

## ポスター発表(1日目)

■ 2021年9月8日(水) 16:50 ~ 17:50 | 後半番号 Zoom

■ 奇数 (1P-049~1P-093)

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

\*Lingyun Hu<sup>1</sup>, Yusuke Takezawa<sup>1</sup>, Takahiro Nakama<sup>1</sup>, Mitsuhiro Shionoya<sup>1</sup> (1. The University of Tokyo)

[1P-051] 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<sup>1</sup>、森廣 邦彦<sup>1</sup>、岡本 晃充<sup>1,2</sup> (1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 東京大学先端科学技術研究センター)

[1P-053] 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<sup>1</sup>、角田 貴洋<sup>2</sup>、生越 友樹<sup>3</sup>、浅沼 浩之<sup>1</sup>、樫田 啓<sup>1</sup> (1. 名大院工、2. 金沢大院自然、3. 京大院工)

[1P-055] 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<sup>1</sup>、柳川 正隆<sup>2</sup>、阿部 充宏<sup>2</sup>、廣島 通夫<sup>2,3</sup>、佐甲 靖志<sup>2</sup>、植木 亮介<sup>1</sup>、山東 信介<sup>1</sup> (1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 理化学研究所CPR、3. 理化学研究所BDR)

[1P-057] 二核銅錯体のがん細胞選択的毒性：DNA標的部導入による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<sup>1</sup>、人見 穰<sup>1</sup>、小寺 政人<sup>1</sup> (1. 同志社大学大学院理工学研究科)

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

\*Kirankumar Krishnamurthy<sup>1</sup>, Arivazhagan Rajendran<sup>1</sup>, Eiji Nakata<sup>1</sup>, Takashi Morii<sup>1</sup> (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

[1P-061] 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<sup>1</sup>、田畑 香織<sup>1</sup>、阿部 由紀子<sup>1</sup>、谷口 陽祐<sup>1</sup>、佐々木 茂貴<sup>2</sup> (1. 九州大学大学院薬学研究院、2. 長崎国際大学薬学部)

[1P-063] 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<sup>1</sup>、平野 歩<sup>1</sup>、中村 重孝<sup>1</sup>、藤本 健造<sup>1</sup> (1. 北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

[1P-065] 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<sup>1</sup>、土谷 さくら<sup>1</sup>、外山 実侑<sup>1</sup>、北松 瑞生<sup>1</sup> (1. 近畿大学院総合理工)

[1P-067] 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<sup>1</sup>、田中 剛<sup>1</sup>、吉野 知子<sup>1</sup> (1. 東京農工大学 大学院 工学府 生命工学専攻)

[1P-069] 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<sup>1</sup>、田村 伊織<sup>1</sup>、伊 博<sup>1</sup>、齋藤 雄太郎<sup>1</sup>、山田 直生<sup>1</sup>、高草木 洋一<sup>2</sup>、久保田 晋平<sup>3</sup>、田井中 一貴<sup>4</sup>、山東 信介<sup>1</sup> (1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 量研機構量子生命科学研究所、3. 北海道大学遺伝子病制御研究所、4. 新潟大学脳研究所)

[1P-071] 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<sup>1</sup>、笹本 佳那<sup>1</sup>、北口 哲也<sup>2</sup>、上田 宏<sup>2</sup> (1. 東京工業大学生命理工学院、2. 東京工業大学化学生命科学研究所)

[1P-073] 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<sup>1</sup>、瀬瀬 宏也<sup>1</sup>、前田 義昌<sup>1</sup>、林 泰圭<sup>2</sup>、原田 学<sup>2</sup>、吉野 知子<sup>1</sup>、松永 是<sup>1</sup>、田中 剛<sup>1</sup> (1. 東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻、2. 株式会社マルコム)

---

[1P-075] 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<sup>1</sup>、中島 菜月<sup>1</sup>、長江 拓也<sup>1</sup>、佐藤 良勝<sup>2</sup>、東山 哲也<sup>2,3</sup>、多喜 正泰<sup>2</sup>、山口 茂弘<sup>1,2</sup> (1. 名大院理、2. 名大ITbM、3. 東大院理)

---

[1P-077] 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<sup>1</sup>、福井 晃佑<sup>1</sup>、藤井 浩<sup>2</sup>、伊東 忍<sup>1</sup> (1. 阪大院工、2. 奈良女子大院自然科学)

---

[1P-079] 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<sup>1</sup>、中川 支央里<sup>1</sup>、佐賀 佳央<sup>1</sup> (1. 近畿大学大学院総合理工学研究科)

---

[1P-081] 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<sup>1</sup>、岡村 麻美<sup>1</sup>、野村 章子<sup>1</sup>、小寺 政人<sup>1</sup>、人見 穰<sup>1</sup> (1. 同志社大学院理工学研究科)

---

[1P-083] 多量化するヒト触媒抗体軽鎖の会合挙動

\*酒井 隆裕<sup>1</sup>、Wahyu Fitriana<sup>1</sup>、真島 剛史<sup>1</sup>、小林 直也<sup>1</sup>、一二三 恵美<sup>2</sup>、宇田 泰三<sup>3</sup>、廣田 俊<sup>1</sup> (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)

---

[1P-085] 細胞表面指向型ダブルクリック試薬の開発

\*北川 浩平<sup>1</sup>、吉永 萌華<sup>1</sup>、寺 正行<sup>1</sup> (1. 東京農工大学大学院工学府)

---

[1P-087] 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<sup>1</sup>、稲葉 央<sup>1</sup>、佐々木 善浩<sup>2</sup>、秋吉 一成<sup>2</sup>、松浦 和則<sup>1</sup> (1. 鳥取大院工、2. 京大院工)

---

[1P-089] 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<sup>19</sup>F MRI造影剤の開発

\*小西 祐輝<sup>1</sup>、杉原文徳<sup>2,3</sup>、蓑島 維文<sup>1</sup>、長池 航<sup>4</sup>、内橋 貴之<sup>4</sup>、菊地 和也<sup>1,2,5</sup> (1. 大阪大学工学研究科、2. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター、3. 大阪大学微生物病研究所、4. 名古屋大学大学院理学研究科、5. 大阪大学量子情報・量子生命研究センター)

---

[1P-091] 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<sup>1</sup>、山田 大雅<sup>1</sup>、小松 晃之<sup>1</sup> (1. 中央大学理工学部)

---

[1P-093] 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<sup>1</sup>、根岸 諒<sup>1</sup>、桶川 隆嗣<sup>2</sup>、中村 雄<sup>2</sup>、出来 真弓<sup>2</sup>、渡邊 碧<sup>1</sup>、田中 剛<sup>1</sup>、吉野 知子<sup>1</sup> (1. 東京農工大学大学院 工学府 生命工学専攻、2. 杏林大学医学部附属病院 泌尿科)

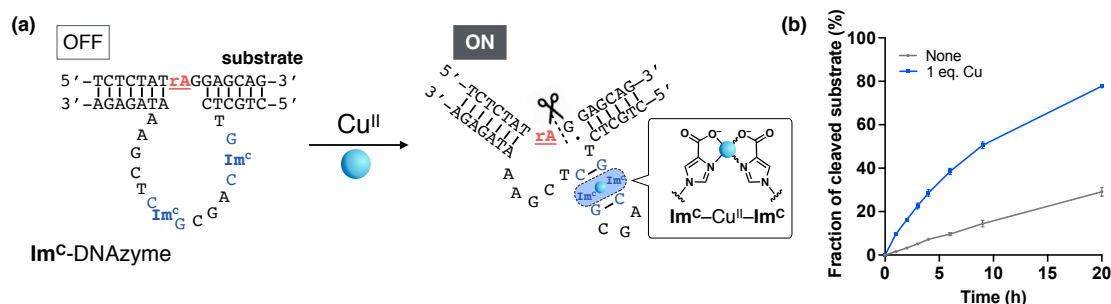
## Metal-dependent activity regulation of a compact-sized DNAzyme containing an imidazole-4-carboxylate base pair

○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<sup>II</sup>-mediated artificial base pairs formed by coordination bonds between ligand-type nucleobase analogs and a Cu<sup>II</sup> ion.<sup>[1]</sup> Among the various RNA-cleaving DNAzymes, the 8-17 DNAzyme stands out for its compact size and high catalytic capacity.<sup>[2]</sup> 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<sup>II</sup>–T, C–Ag<sup>I</sup>–C and an artificial Cu<sup>II</sup>-mediated hydroxypyridone base pair (H–Cu<sup>II</sup>–H), but the metal-dependent regulation of activity has not been well demonstrated.<sup>[3]</sup>

In this study, a Cu<sup>II</sup>-responsive DNAzyme was developed by incorporating a known Cu<sup>II</sup>-mediated imidazole-4-carboxylate base pair (**Im**<sup>C</sup>–Cu<sup>II</sup>–**Im**<sup>C</sup>)<sup>[4,4]</sup> into the short stem of 8-17 DNAzyme (Fig. 1a). The modification sites were determined based on the crystal structure of the DNAzyme.<sup>[5]</sup> In the absence of Cu<sup>II</sup> ions, the **Im**<sup>C</sup>-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**<sup>C</sup>. The addition of 1 equiv. of Cu<sup>II</sup> ion enhanced the activity of the DNAzyme (Fig. 1b, blue). This is probably due to the formation of **Im**<sup>C</sup>–Cu<sup>II</sup>–**Im**<sup>C</sup>, which stabilizes the short stem. Overall, the activity of the **Im**<sup>C</sup>-DNAzyme was increased 4.7-fold by the addition of equimolar Cu<sup>II</sup> ion. This is more efficient than previous DNAzymes with different metal-mediated base pairs<sup>[3]</sup>. These results suggest that the **Im**<sup>C</sup>–Cu<sup>II</sup>–**Im**<sup>C</sup> 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<sup>II</sup>-responsive RNA-cleaving DNAzymes bearing an **Im**<sup>C</sup>–Cu<sup>II</sup>–**Im**<sup>C</sup> base pair (**Im**<sup>C</sup>-DNAzyme). rA: an adenosine ribonucleotide at the cleaving site. (b) RNA-cleavage reaction catalyzed by **Im**<sup>C</sup>-DNAzyme in the presence (1 equiv.) and in the absence of the Cu<sup>II</sup> ions. [DNAzyme] = 1.0 μM, [substrate] = 10 μM, [CuSO<sub>4</sub>] = 0 or 1.0 μM in a reaction buffer (50 mM HEPES (pH 7.5) containing 100 mM NaCl and 10 μM Pb(OAc)<sub>2</sub>) 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. Commun.*, **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.

## 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<sup>1</sup>・森廣邦彦<sup>1</sup>・岡本晃充<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東大院工、<sup>2</sup>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<sup>1</sup>, Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo<sup>2</sup>) NEMOTO, Yui<sup>1</sup>; MORIHIRO, Kunihiko<sup>1</sup>; OKAMOTO, Akimitsu<sup>1,2</sup>

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<sup>1)</sup>、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  $pK_{aH}$  が 3.6 から 7.0 に上昇することに注目した<sup>2)</sup>。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<sup>C</sup>** は  $pK_{aH}$  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<sup>C</sup>** 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。

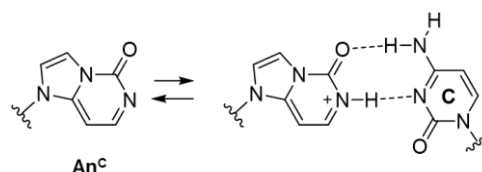


Fig 1. Protonation of **An<sup>C</sup>**.

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<sup>C</sup>: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<sup>C</sup>: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<sup>C</sup>:C** base pair.

| X:Y                     | 5'-d(TACGCTXTCGCAT)-3'<br>3'-d(ATGCGAYAGCGTA)-5' |        |                       |        |                            |        |                       |        |
|-------------------------|--------------------------------------------------|--------|-----------------------|--------|----------------------------|--------|-----------------------|--------|
|                         | $T_m$ [°C]                                       |        | $\Delta H$ [kcal/mol] |        | $\Delta S$ [cal/(K · mol)] |        | $\Delta G$ [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   |
| <b>An<sup>C</sup>:C</b> | 35                                               | 41     | -110                  | -54    | -328                       | -146   | -8.0                  | -9.1   |

次に、**An<sup>C</sup>** 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<sup>3)</sup> を基に設計した。本発表では、ステム部分に 1~複数個の **An<sup>C</sup>: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)



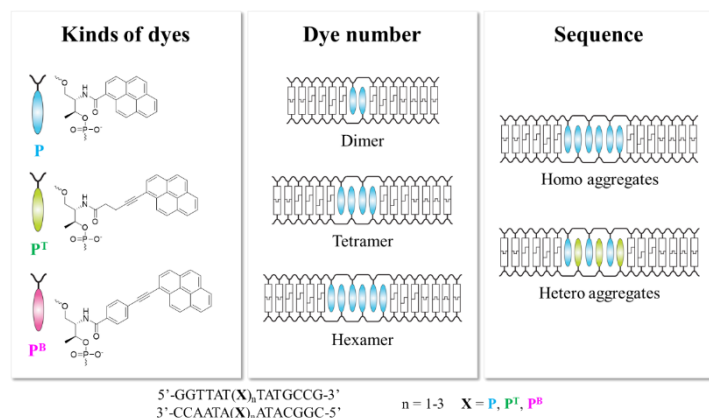
## 高輝度 CPL 発現に適した DNA 導入ピレン会合体の探索

○伊藤有香<sup>1</sup>・角田貴洋<sup>2</sup>・生越友樹<sup>3</sup>・浅沼浩之<sup>1</sup>・樫田啓<sup>1</sup> (1 名大院工、<sup>2</sup> 金沢大院自然、<sup>3</sup> 京大院工)

**Development of pyrene aggregates using DNA backbone for high-brightness CPL expression** (Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>1</sup>, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University<sup>2</sup>, Graduate School of Engineering, Kyoto University<sup>3</sup>) ITO, Yuka<sup>1</sup>; KAKUTA, Takahiro<sup>2</sup>; OGOSHI, Tomoki<sup>3</sup>; ASANUMA, Hiroyuki<sup>1</sup>; KASHIDA, Hiromu<sup>1</sup>

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<sup>[1]</sup>。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**

行ったところ、P<sup>T</sup>やP<sup>B</sup>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.

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<sup>[2]</sup>。そこで、D-threoninolを介して種々のピレン誘導体(P, P<sup>T</sup>, P<sup>B</sup>)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

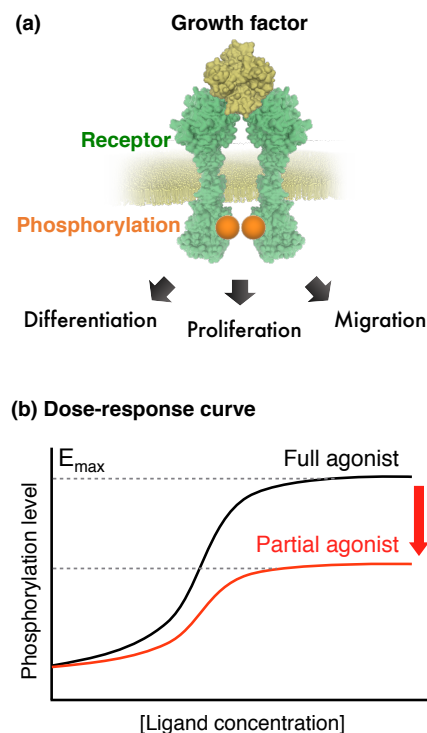
## DNAに基づく増殖因子受容体パーシャルアゴニストの開発および生理作用評価

○秋山 桃子<sup>1</sup>・柳川 正隆<sup>2</sup>・阿部 充宏<sup>2</sup>・廣島 通夫<sup>2,3</sup>・佐甲 靖志<sup>2</sup>・植木 亮介<sup>1</sup>・山東 信介<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院工、<sup>2</sup>理化学研究所 CPR、<sup>3</sup>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<sup>1</sup>, RIKEN CPR<sup>2</sup>, RIKEN BDR<sup>3</sup>) AKIYAMA, Momoko<sup>1</sup>; YANAGAWA, Masataka<sup>2</sup>; ABE, Mitsuhiro<sup>2</sup>; HIROSHIMA, Michio<sup>2,3</sup>; SAKO, Yasushi<sup>2</sup>; UEKI, Ryosuke<sup>1</sup>; SANDO, Shinsuke<sup>1</sup>

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<sup>1)</sup>。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)<sup>2,3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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*.

## 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 穰・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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>(μ-OH)(bcamide)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**4**) (Fig 1)が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度に比例して DNA 切断を促進することを見出した<sup>[1]</sup>。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<sub>50</sub> 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<sub>2</sub>(μ-OH)(bcamide-Pn-phen)](ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (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。

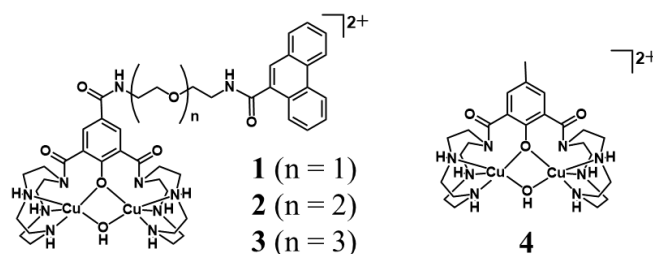


Fig 1. Chemical structures of 1–4.

[1] Kadoya, Y.; Fukui, K.; Hata, M.; Miyano, R.; Hitomi, Y.; Yanagisawa, S.; Kubo, M.; Kodera, M. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 14294–14298.

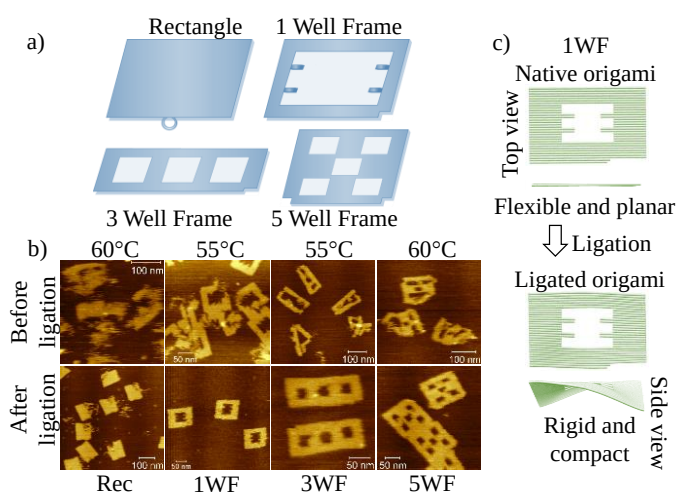
## Enhanced Stability and Structural Changes of DNA Origami by Enzymatic Ligation

(Institute of Advanced Energy, Kyoto University<sup>1</sup>) KRISHNAMURTHY, Kirankumar<sup>1</sup>, RAJENDRAN, Arivazhagan<sup>1</sup>, NAKATA, Eiji<sup>1</sup> and MORII, Takashi<sup>1</sup>

The structural DNA nanotechnology<sup>1)</sup> has attracted much attention during the past one and a half decades due to the addition of the scaffolded DNA origami method<sup>2</sup> to the field. Its versatility in designing complex and programmable constructs of two- (2D)<sup>2)</sup> and three-dimensional (3D)<sup>3)</sup> 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<sup>4)</sup> and viral capsids, carriers of drugs, platform for the analysis of single molecular reactions and processes,<sup>5)</sup> 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<sup>6)</sup> 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.

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. Rothmund, *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).



**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.

## 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

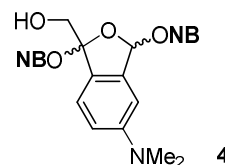
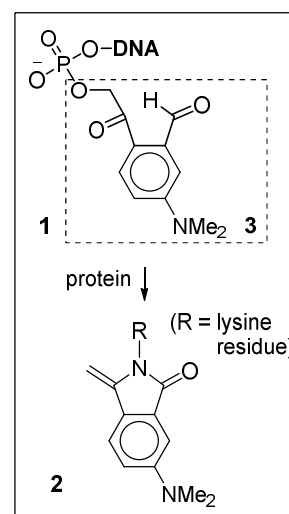
○麻生 真理子<sup>1</sup>・田畑 香織<sup>1</sup>・阿部 由紀子<sup>1</sup>・谷口 陽祐<sup>1</sup>・佐々木 茂貴<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup> 九大院薬、<sup>2</sup> 長崎国際大薬)

**Properties of DNA-binding proteins modified with solvatochromic fluorophore** (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyusyu University<sup>1</sup>, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University<sup>2</sup>, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University<sup>2</sup>) ASO, Mariko<sup>1</sup>; TABATA, Kaori<sup>1</sup>; ABE, Yukiko<sup>1</sup>; TANIGUCHI, Yosuke<sup>1</sup>; SASAKI, Shigeki<sup>1,2</sup>

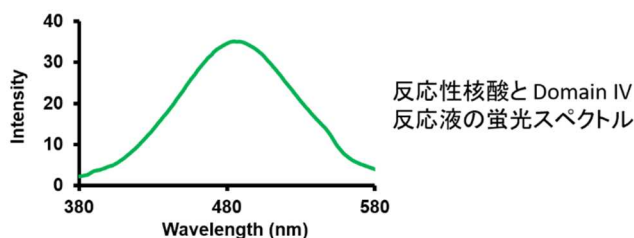
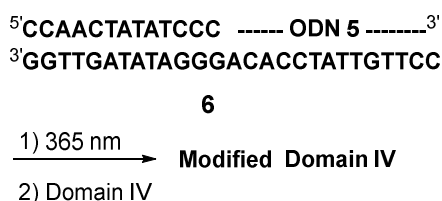
蛋白質の部位特異的蛍光修飾は蛋白質の構造、機能研究において有用な情報を提供する。我々は DNA 結合性蛋白質の部位特異的蛍光修飾を目的に反応性核酸 **1** を設計した。<sup>1)</sup> 大腸菌複製開始に関わる蛋白質 DnaA の結合配列に反応性基 **3** を導入した反応性核酸は、DnaA へ結合後、近接するリジン残基を蛍光ソルバトクロミズムを示す環境応答型蛍光分子 **2** (dimethylamino-3-methyleneisindolin-1-one) へ変換すると予想し、DnaA の DNA 結合ドメイン (Domain IV) の修飾反応を行った。また共存する核酸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** (NBOH = *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



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.

## 超高速光架橋を用いた double-duplex インベーション法の開発

○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つである。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<sup>1,2</sup>。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 (<sup>CNV</sup>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<sup>3</sup>。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(<sup>CNU</sup>)を用いていた<sup>4</sup>。しかし、この <sup>CNU</sup> 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、<sup>CNU</sup> 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。

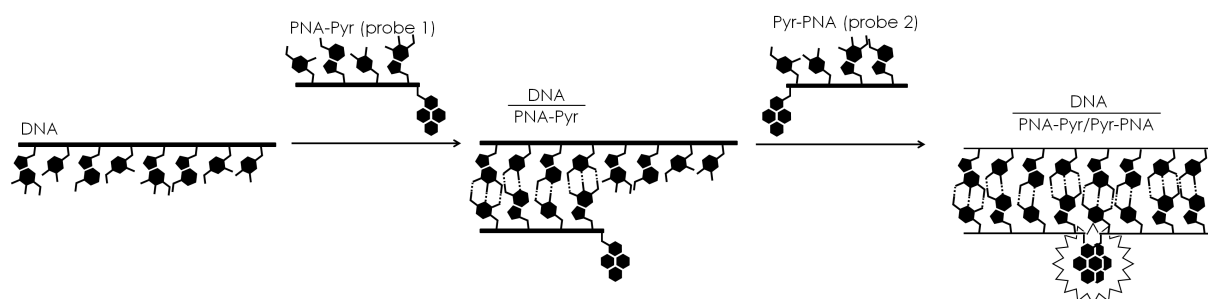


Fig.1. Schematic illustration of DNA and RNA detection by Pyr-modified PNA probes.

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。

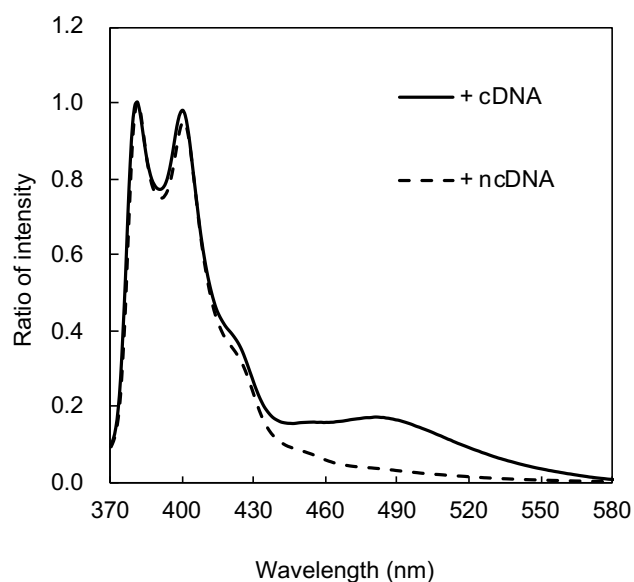


Fig. 2. Fluorescence spectra of two pyrene-modified PNA probes (PNA-Pyr and Pyr-PNA) with a complementary DNA (cDNA; solid line) and a non-complementary DNA (ncDNA; broken line) in PBS at room temperature. Each of Pyr-modified PNA concentration was 1  $\mu$ M. The excitation wavelength was 350 nm.



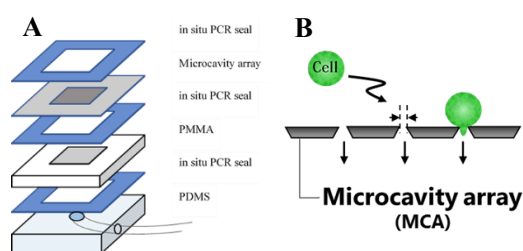
## Microcavity Array を用いた細胞アレイ化におけるメカニカルストレスの影響評価

○鈴木智加良<sup>1</sup>・田中剛<sup>1</sup>・吉野知子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>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

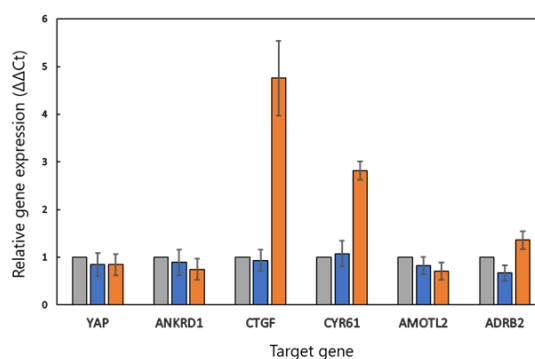
がんは疾患の進行とともに多くの変異を蓄積するため、遺伝子型・表現型ともに不均一な細胞集団である。近年、単一細胞分離技術の発展によりがん細胞の単一細胞解析が注目されている。当研究室で作成された Microcavity Array (MCA) は孔径数  $\mu\text{m}$  の貫通孔を高密度にアレイ化したフィルター型の単一細胞分離デバイスであり、細胞のサイズや変形能に基づき微細貫通孔上に細胞を捕捉する技術である。これまでに MCA を用いてがん患者末梢血から血中循環腫瘍細胞の回収と単一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を行ってきた。しかし、MCA を用いた細胞の捕捉操作により細胞に対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に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、発現量に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  $\mu\text{m}$  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がん細胞株 MCF-7 及び MDA-MB-231 ( $0.8 \sim 1 \times 10^6$  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がん細胞株 MCF-7 においては、ピ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

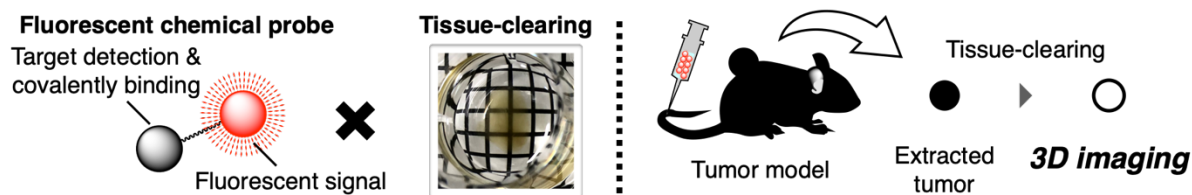
○坂本大地<sup>1</sup>・田村伊織<sup>1</sup>・伊博<sup>1</sup>・齋藤雄太郎<sup>1</sup>・山田直生<sup>1</sup>・高草木洋一<sup>2</sup>・久保田晋平<sup>3</sup>・田井中一貴<sup>4</sup>・山東信介<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東大院工・<sup>2</sup>量研機構量子生命科学研究所・<sup>3</sup>北大遺伝子病制御研究所・<sup>4</sup>新大脳研究所)

**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<sup>1</sup>, Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology<sup>2</sup>, Molecular Neuroimmunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University<sup>3</sup>, Development of System Pathology for Neurological Disorders, Center for Bioresources, Brain Research Institute, Niigata University<sup>4</sup>) SAKAMOTO, Daichi<sup>1</sup>; TAMURA, Iori<sup>1</sup>; YI, Bo<sup>1</sup>; SAITO, Yutaro<sup>1</sup>; YAMADA, Naoki<sup>1</sup>; TAKAKUSAGI, Yoichi<sup>2</sup>; KUBOTA, Shimpei<sup>3</sup>; TAINAKA, Kazuki<sup>4</sup>; SANDO, Shinsuke<sup>1</sup>

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<sup>1</sup>。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.

## 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<sup>1</sup>・笹本佳那<sup>1</sup>・北口哲也<sup>2</sup>・上田宏<sup>2</sup>(<sup>1</sup>東工大生命、<sup>2</sup>東工大化生研)

**Rapid and precise antigen detection using Quenchbody by fluorescence polarization** (<sup>1</sup>Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech., <sup>2</sup>CLS, IIR, Tokyo Tech.) YASUDA, Takanobu<sup>1</sup>; SASAMOTO, Kana<sup>1</sup>; KITAGUCHI, Tetsuya<sup>2</sup>; UEDA, Hiroshi<sup>2</sup>

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ことから、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<sup>1)</sup>。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 $1\ \mu\text{M}$ 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)<sup>2)</sup>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。

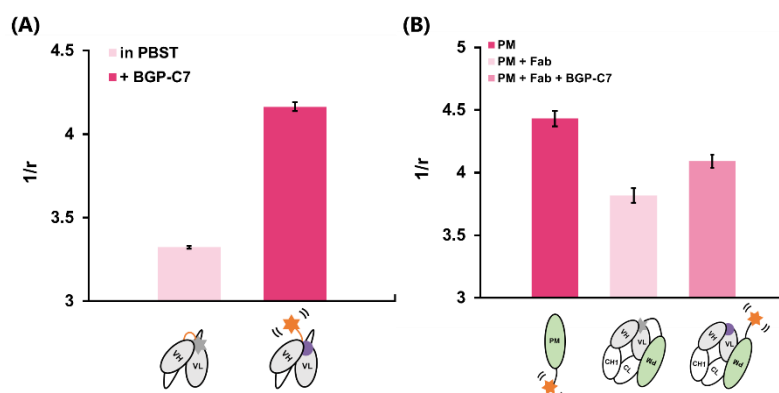


Fig. 1. (A) Antigen BGP-C7 dependent change in  $1/r$  of BODIPY-TMR labeled scFv Q-body. (B) Change of  $1/r$  of BODIPY-TMR labeled PM Q-probe upon adding X nM Fab and  $1\ \mu\text{M}$  BGP-C7 antigen.

1) H. Ohashi *et al.*, *Bioconj. Chem.* **27**, 2248-2253 (2016)

2) J. Dong *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* **165**, 112425 (2020)

## 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<sup>1</sup>・瀬瀬宏也<sup>1</sup>・前田義昌<sup>1</sup>・林 泰圭<sup>2</sup>・原田 学<sup>2</sup>・吉野知子<sup>1</sup>  
・松永 是<sup>1</sup>・田中 剛<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京農工大院工、<sup>2</sup>株式会社マルコム)

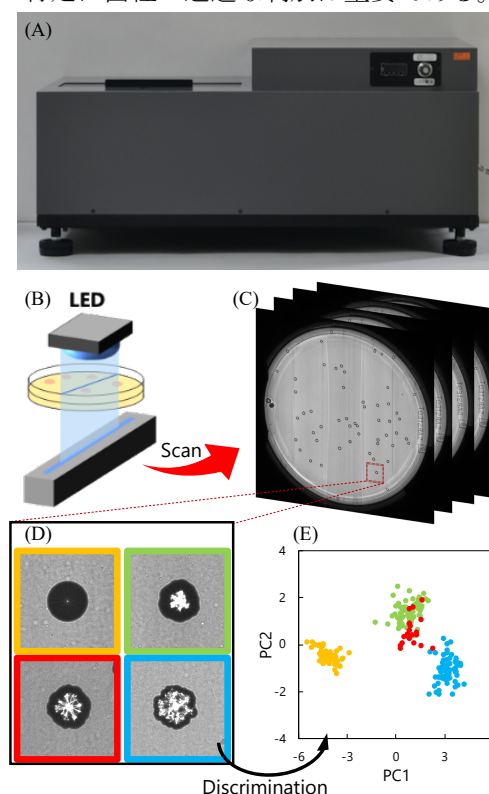
**Rapid Discrimination of Food-contaminated microorganisms based on Colony Fingerprinting using a Line Imaging Sensor** (Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology<sup>1</sup>, Malcom Co., Ltd<sup>2</sup>)  
TANAKA, Yusuke<sup>1</sup>; KOHKETSU, Hiroya<sup>1</sup>; MAEDA, Yoshiaki<sup>1</sup>; LIM, Tae-Kyu<sup>2</sup>; HARADA, Manabu<sup>2</sup>; YOSHINO, Tomoko<sup>1</sup>; MATSUNAGA, Tadashi<sup>1</sup>; TANAKA, Tsuyoshi<sup>1</sup>

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<sup>1)</sup>(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<sup>2</sup>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。

1) Y. Maeda, Y. Sugiyama, A. Kogiso, T. K. Lim, M. Harada, T. Yoshino, T. Matsunaga, T. Tanaka, *Sensors*, **18**, 9 (2018).



**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.



## 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<sup>1</sup>・中島菜月<sup>1</sup>・長江拓也<sup>1</sup>・佐藤良勝<sup>2</sup>・東山哲也<sup>2,3</sup>・多喜正泰<sup>2</sup>・山口茂弘<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>名大院理、<sup>2</sup>名大 ITbM、<sup>3</sup>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<sup>1</sup>, Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University<sup>2</sup>, Graduate School of Science, The University of Tokyo<sup>3</sup>) SAKAI, Yuki<sup>1</sup>; NAKASHIMA, Natsuki<sup>1</sup>; NAGAE, Takuya<sup>1</sup>; SATO, Yoshikatsu<sup>2</sup>; HIGASHIYAMA, Tetsuya<sup>2,3</sup>; TAKI, Masayasu<sup>2</sup>; YAMAGUCHI, Shigehiro<sup>1,2</sup>

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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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。

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。

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。

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

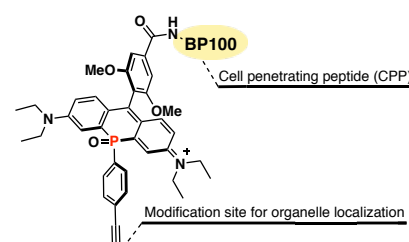


Fig 1. Structure of BP100-PREX710-CCH.

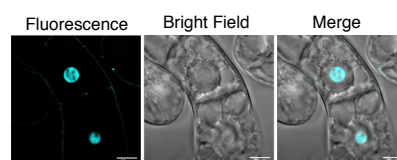


Fig 2. Fluorescence microscopy images of BY-2 cells incubated with BP100-PREX710-CCH.

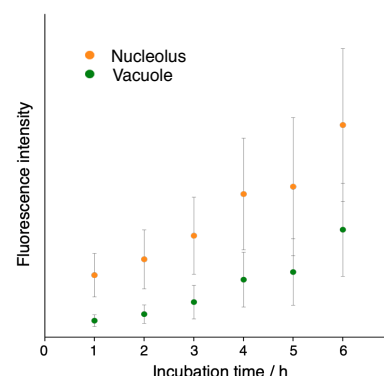


Fig 3. Comparison of time variation of fluorescence intensity in nucleolus (orange) and vacuole (green) of BY-2 cells incubated with BP100-PREX710-CCH.

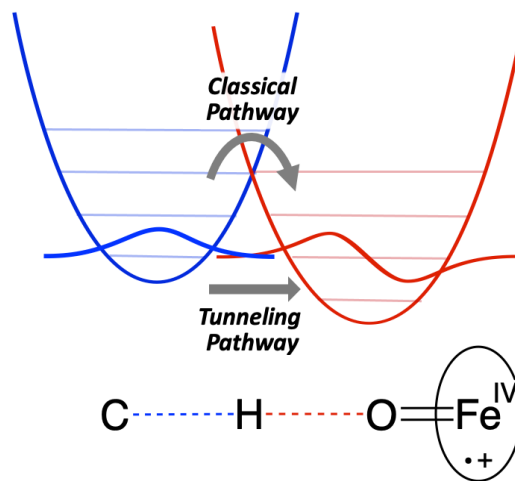
## Compound I モデル錯体を用いたアルカンの酸化過程における トンネル効果の寄与

○森本祐麻<sup>1</sup>・福井晃佑<sup>1</sup>・藤井 浩<sup>2</sup>・伊東 忍<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大院工、<sup>2</sup>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<sup>1</sup>, Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University<sup>2</sup>)  
MORIMOTO, Yuma<sup>1</sup>; FUKUI, Kosuke<sup>1</sup>; FUJII, Hiroshi<sup>2</sup>; ITOH Shinobu<sup>1</sup>

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<sup>1</sup>。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  $Fe^{IV}(O)(Cl)(L_1)^{•+}$  ( $L_1$  = 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<sup>2</sup>。またこの系を発展させ、非常に酸化活性の高い  $Fe^{IV}(O)(Cl)(L_n)^{•+}$  ( $L_2$  = 5,10,15,20-tetradichlorophenylporphyrin dianion,  $L_3$  = 5,10,15,20-tetratrachlorophenylporphyrin 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  $Fe^{IV}(O)(Cl)(L_1)^{•+}$  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.



## 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, Yusukey; 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。

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は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。

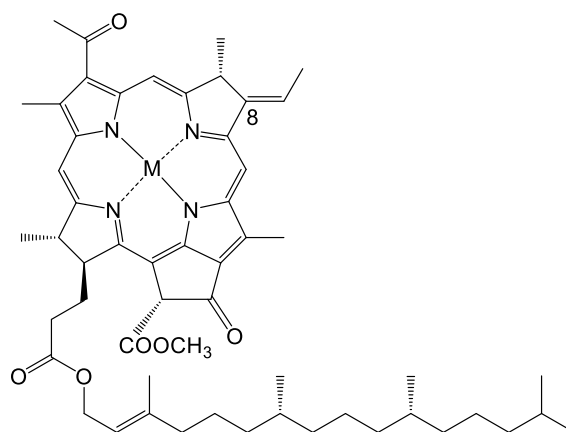


Fig.1. Molecular structures of BChl *b* (M=Mg) and BPhe *b* (M=2H) in purple photosynthetic bacteria.

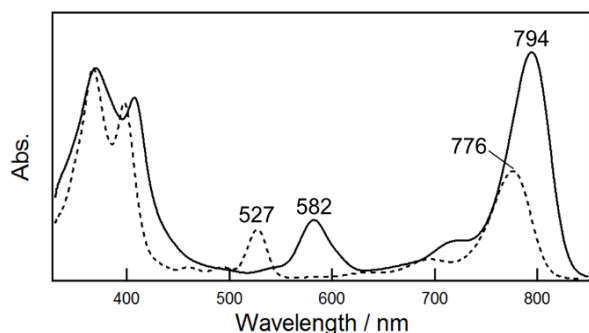


Fig.2. Electronic absorption spectra of BChl *b* (solid curve) and BPhe *b* (broken curve).

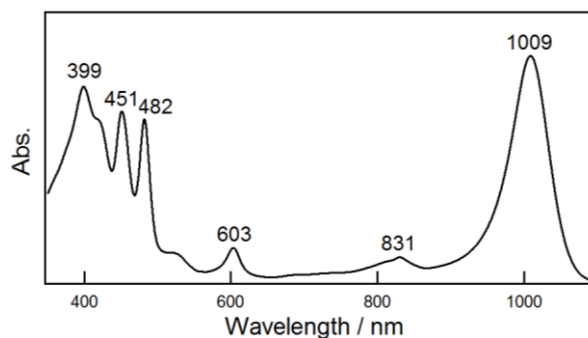


Fig.3. Electronic absorption spectrum of LH1-RC complex of *Blc. viridis*.

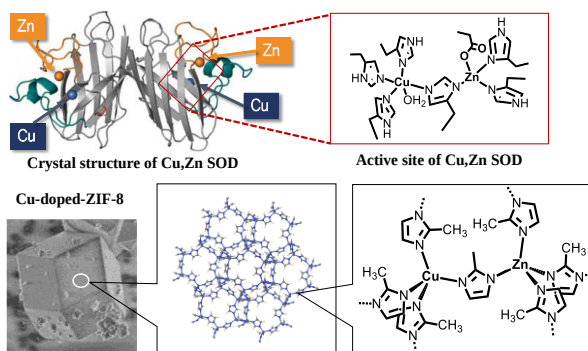
## 抗酸化酵素 Cu, Zn-SOD の活性部位に類似した構造を多数有する抗酸化ナノザイムの開発

○中原寛樹・岡村麻美・野村章子・小寺政人・人見穰（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( $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ )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。

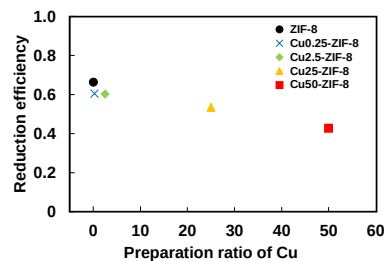
一つのナノ粒子内に多数の SOD 活性部位を導入できれば、全体として優れた SOD 活性を示すと考えた。本研究では、2-メチルイミダゾールと亜鉛イオンから構成される金属有機構造体 ZIF-8 の亜鉛イオンの一部を銅イオンで置換した Cu-doped ZIF-8 に着目した<sup>1)</sup>。2つの亜鉛イオンがアニオン状態にある 2-メチルイミダゾレートによって架橋されることで形成される ZIF-8 の亜鉛イオンの一部を銅イオンに置換することで、酵素 SOD の中でも最も活性な Cu,Zn-SOD の活性中心と類似の構造となる(Fig. 1)。また、ZIF-8 は多孔質材料であることから、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  $\text{O}_2^-$  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  $\text{O}_2^-$  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、 $\text{O}_2^-$  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.

## 多量化するヒト触媒抗体軽鎖の会合挙動

○酒井 隆裕<sup>1</sup>・Wahyu Fitriana<sup>1</sup>・真島 剛史<sup>1</sup>・小林 直也<sup>1</sup>・一二三 恵美<sup>2</sup>・宇田 泰三<sup>3</sup>・廣田 俊<sup>1</sup> (<sup>1</sup>奈良先端大先端科技物質、<sup>2</sup>大分大全学研究推進機構、<sup>3</sup>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<sup>1</sup>, Research Promotion Institute, Oita University<sup>2</sup>, Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies<sup>3</sup>) SAKAI, Takahiro<sup>1</sup>; WAHYU, Fitriana<sup>1</sup>; MASHIMA, Tsuyoshi<sup>1</sup>; KOBAYASHI, Naoya<sup>1</sup>; HIFUMI, Emi<sup>2</sup>; UDA, Taizo<sup>3</sup>; HIROTA, Shun<sup>1</sup>

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

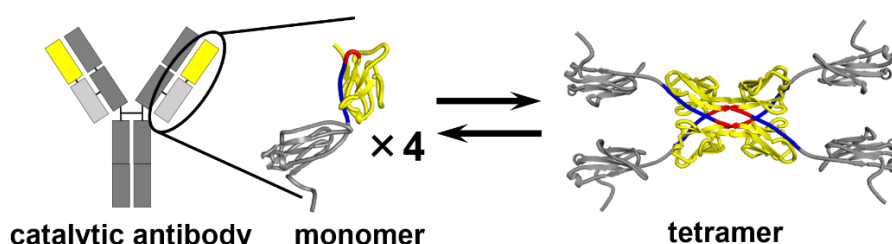


Fig 1. Scheme diagram of equilibrium between monomeric and tetrameric forms of catalytic antibody light chain #4C220A.

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、軽鎖部分が多量化することで触媒活性が向上したもの<sup>2)</sup>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。

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℃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、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℃で 4 量体から単量体への解離平衡定数を求めると、 $2.8 \times 10^{-16} (\text{M}^3)$  と算出された。

次に、4~45℃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<sup>3)</sup>。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 は疎水の相互作用により 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。

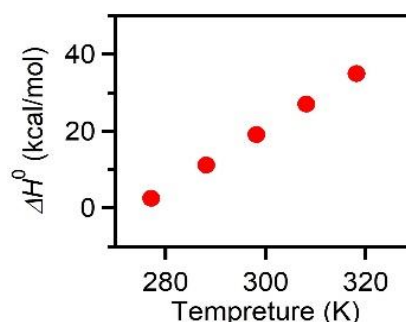


Fig 2. Plots of  $\Delta H^\circ$  vs. temperature for the dissociation of #4C220A tetramer to monomers.

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<sup>1</sup>・吉永萌華<sup>1</sup>・寺正行<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東農工大院工)

**Double Click Reagent Directed to Cell Surface** (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology<sup>1</sup>) KITAGAWA, Kohei<sup>1</sup>; YOSHINAGA, Moeka<sup>1</sup>; TERA, Masayuki<sup>1</sup>

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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup> (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<sup>4)</sup>。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。

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<sub>4</sub>ManNAz) をヒ

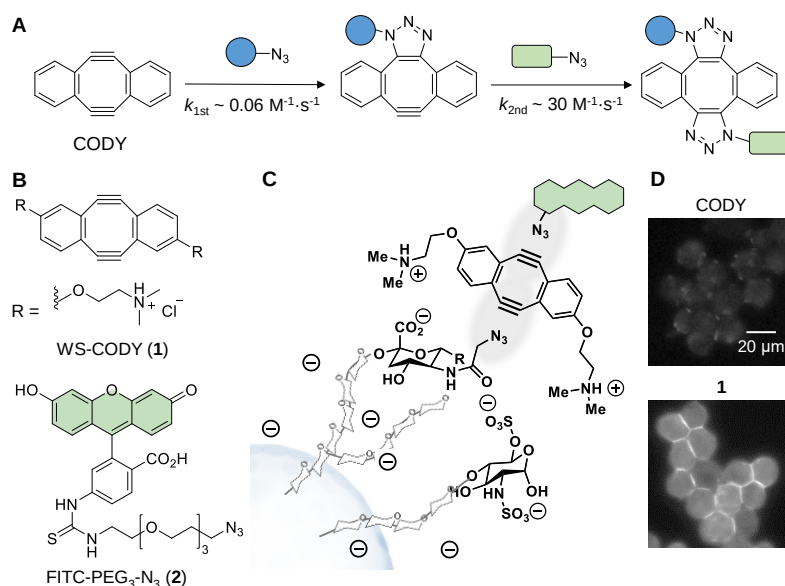


Fig. 1 (A) Double SPAAC reaction by CODY. (B) Chemical structure of WS-CODY (**1**) and FITC-PEG<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (**2**). (C) Schematic illustration of cell-surface directing click reaction. (D) Fluorescent imaging of azido labelled PC-9 cells stained with CODY or **1** and **2**.

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<sup>5)</sup>。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<sub>3</sub>-N<sub>3</sub> (**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)



## 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<sup>1</sup>・稲葉央<sup>1</sup>・佐々木善浩<sup>2</sup>・秋吉一成<sup>2</sup>・松浦和則<sup>1</sup> (<sup>1</sup>鳥取大院工、<sup>2</sup>京大院工)

**Invasion of enveloped artificial viral capsid into cells via membrane fusion** (Graduate School of Engineering, Tottori University<sup>1</sup>, Graduate School of Engineering, Kyoto University<sup>2</sup>) FURUKAWA, Hiroto<sup>1</sup>; INABA, Hiroshi<sup>1</sup>; SASAKI, Yoshihiro<sup>2</sup>; AKIYOSHI, Kazunari<sup>2</sup>; MATSUURA, Kazunori<sup>1</sup>

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關与する 24 残基 $\beta$ -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<sup>1)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>。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。

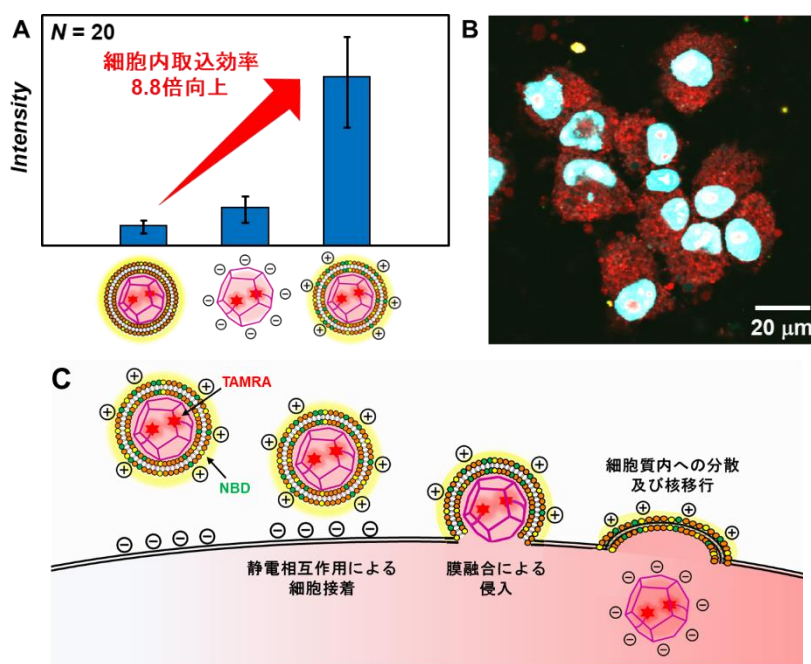


Fig 3. 蛍光修飾エンベロープ型キャプシドの(A)細胞内取込評価及び(B) CLSM 像、(C)膜融合を介した細胞内部への取込過程の模式図

- 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)



## 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 $^{19}\text{F}$ MRI 造影剤の開発

○小西祐輝<sup>1)</sup>、杉原文徳<sup>2, 3)</sup>、菱島維文<sup>1)</sup>、長池航<sup>4)</sup>、内橋貴之<sup>4)</sup>、菊地和也<sup>1, 2, 5)</sup> ( <sup>1)</sup> 阪大院工、<sup>2)</sup> 阪大 IFRcC、<sup>3)</sup> 阪大微研、<sup>4)</sup> 名大院理、<sup>5)</sup> 阪大 QIQB)

### Development of Perfluorocarbon-encapsulated Polymer Nanoparticle as $^{19}\text{F}$ MRI Contrast Agents

(Graduate School of Engineering<sup>1</sup>, Immunology Frontier Research Center<sup>2</sup>, Research Institute for Microbial Diseases<sup>3</sup>, Osaka University, Graduate School of Science, Nagoya University<sup>4</sup>, Center for Quantum Information and Quantum Biology<sup>5</sup>, Osaka University) KONISHI Yuki<sup>1</sup>; SUGIHARA Fuminori<sup>2, 3</sup>; MINOSHIMA Masafumi<sup>1</sup>; NAGAIKE Wataru<sup>4</sup>; UCHIHASHI Takayuki<sup>4</sup>; KIKUCHI Kazuya<sup>1, 2, 5</sup>

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  $^{19}\text{F}$  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  $^{19}\text{F}$  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、 $^{19}\text{F}$  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  $^{19}\text{F}$  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<sup>[1]</sup>。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  $^{19}\text{F}$  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  $^{19}\text{F}$  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<sup>[2]</sup>、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  $^{19}\text{F}$  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。 $^{19}\text{F}$  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 $^{19}\text{F}$  MRI<sup>[3]</sup>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。

【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.

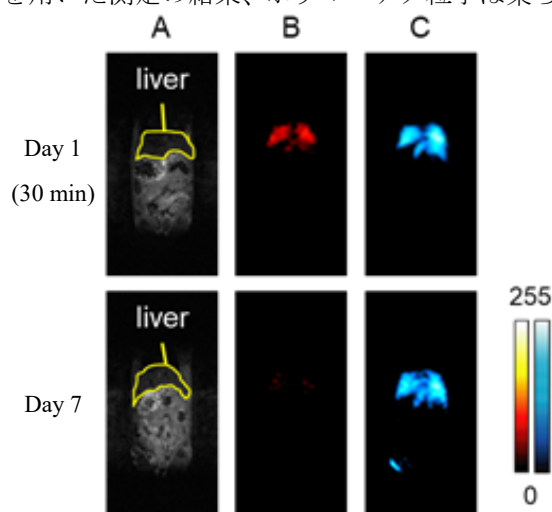


図 造影剤を投与したマウスの MR 像

A:  $^1\text{H}$  MRI, B:  $^{19}\text{F}$  MRI (ポリマーナノ粒子),  
C:  $^{19}\text{F}$  MRI (シリカナノ粒子)

## 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

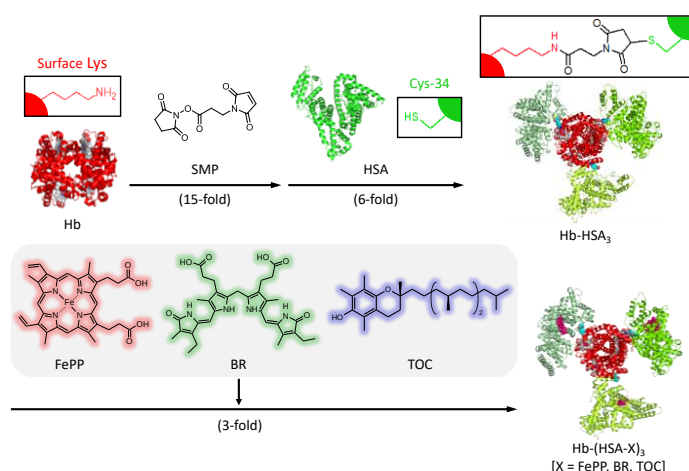
○石丸真里花・山田大雅・小松晃之(中央大理工)

**Synthesis of Hemoglobin-Albumin Cluster Incorporating Antioxidant Reagents** (Faculty of Science and Engineering, Chuo University) ISHIMARU, Marika; YAMADA, Taiga; KOMATSU, Teruyuki

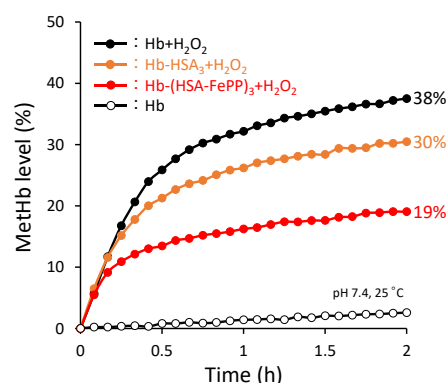
少子高齢化に伴う献血者層人口の減少により、輸血液不足が懸念され始めている。当研究室では、酸素輸送タンパク質であるヘモグロビン(Hb)の分子表面に血漿タンパク質であるヒト血清アルブミン(HSA)を結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA<sub>3</sub>)を合成し、それが生体内で酸素輸送のできる人工酸素運搬体(赤血球代替物)として機能することを明らかにした<sup>1)</sup>。しかし、人工酸素運搬体のHb部位は生体内で徐々に自動酸化し、酸素輸送能を失う。一方、HSAは様々な疎水性物質を貯蔵・運搬する多分子結合能を持つ。もし、Hb-HSA<sub>3</sub>のHSA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<sub>3</sub>に抗酸化能を有するFe(III) protoporphyrin(FePP)、bilirubin(BR)、 $\alpha$ -tocopherol(TOC)を担持したHb-(HSA-X)<sub>3</sub> [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<sub>3</sub>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<sub>3</sub>を単離した。次に、Hb-HSA<sub>3</sub>に3倍モル量のFePPを滴下し、Hb-(HSA-FePP)<sub>3</sub>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<sub>3</sub>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-BR)<sub>3</sub>、Hb-(HSA-TOC)<sub>3</sub>を調製し、HSA部位への結合を確認した。

過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)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-X)<sub>3</sub>の酸素錯体安定性を測定した。生体内のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度は0~35  $\mu$ Mであるため<sup>2)</sup>、10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水溶液中における酸素錯体安定性を評価した。Hb-(HSA-FePP)<sub>3</sub>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<sub>3</sub>の酸化率(30%)の2/3に減少した(Fig. 2)。一方、Hb-(HSA-BR)<sub>3</sub>とHb-(HSA-TOC)<sub>3</sub>の酸素錯体安定性はHb-HSA<sub>3</sub>と変わらなかった。HSA-FePPはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>不均化触媒として機能することから、Hb-(HSA-FePP)<sub>3</sub>の(HSA-FePP)<sub>3</sub>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-FePP)<sub>3</sub>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-X)<sub>3</sub> [X = FePP, BR, TOC].



**Fig. 2** Time course of metHb level of Hb-(HSA-FePP)<sub>3</sub> ([Hb]=10  $\mu$ M, 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

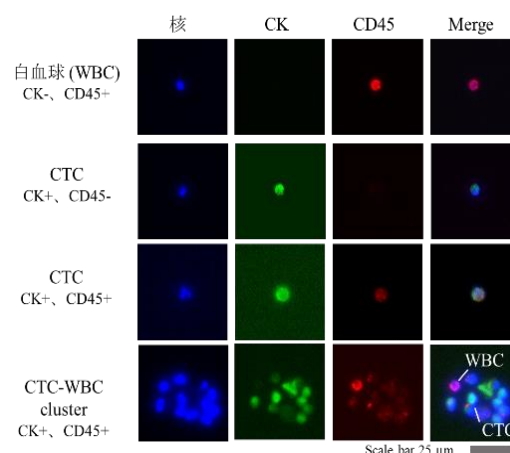
○中澤胡桃<sup>1</sup>・根岸諒<sup>1</sup>・桶川隆嗣<sup>2</sup>・中村雄<sup>2</sup>・出来真弓<sup>2</sup>・渡邊碧<sup>1</sup>・田中剛<sup>1</sup>・吉野知子<sup>1</sup>(1東京農工大院工、<sup>2</sup>杏林大医学部附属病院泌尿器科)

**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<sup>1</sup>, Department of Urology, Kyorin University School of Medicine<sup>2</sup>) NAKAZAWA, Kurumi<sup>1</sup>; NEGISHI, Ryo<sup>1</sup>; OKEGAWA Takatsugu<sup>2</sup> NAKAMURA Yu<sup>2</sup>; DEKI Mayumi<sup>2</sup>; WATANABE Midori<sup>1</sup>; TANAKA Tsuyoshi<sup>1</sup>; YOSHINO Yomoko<sup>1</sup>

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<sup>1)</sup>。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、近年の膀胱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。

1) T. Yoshino et al., *Anal. Chem.*, 88, 7230-7237 (2016)



**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.