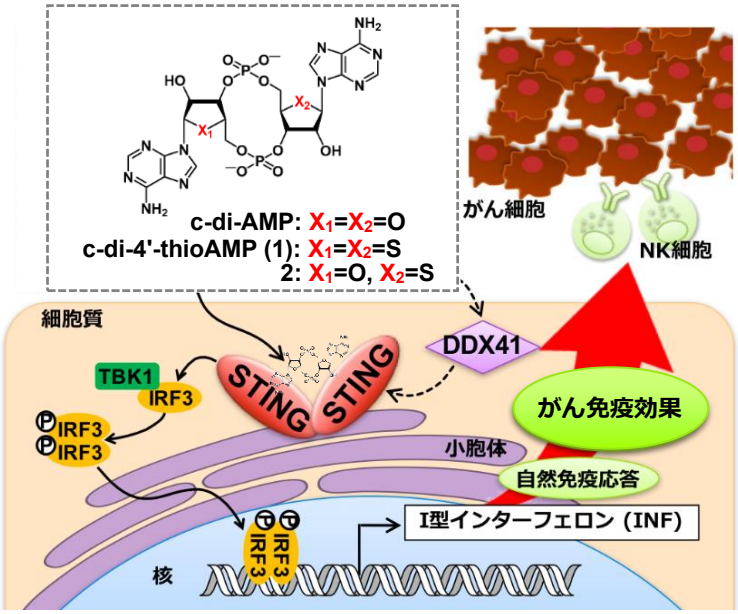


Figure 1 環状ジヌクレオチド類の自然免疫誘導機構

一方、我々のグループはこれまでにヌクレオチド糖部フラノース環 4'位の酸素原子を硫黄原子へと置換した 4'-チオ核酸類を開発し、このものが天然型 RNA との生物学的等価性ならびに高い PDE 抵抗性を併せ持つことを明らかとしている[2][3]。そこで本研究では、4'-チオヌクレオチドにより構成される環状ジヌクレオチドアナログの網羅的合成を計画した。まずはじめに、アデノシン型の環状ジヌクレオチドである c-di-4'- thioAMP (**1**) および **2** を合成し、STING を介した自然免疫誘導能を細胞系において評価したところ、両者は天然型の c-di-AMP と比較して高い自然免疫誘導能を示すことが明らかとなった (Figure 2)[4]。さらに、c-di-4'- thioAMP (**1**) は c-di-AMP 選択的分解酵素である YybT に対して優れた分解抵抗性を発揮することが示された[5]。以上の結果を踏まえて、その他複数の 4'-チオ環状ジヌクレオチドアナログの合成ならびに活性評価も行ったので、本発表ではそれらの詳細について報告する。

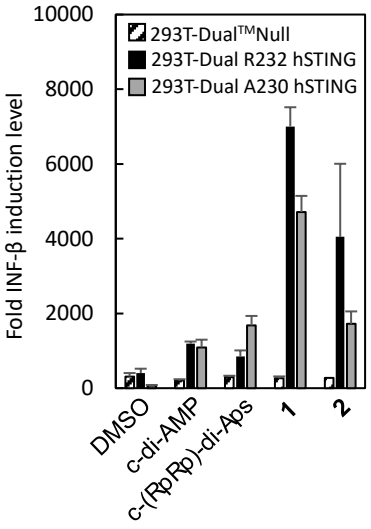


Figure 2 自然免疫誘導能評価

[1] Burdette *et al., Nature* **2011**, *478,* 515.
[2] Hoshika *et al., Nucleic Acid Res.* **2004**, *32,* 3815.
[3] Saito-Tarashima *et al., J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 17255.
[4] Saito-Tarashima, Kinoshita *et al., RSC. Med. Chem.* **2021**, *in press*.
[5] Shiraishi *et al., Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25,* 3883.

©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