

ポスター発表(1日目)

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

■ 奇数 (1P-001~1P-047)

[1P-001] 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、Campbell Robert^{1,2} (1. 東京大学大学院理学系研究科化学専攻、2. アルバータ大学化学科)

[1P-003] 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¹、高 夏海¹、吉田 亘¹ (1. 東京工科大院バイオニクス)

[1P-005] 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

*寛 翔太¹、瀬古 健太¹、三木 卓幸¹、三原 久和¹ (1. 東京工業大学生命理工学院)

[1P-007] 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. 同志社女子大学薬学部、2. 山形大学大学院IPGE)

[1P-009] 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. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 名古屋大学ナノライフシステム研究所、3. 東京大学大学院工学系研究科、4. 東京大学先端科学技術センター)

[1P-011] 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¹、小林 利沙子¹、稲葉 央¹、松浦 和則¹ (1. 鳥取大院工)

[1P-013] 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¹、岡本 航¹、長谷川 舞¹、森田 能次¹、小松 晃之¹ (1. 中央大学理工学部)

[1P-015] 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. 東京工業大学生命理工学院、2. 九州大学、3. 名古屋大学)

[1P-017] 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¹、安田 貴信¹、朱 博²、北口 哲也²、上田 宏² (1. 東京工業大学 生命理工学院、2. 東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所)

[1P-019] 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. 九州大学工学府、2. 北陸先端科学技術大学院大学)

[1P-021] 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. 名古屋大学工学研究科、2. 京都大学工学研究科)

[1P-023] 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¹、有安 真也¹、唐澤 昌之¹、Stanfield Joshua Kyle¹、横山 侑弥¹、笠井 千枝¹、愛場 雄一郎¹、荘司 長三¹ (1. 名古屋大学大学院理学研究科)

[1P-025] 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. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 名古屋大学未来社会創造機構ナノライフシステム研究所)

[1P-027] 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. 名古屋工業大学大学院工学研究科、2. 自然科学研究機構基礎生物学研究所、3. 京都大学iPS細胞研究所)

[1P-029] 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¹、石井 俊宏¹、松本 隆聖¹、丸毛 智史¹、藤枝 伸宇¹ (1. 阪府大院生環)

[1P-031] 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 (1. 京都大学大学院工学研究科)

[1P-033] 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. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 東京大学大学院新領域創成科学研究科)

[1P-035] 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、森 健^{1,2}、岸村 顕広^{1,2}、片山 佳樹^{1,2} (1. 九州大学システム生命科学府、2. 九州大学大学院工学研究科)

[1P-037] 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¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)

[1P-039] 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¹、加藤 俊介¹、林 高史¹ (1. 大阪大学大学院工学研究科)

[1P-041] 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¹ (1. 大阪大学大学院工学研究科)

[1P-043] 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 Yiuno¹、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)

[1P-045] 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)

[1P-047] 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. 富山大学大学院理工学教育部、2. 富山大学大学院生命融合科学教育部)

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 Tokyo¹, Department of Chemistry, University of Alberta²) KADOYA, Hayato¹; NASU, Yusuke¹; TERAI, Takuya¹; 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、Ca²⁺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 Ca²⁺センサーの開発 (Fig. 1A) を目的とした。

PYP に Ca²⁺応答性を付与するため、Ca²⁺感知ドメインである CaM-RS20 ペプチドを PYP 中の 10 箇所（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、Ca²⁺依存性の蛍光応答を *in vitro* で評価した。Ca²⁺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、Ca²⁺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 Ca²⁺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 Ca²⁺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 Ca²⁺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。

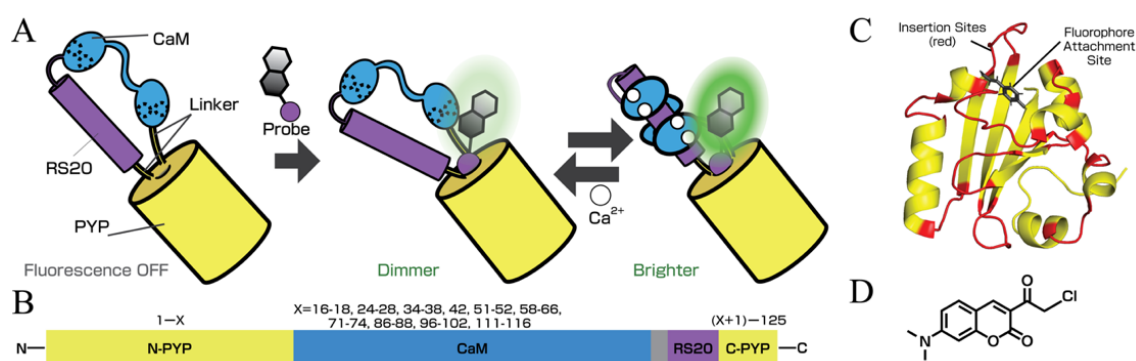


Figure 1. (A) Schematic of fluorogenic chemi-genetic indicator. (B) Topology of prototype indicator. (C) Crystal structure of PYP (PDB ID: 2ZOI) with labelled insertion sites (red), and fluorophore attachment site (black). (D) Chemical structure of fluorogenic probe DMAC-CMK.

- 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).

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・高 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)

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

○寛 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。10⁹ 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。

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。

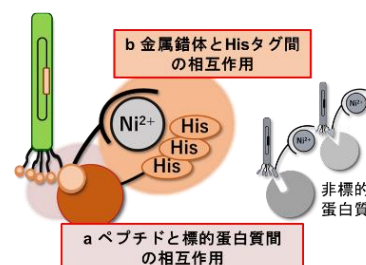


図 1. Ni(II)錯体と His タグの相互作用を組み込んだファージディスプレイ法

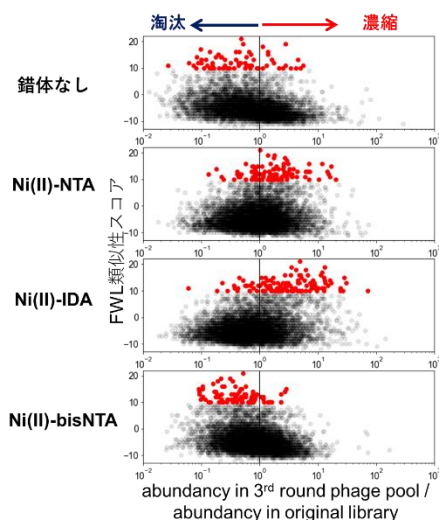


図 2. 各錯体修飾時のペプチドの存在比変化

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 (¹Doshisha Women's University, ²Yamagata University) AOKI, Saki¹; TURUTA Midori¹; HOSOI Sakura¹; MASHIMO Masato¹; SUGIMOTO, Kayo¹; HAMORI Mami¹; FURUSAWA Hiroyuki²; NEGI Shigeru¹

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。

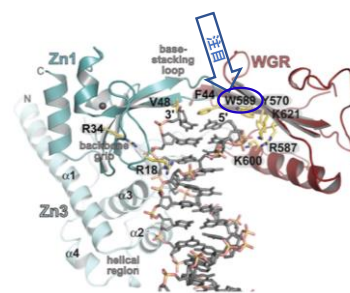


Fig 1. X-ray structure of PARP-1-DSB DNA complex.

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 University¹, Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University², Graduate School of Engineering, The University of Tokyo³, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo⁴) Nakatsu, Koki¹; Murakami, Hiroshi^{1,2}; Hayashi, Gosuke¹; 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起こない、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.)。

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.

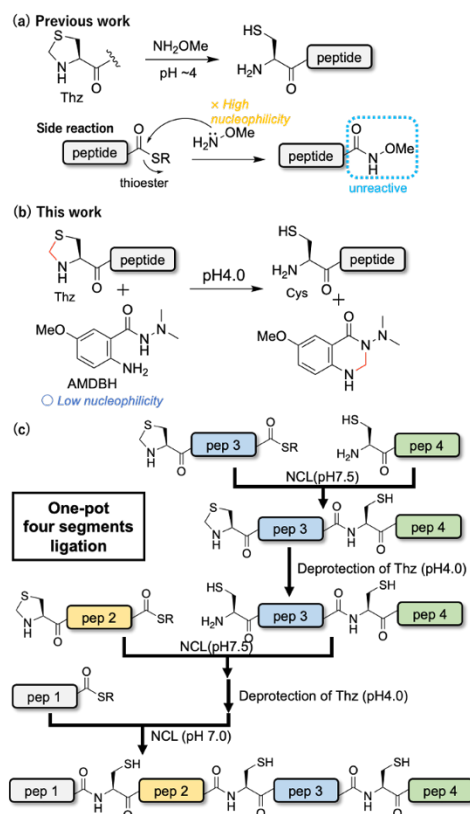


Fig 1. (a) Thz deprotection by methoxyamine. (b) Thz deprotection by AMDBH. (c) Scheme for One-pot four segments ligation.

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（鳥取大理工）

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)。

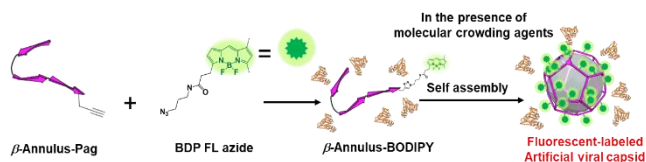


Figure 1. Construction of BODIPY-labeled artificial virus capsid in the presence of molecular crowding agents.

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 (INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVG-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 μ M β -Annulus-BODIPY が 60 nm 程度の球状集合体を形成することを動的分散光(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% PEG₂₀₀₀、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。

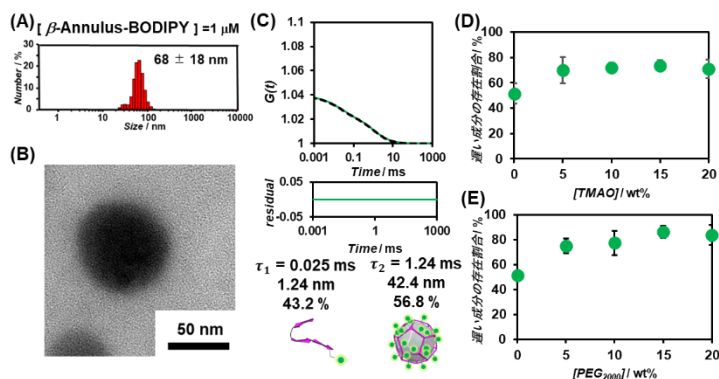


Figure 2. (A) DLS size distribution, (B) TEM image stained with EM stainer, (C) diffusion time and apparent size obtained from FCS autocorrelation function curve in phosphate buffer, (D,E) Effect of (D)TMAO, (E)PEG contents on the ratio of artificial viral capsids at [β -Annulus-BODIPY] = 1 μ M.

- 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)

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 O₂ Affinity Control of Recombinant Human Hemoglobin Nanoparticles (*Faculty of Science and Engineering, Chuo University*) KOBAYASHI, Tatsuhiko; 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- β 28 を Phe に置換した組換えヒトヘモグロビン rHb(β L28F)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(β L28F)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(β L28F)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, β L28F) 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(β L28F)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 β L28F 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(β L28F)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。

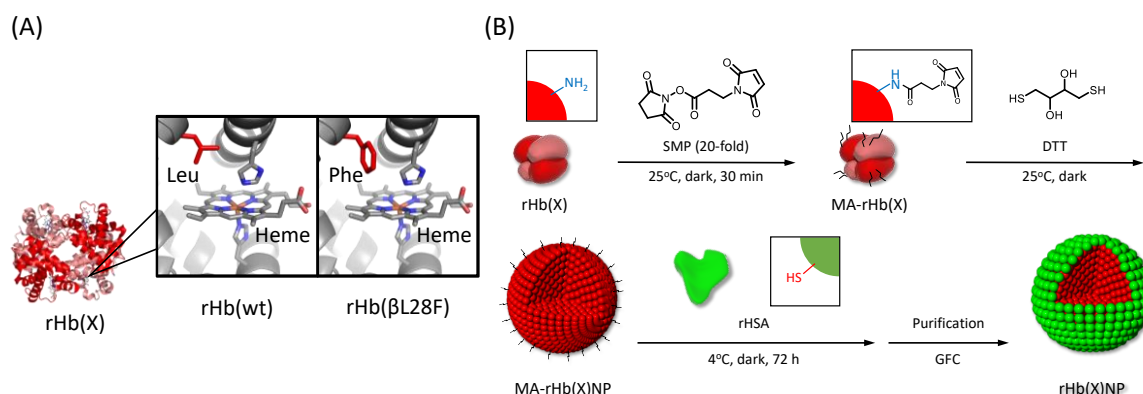


Fig. 1 (A) Structure of rHb(X) (X= wt, β L28F). (B) Synthesis of rHb(X)NP.

1) C. Ho, *et al.*, *Biochemistry*, **2005**, *44*, 7207.

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 Technology¹, Department of Physics, Kyusyu University², Department of Physics, Nagoya University³) KIKUCHI, Kosuke¹; FUKUYAMA, Tatsuya²; UCHIHASHI, Takayuki³; FURUTA, Tadaomi¹; MAEDA, T. Yusuke²; UENO, Takafumi¹

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)。

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

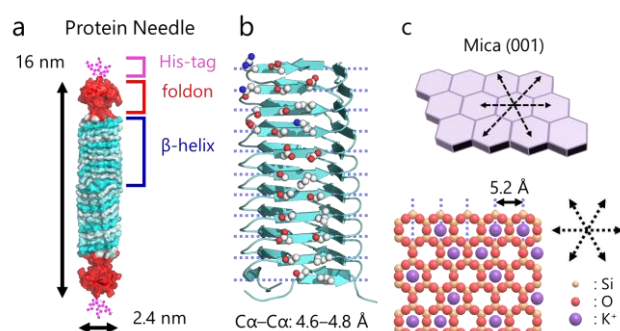


Fig 1. (a) Artificial protein needle (PN). Both the PN β -helix (b) and the mica (c) has hydrophilic and ordered lattices.

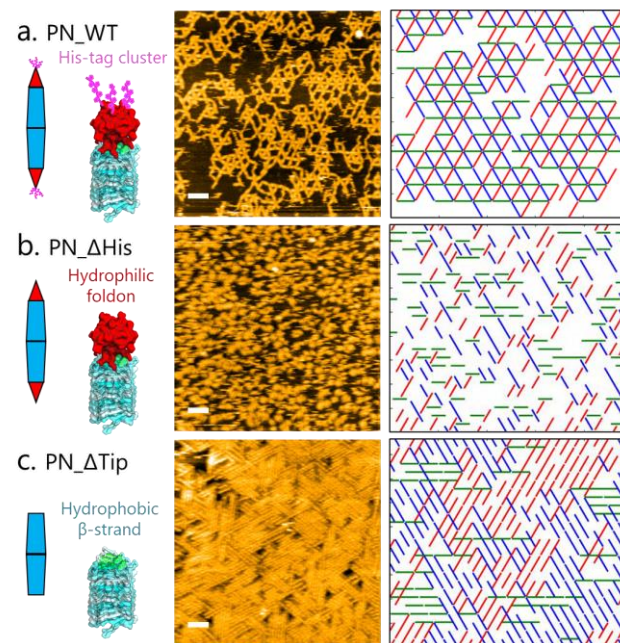


Figure 2 | The two-dimensional assembly patterns of PNs. (a) PN_WT formed triangle lattice. (b) PN_ΔHis showed nematic alignments. (c) PN_ΔTip formed straight fibers. The HS-AFM observation results (middle column) and MC simulation results (right column) showed good agreements. Scale bars are 50 nm (middle).

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 Technology¹, Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology²) NING, Xuerao¹; YASUDA, Takanobu¹; ZHU, Bo²; KITAGUCHI, Tetsuya²; UEDA, Hiroshi²

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 probe¹⁾. 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 antibody²⁾, a Fab-type Q-body that can detect C-terminally His-tagged recombinant protein in 50% culture medium was constructed³⁾. 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.

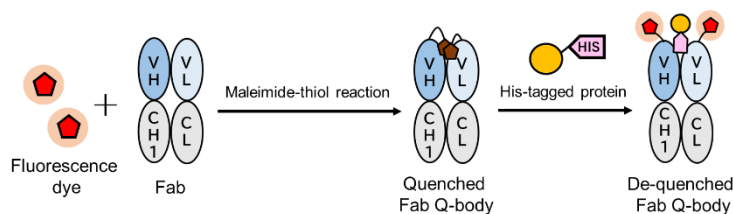


Fig. 1. Construction and reaction of Fab-type His Q-body

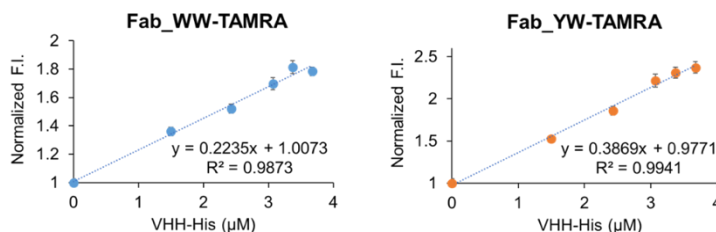


Fig. 2. Correlation between the signal of TAMRA-labeled Fab Q-body and the concentration of secreted anti-SARS-CoV-2 V_{HH}-His in *Brevibacillus* bioprocess.

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)

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 (¹Graduate School of Engineering, Kyushu University, ²JAIST) UCHIDA, Kazuki¹; ODAYASHI, Hiroki¹; MINAMIHATA, Kosuke¹; WAKABAYASHI, Rie¹; GOTO, Masahiro¹; SHIMOKAWA, Naofumi²; TAKAGI Masahiro²; KAMIYA, Noriho¹)

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-G₃SRHK もしくは Oleyl-G₃SRHK 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

与していると考えられた。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, vii)。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。

1) K. Simons *et al.*, *Nature*, **387**, 569–572 (1997)

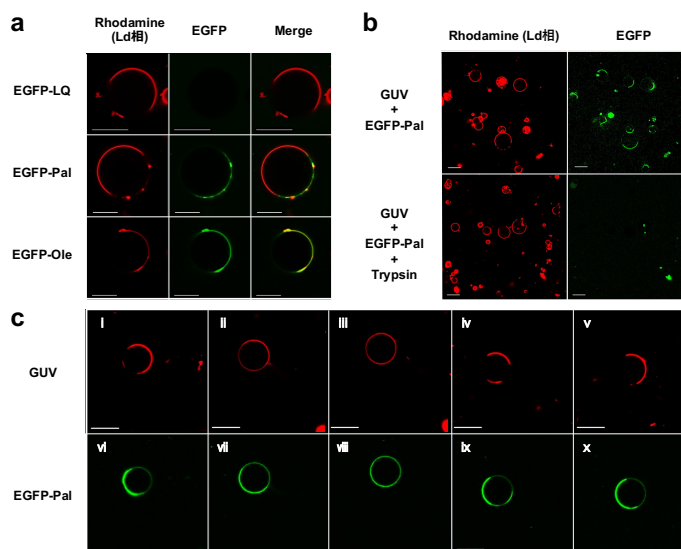


Fig. 1 CLSM images of GUVs added with EGFP-LQ or EGFP-lipids. **(a)** EGFP-LQ, EGFP-Pal, and EGFP-Ole added to GUVs; **(b)** EGFP-Pal added to GUVs before and after the addition of Trypsin; **(c)** Lateral diffusion of EGFP-Pal on GUVs in response to temperature rise (i → iii, v → vii) and fall (iii → v, vii → x) (bars: 10 μm)

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 A_{2A} receptor from class A GPCR utilizing coordination chemogenetics (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Graduate School of Engineering, Kyoto University²) SUGAWARA, Takuto¹; TSUJIKAWA, Muneo²; MIURA, D, Yuta¹; SENOO, Akinobu¹; HAMACHI, Itaru²; KIYONAKA, Shigeki¹

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)

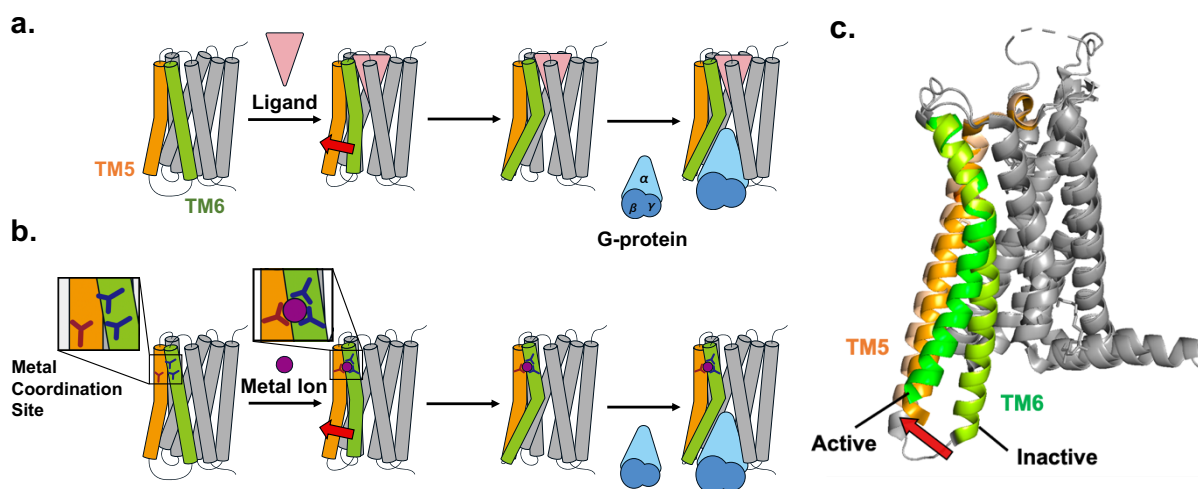


Fig 1. Schematic illustration of activation of A_{2A} receptor by endogenous ligand (a) and chemogenetic activation of A_{2A} receptor mutant by Cu(II) (b). (c) Conformational change associated with receptor activation. (PDB IDs : 3RFM, 5G53)

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・莊司長三（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, Yuuya; 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へム酵素であり、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

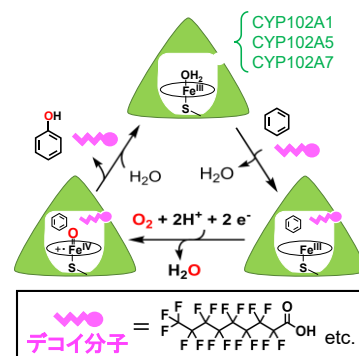


Fig. 1 基質誤認識システム.

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。

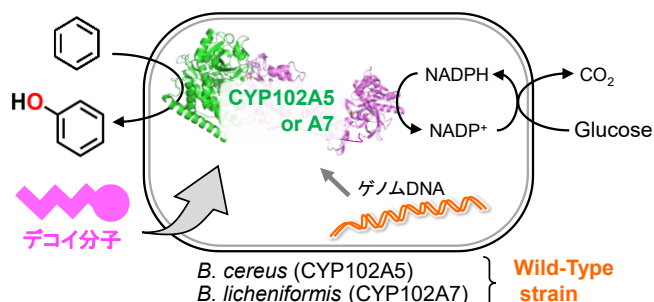


Fig. 2 *B. cereus* および *B. licheniformis* による菌体反応概念図.

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。

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による菌体反応では、デコイ分子 PFC9-L-Ala に対して認められた (Fig. 3)。この反応性は精製 CYP102A7 の CYP102A7 がデコイ分子に応答してベンゼンを水酸化した未知生成物の同定や CYP102A7 遺伝子ノックアウト

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).

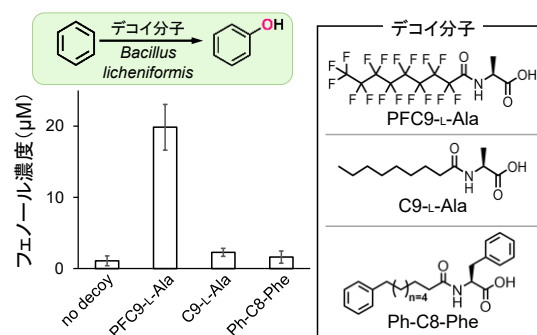


Fig. 3 *B. licheniformis* によるベンゼン水酸化反応.

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。

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 University¹, Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University².) UMEMOTO, Shun¹; SAIKI, Hikaru¹; KONDO, Taishi¹; FUJINO, Tomoshige¹; HAYASHI, Gosuke¹; 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.

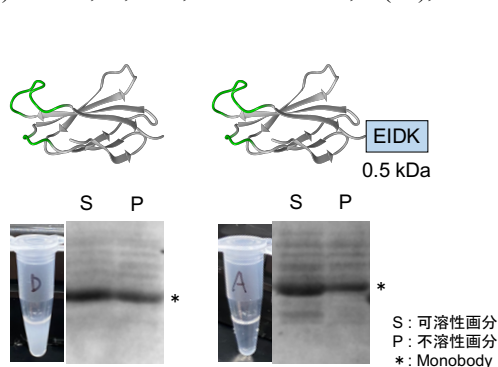


図1 C末端配列4残基分(EIDK)の付加による人工抗体Monobodyの可溶性の比較

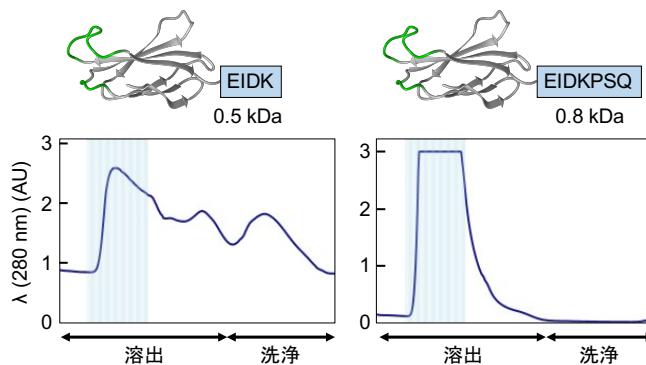


図2 C末端配列4残基分(EIDK)あるいは7残基分(EIDKPSQ)の付加による人工抗体Monobodyの精製クロマトグラム

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 Technology¹, National Institute for Basic Biology, National Institutes of Natural Sciences², Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University³) SUZUKI, Sachio¹; HATANO, Yuka¹; NAKAMURA, Akinobu²; YOSHIKAWA, Masaru¹; YOSHII, Tatsuyuki³; AOKI, Kazuhiro²; TSUKIJI, Shinya¹

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^DcTMP、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^DcTMP/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「iK6DHFR」を作製した（図 1b）^{4,5}。この iK6DHFR 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^DcTMP 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、Ca²⁺、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、iK6DHFR 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^DcTMP 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。

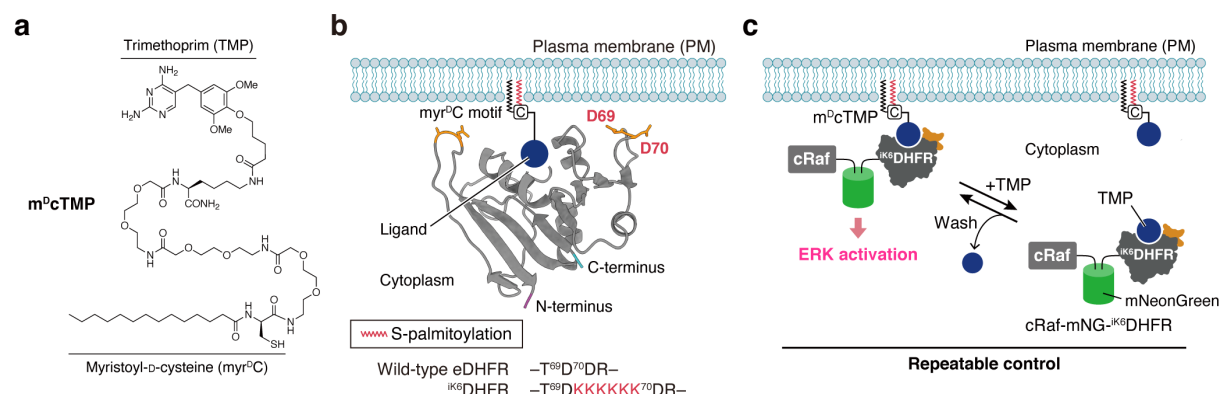


図 1 (a) m^DcTMP の化学構造。(b) 細胞膜上での分子配向に基づいた iK6DHFR の設計。

(c) m^DcTMP/iK6DHFR 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

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。

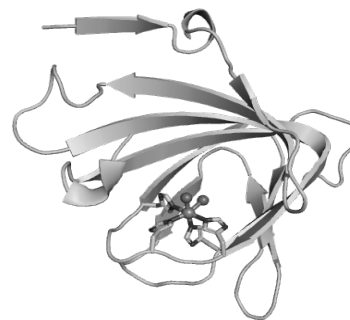


Fig 1. Cupin-type protein (TM1459)

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。

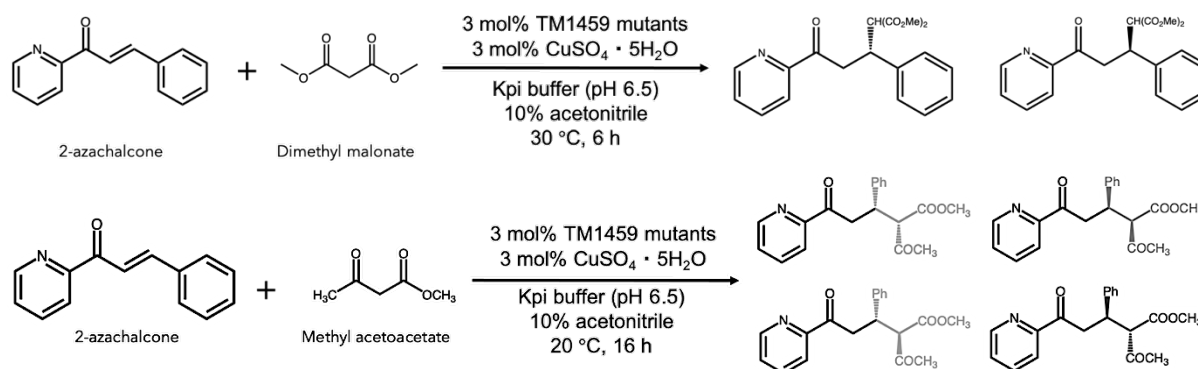


Fig 2. Model reactions employed in this study

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 Aricescu²・柚崎 通介^{3,4}・浜地 格^{1,4}

(¹京大院工、²MRC LMB、³慶應大医、⁴JST ERATO)

Identification of synaptic cleft-resident proteins with photo-proximity labeling (Graduate School of Engineering, Kyoto University¹, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge², Keio University School of Medicine³, ERATO, JST⁴) UTSUNOMIYA, Hayata¹; TAKATO, Mikiko¹; TAMURA, Tomonori¹; RADU, Aricescu²; 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る、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

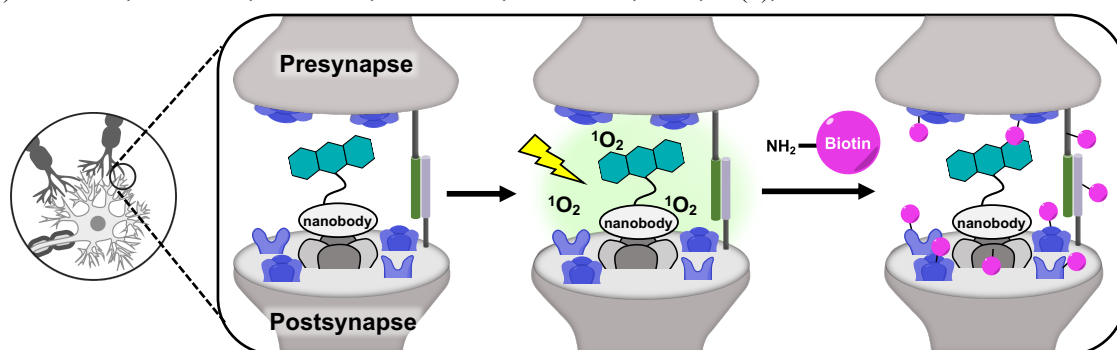


Fig. 1 Scheme of photo-proximity labeling in synaptic clefts

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 University¹, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo²) SASAHARA, Jun¹; SUZUKI, Atsuo¹; FUJIMOTO, Kazushi¹; OKAZAKI, Susumu²; HORI, Katsutoshi¹

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。

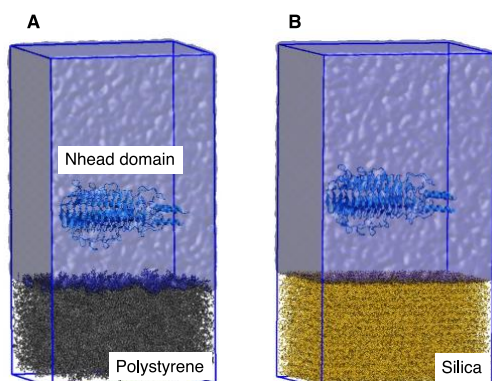


Fig. 1 Snapshots of computational systems. These systems were calculated to reproduce the phenomenon of adhesion in water. (A) Polystyrene. (B) Silica.

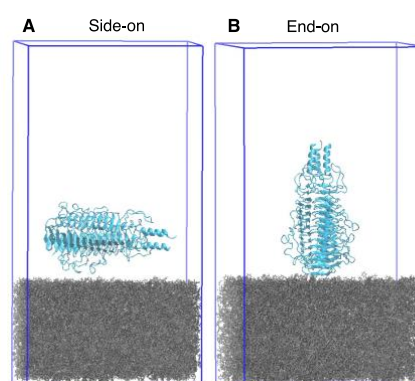


Fig. 2 Orientations of a protein. Water molecules and ions are not shown. (A) Side-on. (B) End-on.

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 University¹, Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University²) Hiroshi Tagawa¹, 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、Fc γ 受容体 (Fc γ R) 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 は抗体結合領域より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。

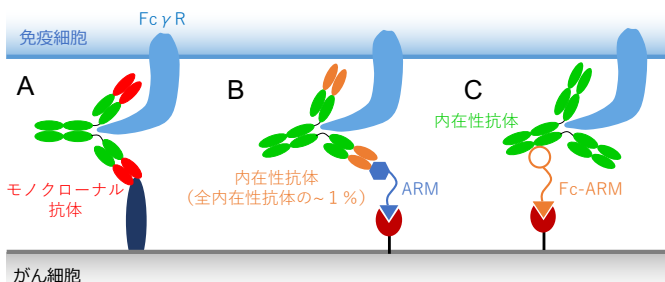


図 1 がん細胞への抗体の集積モデル

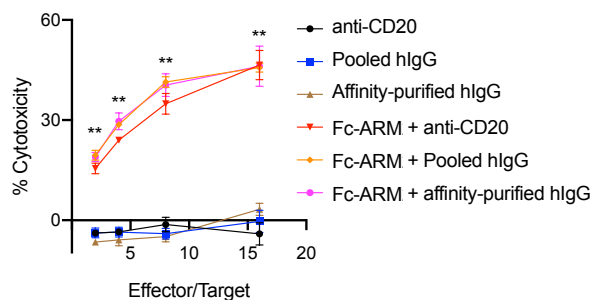


図 2 ADCC 誘導能評価

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-IIIc 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瘍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・富崎欣也（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-NH₂

(b) NLS-p : Ac-P-K-K-K-R-K-V-G-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-A-I-A-NH₂

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 °C 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 °C 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。

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

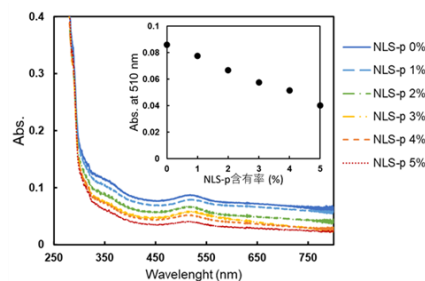


Fig. 2 NLS-p 割合 0%~5% における複合体の吸収スペクトル

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。

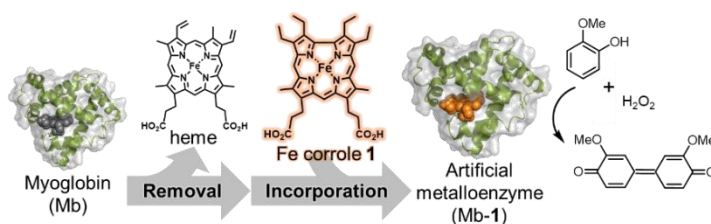


Fig 1. Preparation of artificial metalloenzyme using hemoprotein

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

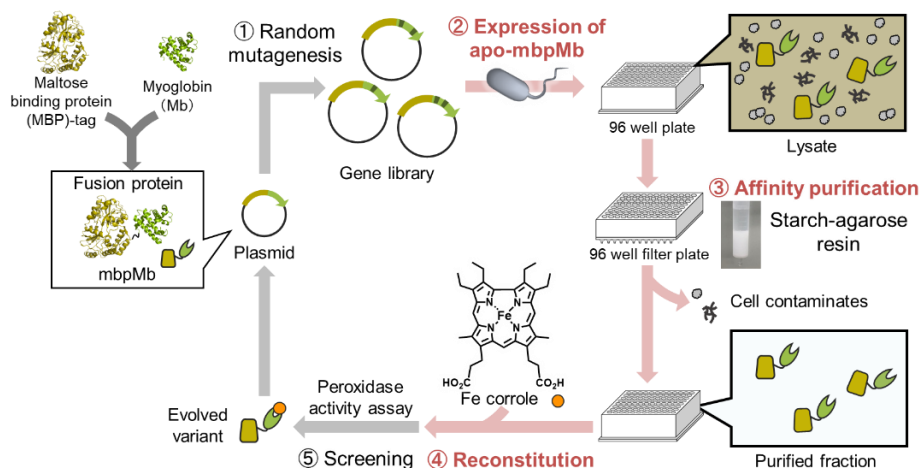


Fig 2. High-throughput screening platform that involves an affinity purification step

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。

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いる構造であり、 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。

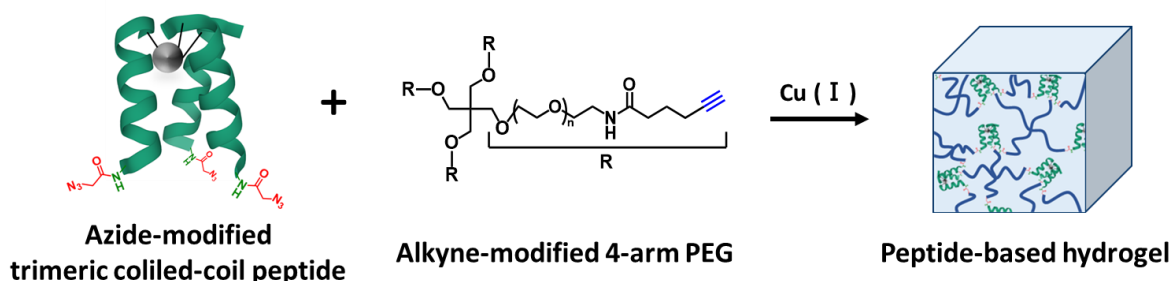


Fig 1. Schematic representation of the preparation for hydrogel cross-linked by trimeric coiled-coil peptides.

- 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 Yiuno¹・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、³CREST,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 University¹, Research Center for Material Science, Nagoya University², CREST, Japan Science and Technology Agency³, Institute for Glyco-core Research (iGCORE)⁴) NOMURA, Kohei¹; ONDA Kaoru¹, GAO Yiuno¹, MURASE Hirotaka¹, NAKAMOTO Kosuke¹, INAGAKI Masahito¹, HIRAOKA Haruka¹, ABE Naoko¹, HASHIYA Fumitaka², KIMURA Yasuaki¹, 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。

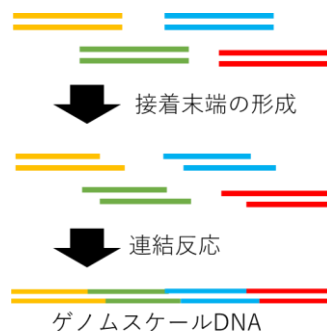


図 1 ゲノムスケール DNA の合成法

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。

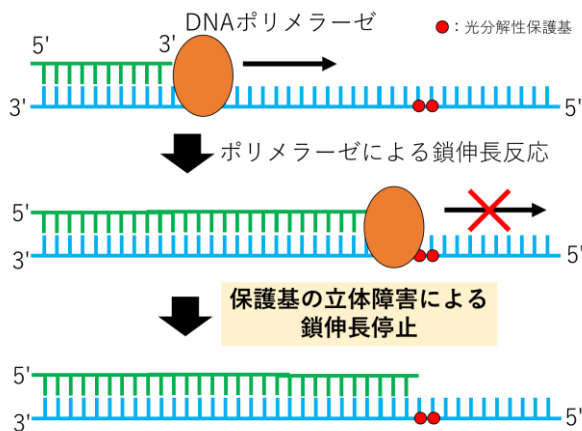


図 2 化学修飾の導入によるポリメラーゼによる DNA 鎖伸長の停止

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。

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 University¹; Institute for Chemical Research, Kyoto University²; Faculty of Science and Technology, Hirosaki University³) MATSUMOTO, Rio¹; KATSUDA, Yousuke¹; SATO, Shin-ichi²; KITAMURA, Yusuke¹; HAGIHARA, Masaki³; UESUGI, Motonari²; IHARA, Toshihiro¹

非標準構造 RNA G-quadruplex (RGq) は、 $G_3-N_1 \sim G_3-N_1 \sim G_3-N_1 \sim G_3$ (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。

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。

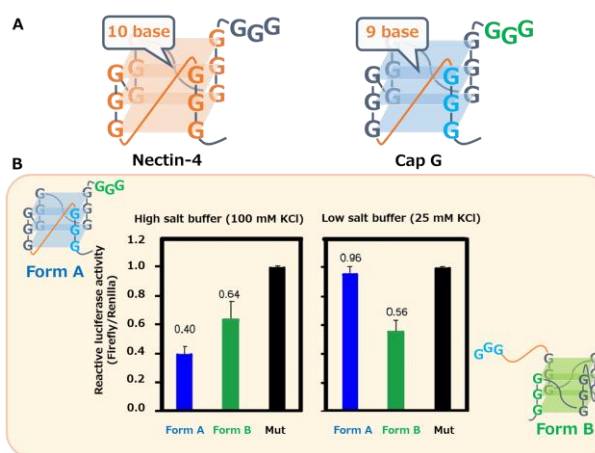


Fig.1 (A) RGq formation of Nectin-4 and CapG by Non-canonical rule. **(B)** Effects of KCl concentration on translation.

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

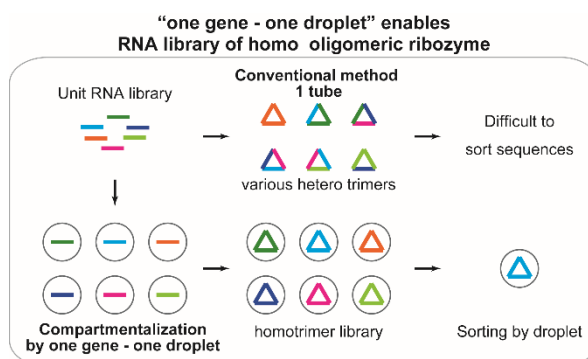
○上田実怜¹・松村茂祥^{1,2}・井川善也^{1,2}（¹富山大院理工、²富山大院生命融合）

***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 Toyama¹, Graduate School of Innovative Life Science, University of Toyama²) UEDA, Misato¹; 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 (d μ f)** 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、d μ f 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 d μ f 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。d μ f 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、活性なり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りボザイム変異体は、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)