

ポスター発表(1日目)

■ 2021年9月8日(水) 17:50 ~ 18:50 | 後半番号 Zoom

■ 偶数 (1P-050~1P-094)

[1P-050] 核酸の液液相分離現象に及ぼすエピジェネティック修飾効果の検討

*鶴田 充生¹、三好 大輔¹ (1. 甲南大FIRST)

[1P-052] がん細胞選択的毒性を示す二核銅(II)錯体の開発：置換基の電子効果

*上野 ジン¹、畑 真知¹、人見 穰¹、小寺 政人¹ (1. 同志社大院理工)

[1P-054] 非酵素的な化学連結法を用いた人工核酸L-aTNAの配列複製・転写・逆転写法の構築

*沖田 ひかり¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹ (1. 名古屋大学大学院 工学研究科)

[1P-056] 内部標準を利用したSERSシグナルの規格化と核酸定量への応用

*佐々木 健太¹、太田 良¹、和久 友則¹、小堀 哲生¹ (1. 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)

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

*Shiwei Zhang¹, Eiji Nakata¹, Takashi Morii¹ (1. Kyoto university)

[1P-060] 代謝物の超高感度検出を可能にする機能性人工核酸の開発

*本橋 優人¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学大学院理工学研究科理工学専攻)

[1P-062] 大腸菌16S rRNA中の検出困難な領域を標的とした超高速RNA光架橋による新規FISHの開発

*三原 純一¹、渡辺 ななみ¹、藤本 健造¹ (1. 北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科)

[1P-064] ピラノカルバゾール誘導体を含む可視光応答性新規DNA光クロスリンカーの開発

*成田 泰之¹、三原 純一¹、笹子 しのぶ¹、藤本 健造¹ (1. 北陸先端科学技術大学院大学)

[1P-066] グアニン修飾アンチセンス核酸による遺伝子発現制御法の開発

*白戸 秀平¹、萩原 正規¹ (1. 弘前大学大学院理工学研究科)

[1P-068] 生細胞内在性RNAのリアルタイム可視化検出を志向した発光プローブの開発

*江口 正敏¹、吉村 英哲¹、上田 善文¹、小澤 岳昌¹ (1. 東京大学大学院理学系研究科)

[1P-070] 高機能な二重特異性抗体の獲得に向けた細胞間架橋能評価手法の開発

*前島 敦¹、石橋 健太¹、金 賢徹^{1,2}、熊谷 泉¹、浅野 竜太郎¹ (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 産業技術総合研究所細胞分子工学)

[1P-072] がん細胞分泌タンパク質の単一細胞解析に向けたシリカビーズ充填型細胞捕捉デバイスの開発

*西川 莉奈¹、太田 健人¹、前田 義昌¹、畠山 慶一²、吉野 知子¹、田中 剛¹ (1. 東京農工大学 大学院 工学府 生命工学専攻、2. 静岡県立静岡がんセンター研究所 遺伝子診療研究部)

[1P-074] バイオ分析に利用可能な「ヒト細胞直交性」の加水分解酵素の開拓

*金子 諒右¹、立石 宙也²、谷戸 謙太²、新居 輝樹^{1,2}、岸村 顕広^{1,2,3}、森 健^{1,2}、片山 佳樹^{1,2,3} (1. 九州大学大学院工学研究院、2. 九州大学大学院システム生命科学府、3. 九州大学分子システム科学センター)

[1P-076] ヘムとタンパク質マトリクス間の結合を架橋点とする酸化還元応答ゲルの開発

*影山 和希¹、大洞 光司¹、林 高史¹ (1. 大阪大学工学研究科)

[1P-078] クロロフィルを修飾したペプチド鎖上で集積した種々のクロロフィル誘導体の分光学的特性

*仙波 真彩¹、山本 龍一¹、宮武 智弘¹ (1. 龍谷大学先端理工学部)

[1P-080] 拡張された自己集合中空錯体へのタンパク質の包接

*海老原 梨沙¹、中間 貴寛¹、藤田 大士²、藤田 誠^{1,3} (1. 東京大学、2. 京都大学、3. 分子科学研究所)

[1P-082] 循環置換と α ヘリックス挿入を用いた3ユニット環状ヘムタンパク質の設計と構築

*藤原 綱大¹、山中 優¹、真島 剛史¹、小林 直也¹、大西 遥喜¹、内橋 貴之²、廣田 俊¹ (1. 奈良先端大物質、2. 名大院理)

[1P-084] セラミド誘導体の生細胞に対するアポトーシス活性

*辻村 晃也¹ (1. 九州大学大学院理学府)

[1P-086] 糖鎖結合タンパク質のアフィニティーラベリングに向けた求電子性マルチバレントプローブの開発

*鴨下 潮音¹、櫻井 香里¹ (1. 東京農工大学工学府)

[1P-088] 多糖-ポルフィリン誘導体ナノ複合体による光線力学療法

*山名 啓太¹、河崎 陸¹、杉川 幸太¹、池田 篤志¹ (1. 広島大学大学院先進理工系科学研究科)

[1P-090] タンパク質油中分散化技術を用いた経皮マラリアワクチンの創製

*田中 敬佑¹、南畑 孝介²、若林 里衣^{2,3}、神谷 典穂^{2,3,4}、後藤 雅宏^{2,3,4} (1. 九州大学大学院工学府、2. 九州大学大学院工学研究院、3. 次世代経皮吸収研究センター、4. 未来化学創造センター)

[1P-092] トランスクリプトーム及びゲノム変異解析を用いた分子標的薬投与後の肺がん微小領域における細胞多様性の解明

*山崎 美輝^{1,2}、松永 浩子³、細川 正人^{1,3}、有川 浩司³、鈴木 直子³、林 大久生⁴、竹山 春子^{1,2,3,5} (1. 早大院先進理工、2. 産総研早大CBBD-OIL、3. 早大ナノライフ創新研、4. 順大人体病理病態学講座、5. 早大生命動態研)

[1P-094] 金選択的回収機能を有するアントラセン誘導体の合成

*寺村 駿吾¹、今井 崇人¹、浅野 昌弘¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学理工学部)

核酸の液液相分離現象に及ぼすエピジェネティック修飾効果の検討

○鶴田 充生・三好 大輔（甲南大 FIRST）

Investigation for effect of epigenetic modification on LLPS of nucleic acid (*Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University*) TSURUTA, Mitsuki; MIYOSHI, Daisuke

液液相分離現象（Liquid-liquid phase separation: LLPS）は新たな細胞内反応の調節機構として注目されている¹⁾。LLPS はタンパク質や核酸が、静電相互作用やカチオン - π 相互作用、スタッキング相互作用などの弱い相互作用を介してネットワーク構造を形成することで誘起される。LLPS に関するタンパク質はプリオン様ドメインや RGG ドメイン、SYGQ リッチドメインなどの low-complexity ドメインを含むことが知られている。特に、RGG ドメインをもつタンパク質である FUS や FMRP は、神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症や前頭側頭型認知症（ALS/FTD）と脆弱 X 関連振戦/失調症候群（FXTAS）の発症に関与している²⁾。さらに、これらのタンパク質をコードしている遺伝子は GGC や GGGGCC の反復配列を有している。反復配列の異常伸長が、疾患発症主因であるが、興味深いことに、伸長に伴ってシトシンのメチル化も同時に亢進されることが知られている。

本研究では、FMRP の RGG ドメイン由来のモデルペプチド（RGG peptide）と FMRP 由来の四重らせん構造（G4）形成配列（FMR1 DNA: d(G₂C)₄）を用いて LLPS のモデル系の構築を試みた。その結果、RGG peptide との LLPS には G4 構造が必須であることが明らかとなった（Fig.）。また、シトシンのメチル化はシトシンとグアニンリッチな染色体領域である CpG アイランド上で豊富に存在する³⁾。シトシンメチル化は遺伝子発現の制御や細胞のがん化と関係していることが知られている。そこで、G4 のループに存在するシトシンにメチル基を導入することで、G4 形成 DNA のメチル化による LLPS 能への影響を検討した。その結果、導入されたメチル基の数が増加するに伴い、LLPS 能が低下することが見いだされた。本発表では G4 構造へのシトシンメチル化の影響についても議論する。

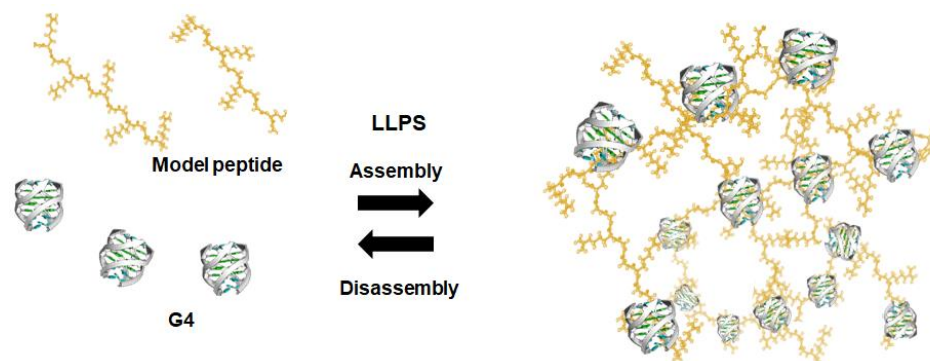


Figure. LLPS induced by G4DNA and model peptide using in this study.

References

- 1 Kohata K., Miyoshi D., (2020) *Biophys.*, **12**, 669-676.
- 2 a) Ash P. E. A., Bieniek K. F., Gendron T. F. *et al.*, (2013) *Neuron*, **77**, 639-646. b) Jain A., Vale R. D., (2017) *Nature*, **546**, 243-247.
- 3) Holliday R., Pugh J. E., (1975) *Science* **187**, 226-232.

がん細胞選択的毒性を示す二核銅(II)錯体の開発：置換基の電子効果

○上野ジン・畑真知・人見穰・小寺政人（同志社大院理工）

Development of dicopper(II) complexes exerting cancer-cell selective toxicity: electronic effect of substituents (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) UENO, Jin; HATA, Machi; HITOMI, Yutaka; KODERA, Masahito

シスプラチンやブレオマイシンなど、既存の金属錯体によるがん治療は、正常細胞の DNA に対しても同様に作用し、深刻な副作用を引き起こす。この問題の解決のため、我々はがん細胞の特異環境において高い DNA 切断活性を有し、がん細胞選択的な細胞毒性を示す金属錯体の開発を目指してきた。その中で *p*-cresol の 2,6 位に dpa^{4-X} を amide-tether で導入した Hbdpamide^{4-X} 配位子 (HL^{4-X}) の二核銅(II)錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})_2(\text{L}^{4-X})]^+$ [$\text{X} = \text{H}$ (1), Cl (2), OMe (3)] が高い DNA 切断活性を示すことを見出した。錯体 1-3 は還元剤存在下の O_2 活性化や H_2O_2 を用いた DNA 切断において高い活性を示した。 H_2O_2 を用いた DNA 切断では、電子求引性基であるクロロ基が置換した錯体 2 が最も高い活性を示した。しかし、2 は正常細胞に対して細胞毒性が高く、がん細胞選択性を示さなかった。一方、電子供与性基であるメトキシ基が置換した錯体 3 は、 H_2O_2 を用いた DNA 切断では 1 よりも活性が低下したが、がん細胞選択的毒性を示した。これらの結果は、置換基の電子効果が様々な活性に影響を与えることを示しており、特に電子供与性基の導入はがん細胞選択的に細胞死を導くことを示唆した。そこで本研究では、さらに高いがん細胞選択性を示す金属錯体の開発を目指して、メトキシ基よりさらに電子供与性が高いジメチルアミノ基 ($\text{X} = \text{NMe}_2$) を導入した新規二核化配位子とその二核銅(II)錯体(4)を合成し、この錯体の DNA 切断活性や細胞毒性を評価した。

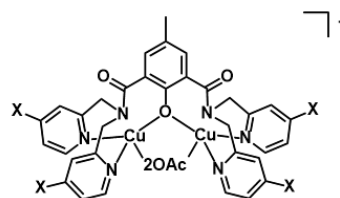


Fig 1. Chemical structures of $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})_2(\text{L}^{4-X})]^+$ [$\text{X} = \text{H}$ (1), Cl (2), OMe (3), and NMe_2 (4)].

低 pH 条件下における H_2O_2 による 1-4 の DNA 切断活性の測定結果を Fig. 2 に示す。4 は 1-3 と比較して DNA 切断速度が遅く、活性が低下するということが明らかとなった。先行研究との結果を合わせると、電子供与性基によって金属中心が電子豊富となり、そのルイス酸性が低下することは H_2O_2 による DNA 切断活性を低下させると考えられる。今後、4 を用いたがん細胞および正常細胞に対する細胞毒性を測定することで、この錯体のがん細胞選択的な細胞毒性を有しているのかを明らかにする予定である。

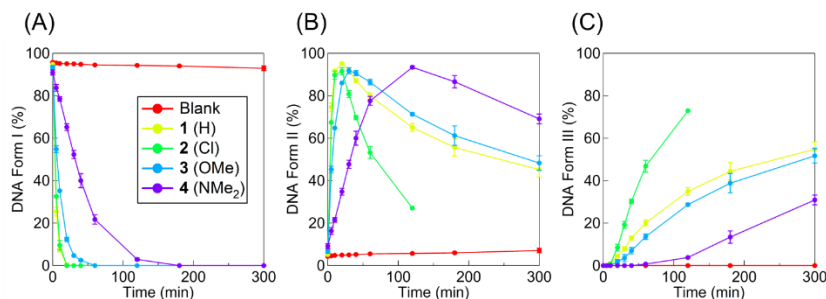


Fig 2. Time courses for Form I (A), Form II (B), and Form III (C) upon reaction of pUC19 DNA (50 μM bp) with H_2O_2 (50 μM) promoted by 1-4 (30 μM) under the reaction conditions containing NaCl (10 mM), and $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (70 μM) at pH 6.0 (MES 10 mM) at 37°C.

非酵素的な化学連結法を用いた人工核酸 L-aTNA の配列複製・転写・逆転写法の構築

○沖田ひかり・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

Development of replication, transcription, and reverse transcription of L-aTNA by non-enzymatic chemical ligation (Graduate School of Engineering, Nagoya University) OKITA, Hikari; MURAYAMA, Keiji; ASANUMA, Hiroyuki

当研究室では DNA のリボース骨格を鎖状骨格に改変することで極めて高い酵素耐性を有した非環状型人工核酸を創出してきた。中でも L-スレオニノールを主骨格とする L-aTNA (*acyclic L-threoninol nucleic acid*)は DNA 二重鎖と比較して、非常に安定な L-aTNA 二重鎖を形成することが明らかになっている^[1]。また、DNA や RNA とヘテロな二重鎖形成が可能であることが確認されているため、核酸医薬や蛍光プローブなどの多様な生物学的ツールとしての応用が期待されている(Fig. 1)。一方で、L-aTNA は酵素に認識されないため、酵素反応へ応用することが困難であった。

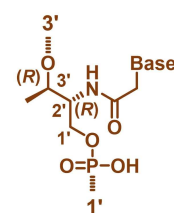


Fig. 1. Chemical structure of L-aTNA.

そこで、本研究では非酵素的な化学連結法を用いて L-aTNA の鋳型合成法の開発を行った。具体的には酵素の代わりにリン酸基と水酸基を結合させる縮合剤 *N*-Cyanoimidazole とマンガニオン(Mn^{2+})を用いて、(1)L-aTNA の配列複製や(2)天然核酸から L-aTNA への逆転写、(3)L-aTNA から天然核酸への転写反応の開発に注力した。

(1) 配列複製では 17-mer の鋳型 L-aTNA (**T17t**)上で、8-mer の L-aTNA プライマー(反応開始鎖: **T8A**)と鋳型鎖に相補的な 3-mer の L-aTNA 断片を 3 種類(**T3B1**・**T3B2**・**T3B3**)加えて、連結反応を試みた(Fig. 2)。その結果、反応開始から 8h 後には目的の 17-mer の **T8A+T3B1+T3B2+T3B3** 鎖が収率 90%で生成されることが明らかになった^[2]。さらに、3 種類の 3-mer 断片の代わりに 3-mer の L-aTNA ランダム配列プールを用いた場合でも目的の L-aTNA 鎖を配列特異的に合成できることを確認した(Fig. 2)。これは、酵素を用いずに非環状型人工核酸の配列複製に成功したはじめての例である。

(2) (1)と同様の手法で 17-mer の天然核酸(DNA または RNA)を鋳型とし、3 種類の 3-mer L-aTNA 断片を用いて L-aTNA 鎖の配列合成を行う逆転写反応を試みた結果、DNA の鋳型鎖、RNA の鋳型鎖上とともに 3 種類の L-aTNA 断片が逐次的に連結した。さらに RNA 鎖の場合、L-aTNA のランダム配列プールを基質として用いた場合でも高効率に連結反応が進行することが明らかになった。

(3) 最後に 17-mer の L-aTNA 鎖を鋳型として、8-mer の天然核酸断片を連結させる転写反応を試みた結果、DNA 鎖は極低収率で進行したが、RNA 鎖では全く反応が進行しなかった。そこで、二価金属イオンを検討したところ、わずかではあるが RNA 鎖の連結反応の進行が確認された。

今後、L-aTNA の非酵素的な鋳型合成法を高効率化できれば、SELEX 法による

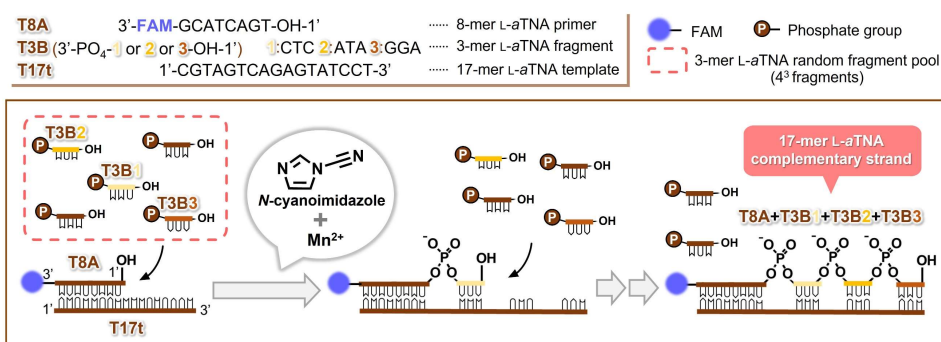


Fig. 2. Replication of L-aTNA by chemical ligation reaction using *N*-cyanoimidazole and Mn^{2+}

L-aTNA のアプタマー探索やプレ RNA ワールド研究が実現可能になると考える。

- 1) K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 6500-6503.
- 2) K. Murayama, H. Okita, T. Kuriki, H. Asanuma, *Nat. Commun.*, **2021**, 12, 804.

内部標準を利用した SERS シグナルの規格化と核酸定量への応用

○佐々木健太・太田良・和久友則・小堀哲生（京工繊大院工芸）

Ratiometric SERS assays for reliable quantification of nucleic acids using SERS probes as internal standard. (Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology) SASAKI, Kenta; OTA, Ryo; WAKU, Tomonori; KOBORI, Akio

体液中の核酸は様々な疾患の診断・予後・治療効果予測に利用可能な診断マーカーとして注目を集めている。現在、核酸定量法として利用されている定量 PCR 法は、高感度に核酸を定量することができるという利点をもつが、測定サンプル中の夾雑物の除去や酵素反応を用いた核酸増幅に長い時間が必要であるため、疾患診断法として汎用されていない。近年、表面増強ラマン散乱 (SERS) を利用した核酸検出法が定量 PCR 法に変わる新たな検出法として期待されている。SERS は金属表面上に吸着した分子のラマン散乱光を 10^8 – 10^{10} 倍に増強することが可能である。しかし、SERS はシグナルの再現性が乏しく、正確な SERS スペクトルを得るためには、熟練した技術者が必要であるため、定量分析にはほとんど応用されていない。そこで、我々は SERS シグナルの再現性向上を目指し、内部標準によってシグナル強度を補正可能な 2 種類の SERS プローブ (SERS プローブ 1, SERS プローブ 2) を開発した (Fig. 1)¹⁾。

SERS プローブ 1, 2 には、生体分子のシグナルが観測されないサイレント領域にシグナルを有する 2 種類の生体直交型ラマンレポーター (PEP: ●, EP (内部標準): ●) を導入した。また、SERS プローブ 1, 2 に導入する核酸は標的核酸を介して核酸三元系を形成するように設計した。さらに、この三元系を固相上に集積させるために、SERS プローブ 2 はシリカビーズ上に固定化した。

SERS プローブ 1, 2 を用いて核酸検出を行ったところ、PEP のシグナル強度は標的核酸の濃度に依存して増加した。また、EP で PEP のシグナルを補正することで、決定係数 R^2 が 0.83 から 0.98 に向上した上、検出限界も 390 pM から 86 pM に向上した (Fig. 2)。さらに、本定量法を利用して、熟練した技術者を必要としない簡便な SERS 測定に成功した。

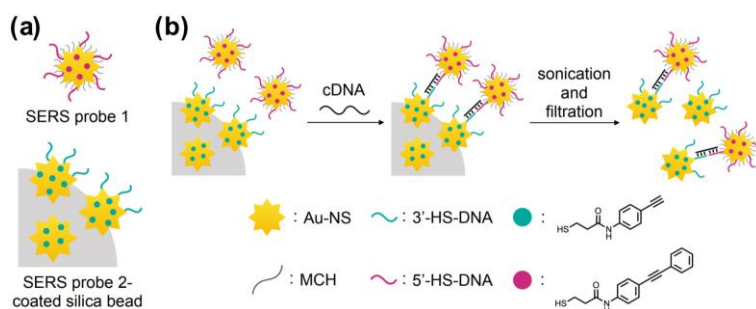


Figure 1. (a) SERS probe 1 and SERS probe 2-coated silica beads for ratiometric SERS assays. (b) Procedures for detecting target DNA using SERS probe 1 and SERS probe 2-coated silica beads.

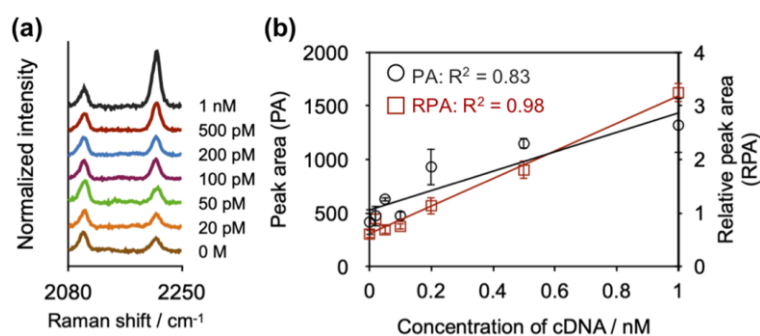


Figure 2. (a) Raman spectra of ratiometric SERS assay with different concentrations of cDNA (0 to 1 nM). (b) PA (black circle) and RPA (red cube) of PEP as functions of the different concentrations of cDNA. The error bars indicate the standard deviations calculated from five measurements. PA: peak area, RPA: relative peak area.

1) R. Ota, *et al.*, *Chem. Lett.*, **50**, 513–517, (2021)

DNA Origami as scaffolds to assemble quantifiable channel proteins on artificial organelles

(Institute of Advanced Energy, Kyoto University¹⁾ ZHANG, Shiwei¹, NAKATA, Eiji¹, MORII, Takashi¹

Inside cells, complex metabolic reactions are highly organized and distributed into different organelles which allows a better control over the biological processes¹⁾. There are some additional advantages in this case. For example, many cascade reactions suffer from incompatibilities such as cross-inhibitions or inactivations by components of the reaction system²⁾. Furthermore, spatially arranged enzymes can be observed in organelles which enhance the efficiency of multistep processes. Controlling the permeability of membranes with channel proteins ensures that the substrate and the reaction product can passively diffuse through the membrane. Up to now, the available channel protein that has been successfully inserted in artificial organelles (AO) is rather limited and most of the studies have been focusing on unspecific porins with molecular mass cut-offs (MMCO) such as the Outer Membrane Protein F (OmpF) from *Escherichia coli* (MMCO: 600 Da)³⁾. However, information on integration efficiencies and channels per AO are generally scarce and often phenomenological, because the integration efficiency is not 100%⁴⁾. To overcome this problem, a method which can locate the channel proteins on the membrane of artificial organelles in high loading yields with control of the number is highly required.

In this study, a spherical DNA nanostructure encapsulated by liposome used to attach the channel proteins was designed following previous work published by Perrault et al⁵⁾. Sequence-specific DNA-binding proteins, the zinc finger protein (zif268) as adaptors to stably locate the channel protein (OmpF) on the DNA origami scaffold. We measured internalized DNA origami diameters of 58.6 ± 5.5 nm and outer membrane diameters of 81.6 ± 10.1 nm from TEM images. In ongoing work we have started assembling OmpF by binding adaptor to control and improve the number on scaffold.

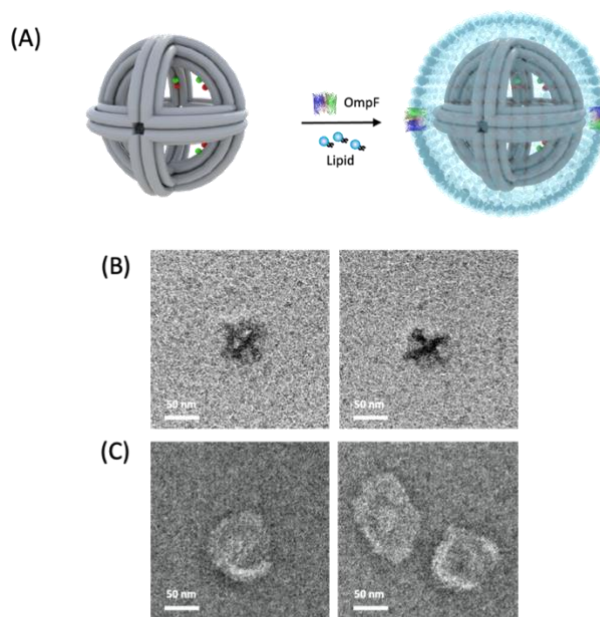


Figure 1. (A) Liposomes and channel proteins are added to Lipid-DNA conjugated DNA origami in a surfactant solution, resulting in mixed surfactant lipid micelles. Dialysis selectively removes the surfactant and results in a fused lipid bilayer around the nanostructure. (B) TEM images of origami, (C) TEM images of encapsulated origami. (scale bar = 50 nm).

Reference: 1) R. J. R. W. Peters, J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.* **3**, 335-342 (2012); 2) E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **6**, 2393–2397 (2016); 3) E. Christoph, C. G. Palivan, *Nano Lett.* **17**, 5790-5798 (2017); 4) F. Ite, W. Meier, *Nano Lett.* **15**, 3871–3878 (2015); 5) S. D. Perrault, W. M. Shih, *ACS Nano*, **8**, 5132-5140 (2014)

代謝物の超高感度検出を可能にする機能性人工核酸の開発

○本橋優人・西原達哉・田邊一仁（青山学院大院理工）

Development of Functional Oligonucleotide for Highly Sensitive Metabolite Detection (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) MOTOHASHI, Yuto; NISHIHARA, Tatsuya; TANABE, Kazuhito

近年、生体内で産生される代謝物は、疾病と関連する診断マーカーとして機能することから、医学研究分野で注目されている。しかし、代謝物解析に活用されている液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS) は、多成分を高感度に検出可能である一方、検出器として用いる質量分析計が高額であるため、代謝物解析の障壁は高い。そのため、代謝物を超高感度に検出する汎用的な方法論の確立が現在求められている。

以上を踏まえ、本研究では、標的代謝物量をコード可能な機能性人工核酸を開発し、定量 PCR 法により超高感度に検出する新たな分子システムの構築を目指した。具体的には、標的代謝物と選択的に反応する部位を 3' 末端に導入した人工核酸を用いることとした。人工核酸による代謝物解析法は以下の通りである。まず、人工核酸と標的代謝物との付加反応を起こさせた後、液体クロマトグラフィーにより付加体を単離する。続いて、得られた人工核酸を定量 PCR にて検出することにより、超高感度に代謝物を解析・検出する (Figure 1)。

本分子システムの構築にあたり、生体内のレドックスを司り、生命機能を維持する上で非常に重要な代謝物として知られているグルタチオン (GSH) を標的分子とし、チオールとの選択的な反応が知られるマレイミド基を末端に導入した人工核酸 (Maleimide DNA) を設計した。実際に、Maleimide DNA と GSH を混合すると、DNA と GSH の付加体 (GSH-DNA) が生成した。さらに、HPLC による単離を経て、GSH-DNA が定量 PCR にて増幅されることを明らかにした。本発表では、機能性人工核酸の設計、合成、及び GSH を初めとする代謝物解析に向けた実現可能性の検証結果について報告する。

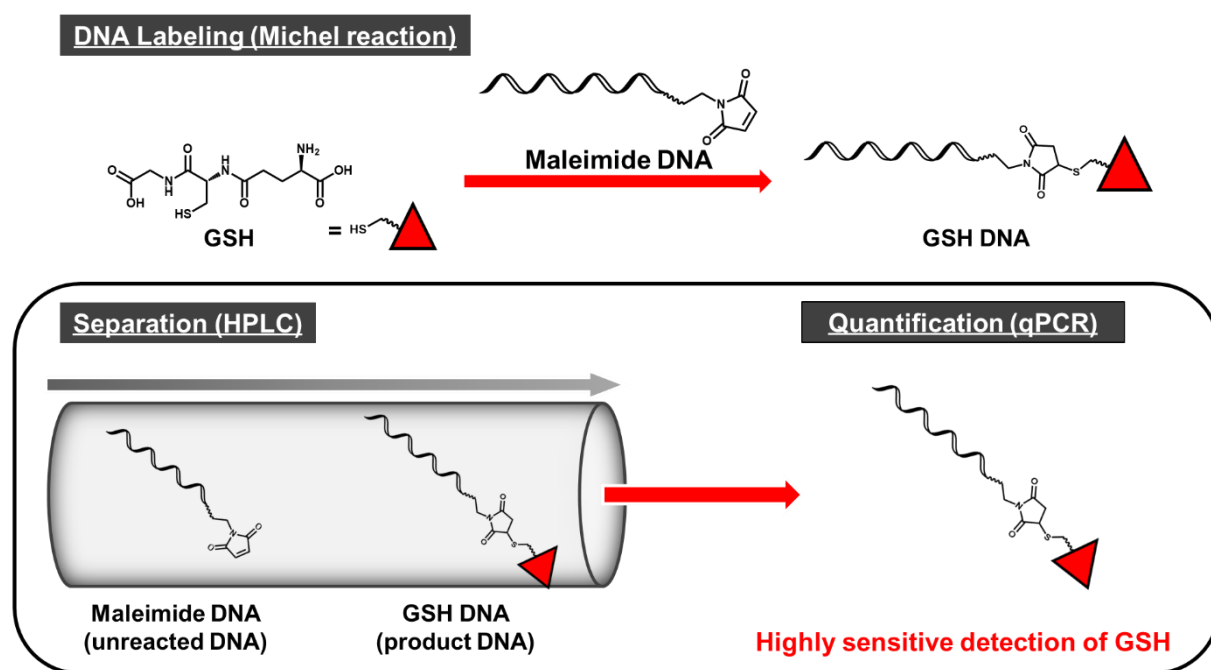


Figure 1. Schematic illustration of quantification of GSH by maleimide-modified DNA.

大腸菌 16S rRNA 中の検出困難な領域を標的とした超高速 RNA 光架橋による新規 FISH の開発

○三原純一・渡辺ななみ・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Development of novel FISH by ultrafast RNA photo-cross-linking targeting difficult-to-detect regions in *E. coli* 16S rRNA (School of Advanced Institute Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology) MIHARA Junichi; WATANABE Nanami; FUJIMOTO Kenzo

蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (FISH) は、オリゴヌクレオチド (ODN) を蛍光標識し、標的核酸を検出する方法である¹。しかし、FISH の検出感度は、主に 2 つの影響を大きく受ける。1 つ目は、細胞内の標的 RNA 含有量であり、標的 RNA の含有量が少ないと検出が困難になる。2 つ目は、標的核酸に存在する高次構造の影響である。たとえ標的核酸とプローブの配列が完全に一致していても、標的核酸が高次構造を取っていると、プローブとのハイブリダイゼーションを阻害する可能性がある。Fuch 氏のグループは、大腸菌の 16S rRNA の二次構造が検出感度に与える影響を評価した。その結果、大腸菌の 16S rRNA の 627-644 領域は、特に検出が困難であり、Eco1482 領域の 1% の蛍光強度でしか検出することができないことがわかった²。

そこで、私たちが開発した、光応答性人工核酸 3-cyanovinyl-carbazole modified D-threoninol (CNVD) を用いて、RNA 高次構造に対する FISH の課題解決を試みた。核酸に用いられる非可逆的な光架橋は、共有結合を形成して DNA や RNA との複合体を安定化させるために広く用いられている。そして、DNA ナノ構造の光化学的制御、核酸の配列特異的かつ迅速な検出を可能にする。光架橋剤としては、古くからソラレン およびその類縁体が用いられてきた³。しかし、ソラレンは光架橋の速度が遅く課題となっていた。一方で、この CNVD は、標的核酸と超高速で非平衡な結合を形成することができる光架橋技術である⁴。そして、この CNVD を用いることで、親和性の低い標的 rRNA を高感度で検出することが可能となった。また、高次構造を有する rRNA を検出するため、CNVD を含む検出プローブと複数の光架橋性アシスト ODN を用いて、検出困難な 627-644 領域を生細胞でも検出可能な Wash-free FISH 法の開発を行った。その結果、検出困難な標的領域周辺の二次構造を崩すことができ、検出プローブのアクセスが可能となった。そして、相対蛍光強度は、約 40 倍と向上し、高感度で検出することに成功した⁵。

- 1) E. F. Delong, G. S. Wickham, N. R. Pace, *Science*, **1989**, 243, 1360.
- 2) B. M. Fuchs, K. Syutsubo, W. Ludwig, R. Amann, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, 64, 4973.
- 3) P. G. Francis, et al., *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22, 2845.
- 4) T. Sakamoto, Y. Tanaka, K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **2015**, 17, 936.
- 5) K. Fujimoto, N. Watanabe, *ChemistrySelect*, **2020**, 5, 46, 14670.

ピラノカルバゾール誘導体を含む可視光応答性新規 DNA 光クロスリンカーの開発

○成田泰之・三原純一・笹子しのぶ・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Development of novel visible light-responsive DNA photo-cross-linker containing pyranocarbazole derivatives (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)
NARITA, Yasuyuki; MIHARA, Junichi; SASAGO, Shinobu; FUJIMOTO, Kenzo

DNA 光架橋反応は、光照射により連結し共有結合を形成する。しかし、代表的な光応答性人工核酸である Psoralen¹ は、光架橋に必要な照射時間が長いことや、光毒性を持つ短波長の 254 nm(UV-C)の光を使用する必要があるという問題点があった。そのような問題点を解決するため、我々は、秒単位の光照射で[2+2]光還元により相補鎖の pyrimidine 塩基と光架橋する 3-cyanovinylcarbazole nucleoside (^{CNV}K)² を報告した。そして、^{CNV}K は、核酸配列の特異的かつ迅速な検出³などに使用された。しかし、^{CNV}K は、光架橋に 366 nm の光照射を必要とするため、細胞への光毒性が生細胞で使用する障害となっていた。一方、可視光である 400nm の光毒性は紫外光である 366 nm よりも弱く、生細胞に 300 s 以上照射されたことが知られている⁴。そこで、我々は、塩基部分の π 共役構造を広げることで、可視光によって光架橋する光応答性人工核酸 pyranocarbazole nucleoside (^{PCX})⁵を開発した。この ^{PCX} は、可視光で光架橋が可能であるため、従来の ^{CNV}K と比べ光毒性が軽減され、生細胞内での Fluorescence *in situ* hybridization(FISH)が可能である⁶。ところが、^{PCX} には、塩基部分を合成する際に、InCl₃ を触媒とする *tandem Michael* 付加⁷を使用するため、副生成物が生じてしまい、その収率が約 20 %と非常に低くなり、実用化への課題となっていた。

本研究は、^{PCX} の合成収率が低いという問題点を解決するため、新たな合成法により ^{PCX} 誘導体を合成した。新たな合成法は、H₂SO₄ を触媒とすることで coumarin 誘導体を合成する、簡便で高収率が期待された *Pechmann* 縮合を検討した。また、*Pechmann* 縮合を用いて coumarin 誘導体を合成すると ^{PCX} の 4 位にメチル基が置換された 4-methylpyranocarbazole nucleoside (^{MEP}K)が取得されると分かった。実際、*Pechmann* 縮合を用いた合成法によって、^{MEP}K は、副生成物が生じることを抑えることができた。そのため、^{MEP}K の塩基部分を約 72 %と高い合成収率で取得することができ、^{PCX} の課題であった収率を 3.5 倍向上することができた。そして、^{PCX} と同様に ^{MEP}K は、光毒性の弱い 400 nm の可視光で光架橋することが明らかとなった。これにより、生細胞内の核酸の制御、検出、操作などの様々な用途での実用化が期待される。

1. B. L. Lee, A. Murakami, K.R. Blake, S. B. Lin, P. S. Miller, *Biochemistry*, **1988**, 27, 3197.
2. Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3227.
3. K. Fujimoto, M. Hashimoto, N. Watanabe, S. Nakamura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, 29, 16, 2173.
4. J. Edahiro, K. Sumaru, Y. Tada, K. Ohi, T. Takagi, M. Kameda, T. Shinbo, T. Kanamori, Y. Yoshimi, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 970.
5. K. Fujimoto, S. Sasago, J. Mihara, S. Nakanura, *Org. Lett.*, **2018**, 20, 2802.
6. K. Fujimoto, M. Hashimoto, N. Watanabe, S. Nakamura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, 29, 16, 2173.
7. A. Vronteli, D. J. H. Kitina, M. Konstantinidou, K. E. Litinas, *Arkivoc*, **2015**, 3, 111.

グアニン修飾アンチセンス核酸による遺伝子発現制御法の開発

○白戸秀平・萩原正規（弘大院理工）

Guanine-Tethered Antisenses Inhibit Protein Synthesis Through G-Quadruplex Formation

(Graduate School of Science and Technology, Hirosaki University) SHIROTO, Shuhei; HAGIHARA, Masaki

グアニン塩基に富む RNA 配列はグアニン塩基間の特異的な Hoogsteen 型水素結合を介し、グアニン四重鎖構造を形成する。近年、グアニン四重鎖構造は遺伝子発現を制御する重要な機能を持つことが明らかにされており、四重鎖形成配列は多くのガン遺伝子の翻訳制御領域に認められることから、これらを標的とした遺伝子発現制御の有用性も示されている。また、グアニン四重鎖構造は分子内で形成されるだけでなく、グアニン塩基どうしの近接によって分子間でも形成することが可能である。本研究では、末端にグアニンを修飾したアンチセンス核酸 (g-AS) を用いて標的 RNA にグアニンを近接させ、RNA/DNA 会合型グアニン四重鎖構造の形成を試みた。さらに、本手法で誘起した四重鎖構造による、標的特異的な遺伝子発現制御効果を検討した。

まず、グアニン連続配列: (GGGU)_n (n=1~3) を有するモデル RNA を作成し、様々な g-AS を加えて逆転写反応を行った。得られた反応産物をキャピラリー電気泳動で解析した結果、g-AS と標的 RNA で (GGGU)_n が n=4 以上となる

組み合わせでは四重鎖を形成し、逆転写反応が阻害されていることが確認された。

また、これらモデル配列に g-AS を加え、核酸の融解温度測定と円偏光二色性測定を行うことで、RNA/DNA 会合型グアニン四重鎖を誘起できていることを確認した。

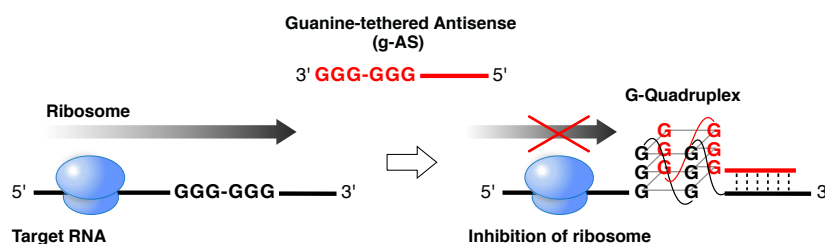


図 1. グアニン修飾アンチセンス核酸 (g-AS) によるグアニン四重鎖構造の誘起と翻訳制御の概要図。

次に、グアニン連続配列を有する TPM3 遺伝子の 5'-UTR 下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入し、無細胞タンパク質発現系での翻訳制御を試みた。TPM3 は染色体転座により ALK や NTRK1 などと融合し、ガン遺伝子として機能することが知られている。TPM3 の 5'-UTR を含む 16 塩基に相補的なアンチセンス核酸を設計し、レポーターアッセイにより翻訳量を比較した (図 2)。その結果、グアニン連続配列を修飾していないアンチセンス核酸 (AS) は遺伝子発現量に大きな変化は見られなかった一方で、グアニン連続配列を修飾した G2-AS では、1 μ M でほぼ完全に翻訳を抑制することが分かった。さらに標的 RNA に対しての結合親和性向上を期待し、g-AS の相補鎖領域に 2'-OMe 修飾を施すと (rG2-AS)、DNA アンチセンス核酸よりも強力な翻訳制御効果を発揮した。以上の結果より、グアニン修飾アンチセンス核酸は標的 RNA を配列特異的に認識してグアニン四重鎖構造を誘導することで、効率的に翻訳過程を制御できることが明らかとなった。

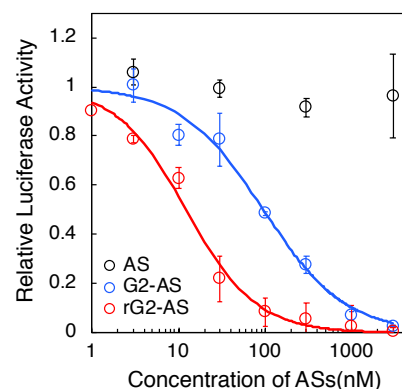


図 2. グアニン修飾アンチセンス核酸 (G2-AS)、相補鎖領域のみ (AS)、2'-OMe 修飾を施した g-AS (rG2-AS) による翻訳制御効果。

- 1) M. Hagihara, L. Yamauchi, A. Seo, K. Yoneda, M. Senda, K. Nakatani, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 11171.
- 2) M. Hagihara, S. Shiroto, S. Igarashi, S. Sato, *Chem. Lett.*, *in press*
- 3) M. Hagihara, *Chem. Commun.*, *in press*

生細胞内在性 RNA のリアルタイム可視化検出を志向した発光プローブの開発

○江口 正敏・吉村 英哲・上田 善文・小澤 岳昌（東京大学院理）

Development of Luminescent Probe for Visualization of Endogenous RNA in Living Single Cells. (Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo) Eguchi, Masatoshi; Yoshimura, Hideaki; Ueda, Yoshibumi; Ozawa, Takeaki

分化や多能性獲得、ガンなどの疾患によるの細胞状態変化は、細胞外からの様々な刺激入力により関連遺伝子の発現状態が変化することで生じる。近年、網羅的遺伝子解析技術の発展により細胞の状態変化に関わる遺伝子の同定が進んでいる。一方で、個々の同定された遺伝子について、網羅的解析技術の特性上、同一標本中での発現変化の時空間的パターンの特定には至っていない。そこで、細胞状態変化を誘導する際に必要十分である時空間的な発現パターンを特定するために、細胞状態変化の過程全体を通じて標的遺伝子発現を 1 細胞解像度、さらには細胞内局在を可視化する必要がある。本研究では遺伝子発現産物である RNA の発現量を生細胞中で高感度かつ長時間測定するため、生物発光を用いた生細胞内遺伝子発現検出技術の開発を行った。

RNA を検出する生物発光プローブとして、発光タンパク質 NanoLuc (NLuc) の二分割体と RNA 結合タンパク質 PUM-HD の変異体 mPUM からなる融合タンパク質を設計した。標的 RNA として β -actin mRNA を選択し、標的とする配列に対して特異的に結合する mPUM を用いた。プローブ分子が標的 RNA に結合すると、二分割 NLuc が近接し再構成することで NLuc の発光能が回復する。この再構成 NLuc の発光を測定することで RNA を検出定量できるプローブ設計を行った。プローブタンパク質について、タンパク質を単離し試験管内発光測定を行い RNA 検出能の評価をおこなった。発光顕微鏡を用いて一細胞での RNA の可視化検出能を評価した。さらに、初代培養神経細胞内にプローブタンパク質を発現し神経細胞内での内在性 mRNA のリアルタイム検出を試みた。

RNA 検出プローブ性能の評価のため、大腸菌による発現系からタンパク質を発現・精製し、試験管内での発光測定系を構築した。標的配列を含む RNA を添加することで発光強度が上昇し、そこに RNA 分解酵素を添加すると発光量が低下した。標的配列を含まない RNA を添加した場合は発光強度の上昇が見られなかった。結果から、本プローブは可逆的に標的とする RNA を認識し発光量を変動させることが示された。標的 RNA 量を変化しプローブの発光量の RNA 濃度との関係性を評価したところ、RNA 量依存的に発光値が変化することが明らかとなった。すなわち、本プローブは標的 RNA を定量的に認識し、発光シグナルとして検出可能であることが示された。標的 RNA 配列を発現させた HEK293T 細胞についても発光顕微鏡を用いて観察を行った。この際、標的 RNA が発現する細胞にはレポーターとして蛍光タンパク質が発現するように設計したところ、標的 RNA が発現している細胞について特異的に発光画像が得られた。以上の結果から、開発したプローブは RNA 発現量を 1 細胞解像度で可視化追跡可能となる性能を有することが示された。次に、本プローブ DNA を標的 RNA が発現する NIH3T3 細胞内に導入し発光顕微鏡を用いて観察を行った。細胞の遊走能を評価する手法であるスクラッチアッセイを行い細胞の移動度と β -actin mRNA の量との関係性を検討した。発光値の変動を一細胞レベルで追跡・評価することができ、遊走方向の細胞が高い発光値を示したことから、細胞ごとに標的 RNA の量の変動を追跡可能であることが示唆された。ラット初代培養神経細胞中にプローブを発現し顕微鏡観察を行ったところ、神経細胞内でも RNA の局在は均一ではなく、特に軸索中では細胞体と比較すると局在していない一方で一部プローブが凝集する部分があることが明らかとなった。この結果から、本プローブがサブセラーレベルでの局在を追跡可能であることが示唆された。

以上のように、本研究では RNA 結合タンパク質ツール mPUM と生物発光を利用して、長時間にわたる RNA 可視化検出を実現するプローブの礎を開発した。さらなる RNA 認識能の評価と改良を施すことで、本センサーの原理を利用した 1 細胞内遺伝子発現定量評価法の確立が期待される。

高機能な二重特異性抗体の獲得に向けた細胞間架橋能評価の開発

○前島敦¹・石橋健太¹・金賢徹^{1,2}・熊谷泉¹・浅野竜太郎¹ (¹東京農工大院工、
²産総研細胞分子工学)

Development of evaluation method for intercellular cross-linking abilities to obtain functional bispecific antibodies (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology¹, Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology²)
MAEJIMA, Atsushi¹; ISHIBASHI, Kenta¹; KIM, Hyonchol^{1,2}; KUMAGAI, Izumi¹; ASANO, Ryutaro¹

がん細胞表面の上皮増殖因子受容体 (EGFR) と T 細胞表面の CD3 の両者を標的とする二重特異性抗体 Ex3 は、がん細胞と T 細胞を強制的に架橋することで特異的な抗腫瘍効果を示す (Fig. 1)。これまで、Ex3 を構成するドメインの連結順を変えた配向性改変体は、それぞれの標的に対する結合活性は変わらないものの、がん細胞傷害活性が著しく増加することが分かっている[1]。これは、配向性の違いによる立体障害の有無が、細胞間架橋能に影響を及ぼしたためと考えている。このため、より高機能な二重特異性抗体の獲得には、2 細胞間の架橋能を定量的に評価する手法の確立が望まれるが、有効な解析手法がなかった。そこで本研究では、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた二重特異性抗体が介する細胞間架橋能の定量的な解析手法の開発を目指した。

正常 T 細胞を用いた評価はドナー間のロット差が懸念されるため、T リンパ腫株である Jurkat 細胞を用いることで、より定量的な測定系の確立を目指した。シャーレに付着させたがん細胞に種々の濃度の Ex3 を添加後、先端に細胞径と同等の金属カップを取り付けたカンチレバーを用いて、Jurkat 細胞を 1 細胞捕捉し、がん細胞に接触させた後、それらを引き離す際のフォースカーブを測定した (Fig. 2)。二重特異性抗体が介する細胞間架橋能は 2 細胞間の接着を破断する際の仕事で表した。さらに、Ex3 およびがん細胞傷害活性が向上した Ex3 配向性改変体を用いて細胞間架橋能の比較を行った。

AFM 測定の結果、Ex3 非添加時 (0 nM) に比べて 1 nM の添加で有意な測定値の上昇が認められた (Fig. 3)。このことから、本手法で二重特異性抗体が介する細胞間架橋能を評価可能であることが示された。さらに、Ex3 に比べ、がん細胞傷害活性がより高い Ex3 配向性改変体の方がより高い細胞間架橋能を示した (Fig. 4)。このことから、二重特異性抗体のがん細胞傷害活性と細胞間架橋能には相関があることが示された[2]。今後、AFM を用いた細胞間架橋能評価を用いて、より高機能な二重特異性抗体の獲得を目指す予定である。

[1] R. Asano *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.*, **26**, 359-67 (2013)

[2] A. Maejima *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **178**, 113037 (2021)

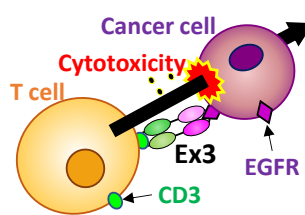


Fig. 1. Cytotoxicity by Ex3

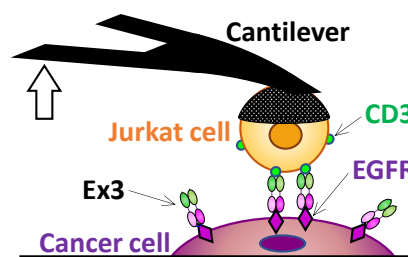


Fig. 2. Principle of AFM measurement

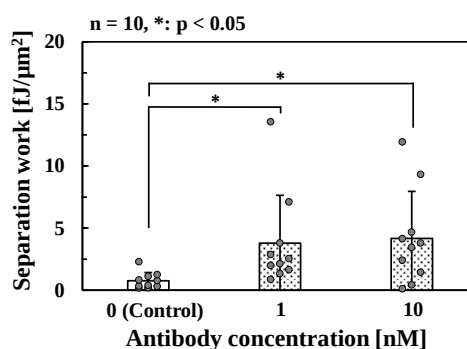


Fig. 3. Cross-linking abilities measured by AFM

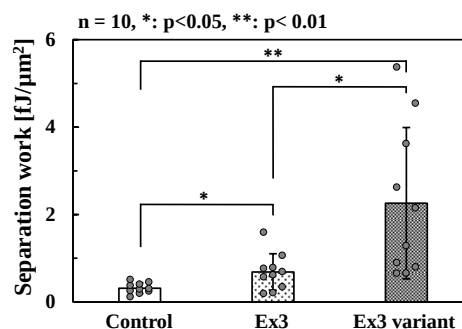


Fig. 4. Differences of cross-linking abilities

がん細胞分泌タンパク質の単一細胞解析に向けたシリカビーズ充填型細胞捕捉デバイスの開発

○西川莉奈¹・太田健人¹・前田義昌¹・畠山慶一²・吉野知子¹・田中剛¹ (¹東京農工大院工、²静岡県立静岡がんセンター研究所 遺伝子診療研究部)

Development of cell-arraying device filled with silica particles for capturing cancer cell-secreted proteins toward single cell analysis (Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology¹, Medical Genetics Division, Shizuoka Cancer Center Hospital and Research Institute²) **NISHIKAWA, Rina¹**; **OTA, Kento¹**; **MAEDA, Yoshiaki¹**; **HATAKEYAMA, Keiichi²**; **YOSHINO, Tomoko¹**; **TANAKA, Tsuyoshi¹**

がん細胞が分泌するタンパク質はがんの進展に深く関与している。当研究グループでは、セクレトーム解析により大腸がんの特異的な分泌タンパク質を発見した。しかし、細胞毎に分泌量が不均一なことから、単一細胞解析により悪性度に関与する細胞の特定を目指している。これまで微細孔集積基板のキャピラリープレート (Capillary plate: CP) 孔内にモノリス構造を持つシリカを充填したデバイスを開発し、単一細胞の分泌タンパク質解析に利用してきた (Fig. 1A)。毛細管現象により細胞がアレイ化でき、多孔性によりイムノアッセイに用いる抗体固定化量が増大するため、高感度検出が可能である。しかし、モノリスシリカ充填行程は2日間を要し、煩雑かつ労働集約的であることが課題であった。そこで、簡易迅速な充填物としてシリカビーズに注目し、シリカビーズ充填 CP の作製、性能評価を行った。

酸素プラズマ処理し、表面を PDMS でスタンプした CP (φ 20 μm、孔数 6×10⁵、厚さ 400 μm) をメンブレンフィルター上に設置し、シリカビーズ (φ 3 μm) 懸濁液を滴下した。この時、CP の孔径、孔数から計算した最大充填数 (5.33×10⁹ particles/ml) に対し、10 倍のビーズ数を添加した。CP を乾燥後、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察を行った。その結果、高密度にビーズが充填された様子が確認され

(Fig. 1B)、充填率はモノリスシリカ-CP と同等の値であった。この結果より、シリカビーズ充填 CP を簡易迅速に作製できることが示された。続いて、シリカビーズ充填 CP に CellTracker Green 染色したヒト大腸がん細胞 SW480 株 1~30×10³ cells/ml の各細胞懸濁液 1 ml を滴下し、蛍光顕微鏡による観察を行った。得られた蛍光画像から細胞捕捉率を解析した結果、モノリスシリカ-CP と同等の細胞捕捉率が得られ、1×10⁴ cells/ml において 86 % の捕捉率を示した。また、シリカビーズ充填 CP またはスライドガラス上に 50~1000 μg/ml 蛍光標識抗体を導入し、バイオチップリーダー (被写界深度 250 μm) にて蛍光画像を取得した結果、シリカビーズ充填 CP の抗体固定化量はスライドガラスの約 50 倍となり、平面基板よりも抗体固定化量が増大することが示された。以上のことから、シリカビーズ充填 CP は簡易迅速に作製可能なデバイスであり、単一細胞由来の分泌タンパク質解析への応用が期待できる。

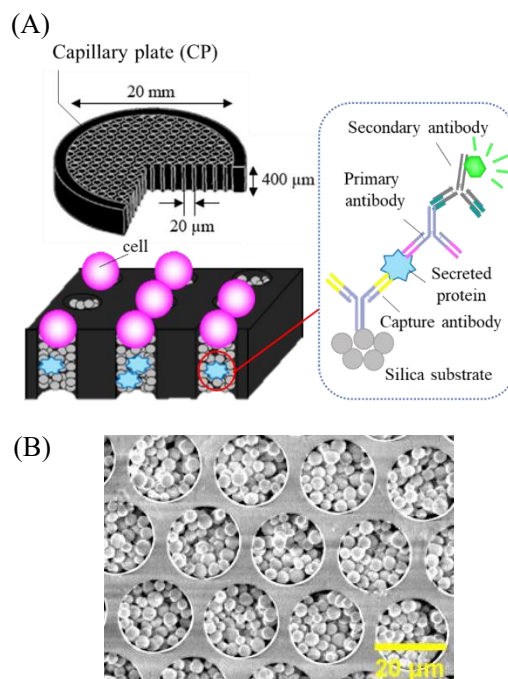


Fig. 1 (A) Schematic diagram of detection of secreted proteins from single-cells using the silica-capillary plate (CP). (B) SEM image of CP filled with silica particles.

バイオ分析に利用可能な「ヒト細胞直交性」の加水分解酵素の開拓

○金子諒右¹・立石宙也²・谷戸謙太²・新居輝樹^{1,2}・岸村顕広^{1,2,3}・森健^{1,2}・片山佳樹^{1,2,3} (1 九大院工、2 九大院システム生命、3 九大分子システム科学センター)

Exploitation of a hydrolase as an orthogonal enzyme to human cells for bioanalysis (Dept. of Applied Chemistry, Grad. Sch. of Eng, Kyushu Univ.¹, Grad. Sch. of Sys. Life Sci, Kyushu Univ.², Int. Res. Cent. for Molecular Sys., Kyushu Univ.³) KANEKO, Ryosuke¹; TATEISHI, Chuya²; TANITO, Kenta²; NII, Teruki^{1,2}; KISHIMURA, Akihiro^{1,2,3}; MORI, Takeshi^{1,2}; KATAYAMA, Yoshiki^{1,2,3}

【緒言】タンパク質などの検出を目的とするバイオ分析において、検出感度の向上のために酵素増感反応が用いられる。例えば ELISA や免疫組織染色では、西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) やアルカリホスファターゼ (AP)、 β -ガラクトシダーゼ (β -gal) といった穏和な条件下で高い活性を持つ酵素が用いられてきた。しかし、これらの酵素を細胞上のタンパク質検出に用いる際は、細胞に内在する酵素活性が問題となる (Fig. 1A)。そのため、事前に加熱や固定化による失活処理が行われるが、これによって抗原の変性や細胞死が生じる¹⁾。

加えて、これらの酵素の反応条件は異なるため、同時利用が容易ではない。そこで我々はヒト細胞に内在せず、かつ特異性の高い酵素を用いればこの問題を解決できると考えた。このような酵素の候補として糖加水分解酵素に注目し、種々のデータベースから、 α -L-arabinofuranosidase (α -araf)、 β -D-xylosidase (β -xyl) ならびに α -L-rhamnosidase (α -rha) を選出した。最後に、これらが Cell ELISA に適用できるかの検証を試みた (Fig. 1B)。

【実験】HeLa および JY25 細胞に対して新規酵素の p-ニトロフェノール基質を添加し、37°C で 18 時間培養した。また、pH 4.5 および pH 7.4 において、HeLa と JY25 のライセートに対して同様の実験を行った。新規酵素及び β -gal について活性・交差反応性を測定した後、Clostridium thermocellum 由来の α -araf に抗体を修飾した。この α -araf およびその蛍光基質を用いて、生細胞 HepG2 の PD-L1 の検出を行った。さらに、 β -gal 修飾抗体とその緑色蛍光基質、および α -araf 修飾抗体とその青色蛍光基質を同時に用いて生細胞 HepG2 上の 2 種類のタンパク質の検出を行った (Fig. 2)。

【結果及び考察】上記の新規酵素の活性が HeLa 細胞および JY25 細胞に存在しないことを確認した。これらの酵素を実際に発現して、活性を調べたところ、従来の分析用酵素と同程度の高い活性を有し、また、互いに交差反応しなかった。そこで、 α -araf を β -gal と同時に用いて、HepG2 生細胞の PD-L1 と EpCAM の 2 種類のタンパク質の検出を試みたところ、それぞれの存在を同時かつ独立に検出することが可能であった²⁾。同様に α -rha についても、cell ELISA に適用できることを確認した。したがって、これらの酵素を組み合わせれば、複数の抗原タンパク質の同時高感度検出が可能と期待される。

【結果及び考察】上記の新規酵素の活性が HeLa 細胞および JY25 細胞に存在しないことを確認した。これらの酵素を実際に発現して、活性を調べたところ、従来の分析用酵素と同程度の高い活性を有し、また、互いに交差反応しなかった。そこで、 α -araf を β -gal と同時に用いて、HepG2 生細胞の PD-L1 と EpCAM の 2 種類のタンパク質の検出を試みたところ、それぞれの存在を同時かつ独立に検出することが可能であった²⁾。同様に α -rha についても、cell ELISA に適用できることを確認した。したがって、これらの酵素を組み合わせれば、複数の抗原タンパク質の同時高感度検出が可能と期待される。

¹⁾ Z. Liu, et al., J. Immunol. Methods 2000, 234, 153.

²⁾ R. Kaneko, et al., Chem. Lett. 2021, 50, 1493.

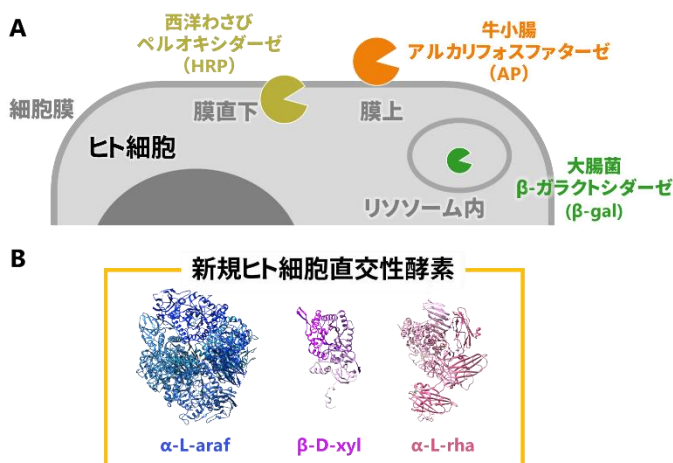


Fig. 1 (A)内在性酵素と(B)新規ヒト細胞直交性酵素

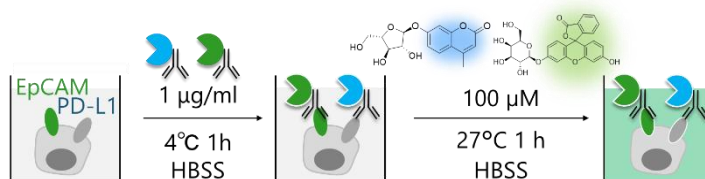


Fig. 2 複数酵素による多色検出のスキーム

ヘムとタンパク質マトリクス間の結合を架橋点とする酸化還元応答ゲルの開発

○影山和希・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Construction of Redox Responsive Hydrogel Cross-linked by Interaction between Heme and Protein Matrix (Graduate School of Engineering, Osaka University) KAGEYAMA, Kazuki; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

近年、外部刺激によりその体積および性質を変化させる刺激応答性ゲルは、将来の化学センサーやアクチュエーターへの応用を指向した材料として注目されている。これらの材料の構築において、機能性分子と合成高分子との複合化は有力な手法の一つである。最近では複合化させる機能性分子として生体分子がしばしば利用されている¹。生体分子の中でも、特にタンパク質は酵素活性や分子認識など有機小分子では達成困難な機能や性質を有しており、よりユニークな材料構築を遂行する上で魅力的な素材である。しかし、タンパク質は多数の反応性官能基を表面に持つため部位特異的な化学修飾は容易ではない。そこで我々は可逆に結合する補因子としてヘムを有するヘムタンパク質に注目した。ヘム補因子は強酸性条件および有機溶媒処理により簡単に除去可能であり、官能基修飾したヘム誘導体を挿入することで、目的の官能基を有する再構成タンパク質を調製することが可能である。ヘム補因子は水中でタンパク質マトリクスのヘム結合部位に強く結合しており、またその結合定数は鉄中心の価数、すなわち酸化還元状態に依存する。このヘムタンパク質の性質を反映させた酸化還元応答ゲルの構築を目指し、我々は六量体ヘムタンパク質を基盤としたハイドロゲルの開発を行った。

本研究では高い熱安定性を有する六量体ヘムタンパク質、Hexameric tyrosine coordinated heme protein (HTHP)に着目した²。まずHTHPのヘムとタンパク質マトリクス間の結合の安定性を、ヘムの解離に伴うエネルギー差(ΔG°)を算出することで定量的に評価した(Table 1)。その結果、酸化状態では一般的なヘムタンパク質よりも強く結合し、また鉄中心の還元により結合能が大きく低下した。これらの特性から酸化還元応答ゲルの素材として最適であると判断した。次に、HTHPを基盤とするハイドロゲルの調製を行った。反応点としてヘム補因子のプロピオン酸部位にアクリロイル基を修飾したヘム誘導体を合成し、HTHPの天然ヘムと置換することで再構成タンパク質を得た。この再構成タンパク質を架橋剤としてアクリルアミドと共重合させることでハイドロゲルを構築した(Fig 1)。本発表ではこのゲルの力学特性評価および鉄中心の還元に伴う力学特性の変化について報告する。

Table 1. 各ヘムタンパク質のヘムの解離に伴うエネルギー差 (ΔG°)

Hemoprotein	ΔG° (kJ/mol)
HTHP (Fe ³⁺)	57 ± 6
HTHP (Fe ²⁺)	25 ± 2
Myoglobin (Fe ³⁺)	46 ± 4
Myoglobin (Fe ²⁺)	49 ± 2

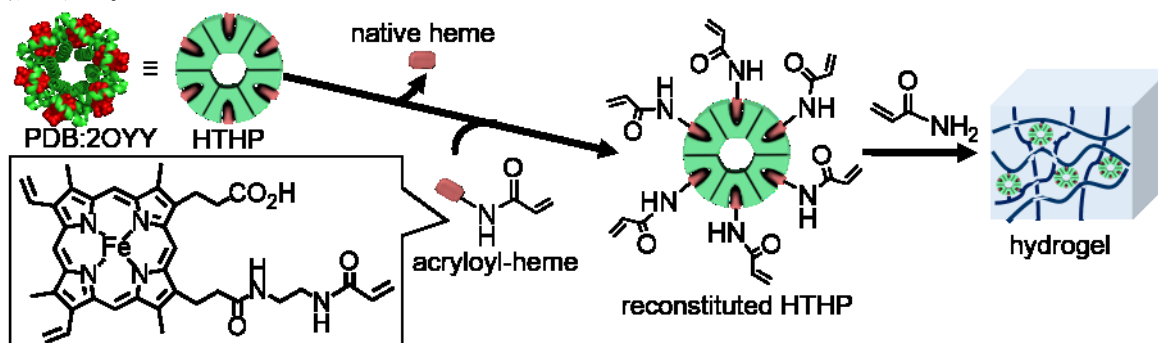


Fig 1. 再構成 HTHP を架橋点とするポリアクリルアミドゲルの調製 (PDB: 2OYY)

1) Z. Yang *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42, 891-901. 2) H. Dobbek *et al.*, *J. Mol. Bio.*, **2011**, 368, 1122-1131.

クロロフィルを修飾したペプチド鎖上で集積した種々のクロロフィル誘導体の分光学的特性

○仙波真彩・山本龍一・宮武智弘（龍谷大先端理工）

Optical Properties of Chlorophyll Aggregates Assisted by Chlorophyll-Appended Peptides (Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University) SEMBA, Ma-aya; YAMAMOTO, Ryuichi; MIYATAKE, Tomohiro

自然界のクロロフィルは、タンパク質と複合化しながら集積化することで、高効率の光吸収および分子間励起エネルギー移動を可能にしている。これまで我々は、カチオン性の亜鉛クロロフィル誘導体をアニオン性のポリペプチドと複合化させることで集積化させ、色素間の相互作用を発現させてきた。本研究ではアミノ酸残基数 n が 2—6 のオリゴペプチドにクロロフィル誘導体を結合させ、これを種々のイオン性亜鉛クロロフィル誘導体と複合化させることで亜鉛クロロフィル類の集積化を試みた(図 1)。THF/Tris-HCl 緩衝溶液=15/85 の溶液中で **1** と **4** を混ぜ合わせると、カチオン性の亜鉛クロロフィル誘導体 **1** はアニオン性のヘキサアスパラギン酸をもつクロロフィル誘導体 **4** ($n=6$) と 6:1 の比で複合化し、その Qy 吸収帯は 662 nm から 685 nm へと長波長シフトした。またアニオン性の亜鉛クロロフィル誘導体 **2** もカチオン性のヘキサアルギニンをもつクロロフィル誘導体 **5** ($n=6$) と 6:1 の比で複合化し、同様の長波長シフトを示した。このことからペプチド鎖と亜鉛クロロフィル誘導体とは分子間で静電的な相互作用によって定量的に複合化し、集積した亜鉛クロロフィルの間で色素間相互作用が発現することがわかった。さらに **2** の 13 位のカルボニル基をメチレン基に還元し、より短波長側の 623 nm に Qy 吸収帯をもつカチオン性亜鉛クロロフィル誘導体 **3** を新たに合成し、**4** との複合化を試みた。この新たに合成した **3** を THF/Tris-HCl 緩衝溶液=15/85 の溶液中で **4** ($n=6$) と混ぜ合わせると、**3** および **4** の発色団の Qy 吸収帯が 623 nm から 639 nm、666 nm から 677 nm へとそれぞれ長波長シフトした(図 2 (1))。また、

4 のペプチド鎖の長さを $n=2—6$ と変化させて **3** と複合化させた。このとき、色素間相互作用をもつ亜鉛クロロフィル部の量を 623 nm および 639 nm の吸収帯から見積もった(図 2 (2))。すると n の値が大きくなるほど色素間相互作用をもつ亜鉛クロロフィルが多くなり、 $n=5$ 以上のペプチド鎖を用いることで、色素間相互作用をもつ亜鉛クロロフィルが定量的に得られることがわかった。

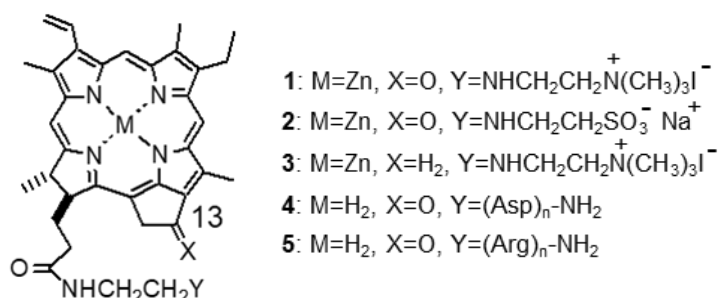


Figure 1. Structures of ionic zinc chlorophylls **1—3** and chlorophyll-appended peptides **4, 5**.

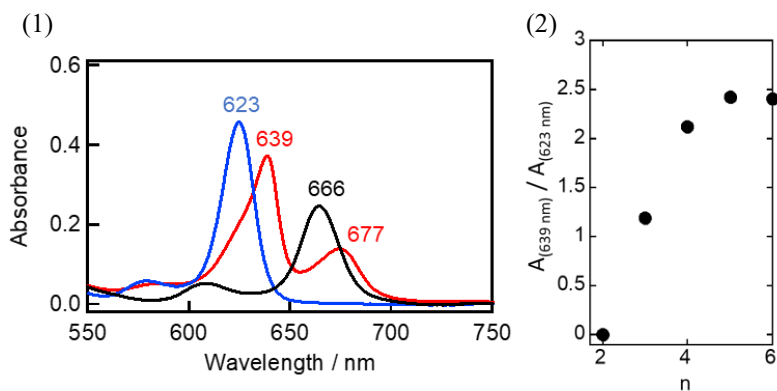


Figure 2. (1) Visible absorption spectra of **3** (blue) and **4** ($n=6$, black), complex of **3** and **4** (**3**:**4**=6:1, red) in THF / Tris-HCl Buffer (pH 8.0) =15 / 85 (v/v); (2) Ratios of associated (A_{639}) and non-associated (A_{623}) zinc chlorophylls **3** in complexes with several peptide-appended chlorophylls (**4**: $n=2—6$).

拡張された自己集合中空錯体へのタンパク質の包接

○海老原梨沙¹・中間貴寛¹・藤田大士²・藤田誠^{1,3}

(¹東大院工, ²京大 iCeMS, ³分子研)

Protein Encapsulation within an Expanded Self-assembled Hollow Cage (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹, Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University², Institute for Molecular Science³) EBIHARA, Risa¹; NAKAMA, Takahiro¹; FUJITA, Daishi²; FUJITA, Makoto^{1,3}

タンパク質の人工ホストへの包接は、空間的な隔離・固定化による特異な安定化・機能制御を実現する。当研究室では、有機二座配位子 **1** (L) と Pd(II) イオン (M) の自己組織化により形成する $M_{12}L_{24}$ 自己集合中空錯体へのタンパク質の包接を達成した (Fig. 1a)¹。2-ホルミルピリジル基によるタンパク質 N 末端修飾反応²を用いることで、タンパク質を天然構造のまま包接し、その安定性を飛躍的に向上させた。さらに、その特長的な一義内部空間を用いたタンパク質構造解析法への展開が期待される。しかしながら、錯体 **I** の内径は 5 nm であり、最大で直径約 4 nm、200 残基ほどのタンパク質しか包接できなかった。そのため、多様なタンパク質を包接可能な汎用性の高い新規手法の開発が望まれていた。

本研究では、内部空間の拡張された $M_{12}L_{24}$ 中空錯体 **II** を構築し、従来よりも大きなタンパク質の包接を行った (Fig. 1b)。アセチレンスパーサーを追加した配位子 **2** から成る中空錯体 **II** は、モデリングにより内径 6 nm まで拡張されると見積もられた。12 ステップ、総収率 5.7% で合成した配位子 **2** を用いて、先行研究よりも大きなタンパク質エラスターゼ (5.2 nm, 240 a.a.) の包接を行った (Fig. 1c)。エラスターゼと配位子 **2** を縮合した後、Pd(II) イオンとの錯形成をワンポットで行い、中空錯体 **II** への包接を試みた。¹H NMR では、エラスターゼとともに $M_{12}L_{24}$ 錯体に特徴的なブロードなピークが観測された。さらに、¹H DOSY NMR により分子の自己拡散係数からその大きさを見積もり、タンパク質の包接を評価した。エラスターゼ由来のピークの拡散係数 ($\log D = -10.25$) は、エラスターゼ単体の拡散係数 ($\log D = -9.98$) から大きく減少し、錯体ケージと同一の値を示した (Fig. 1c)。これは、中空錯体 **II** 単体の拡散係数 ($\log D = -10.22$) と同程度であることから、先行研究と同様に中空錯体 **II** へエラスターゼを包接したことが示された。さらに、タンパク質包接錯体 **II** の拡散係数 ($\log D = -10.25$) は、タンパク質包接錯体 **I** の値 (Fig. 1a, $\log D = -10.14$) よりも小さく、球状錯体が設計通り拡張されたことも確かめられた。以上より、自己集合 $M_{12}L_{24}$ 中空錯体を拡張し、これまでよりも大きな直径 5 nm 以上のタンパク質の包接を達成した。本発表では、その他のタンパク質の包接と共に、包接されたタンパク質の性質・安定性についても議論する。

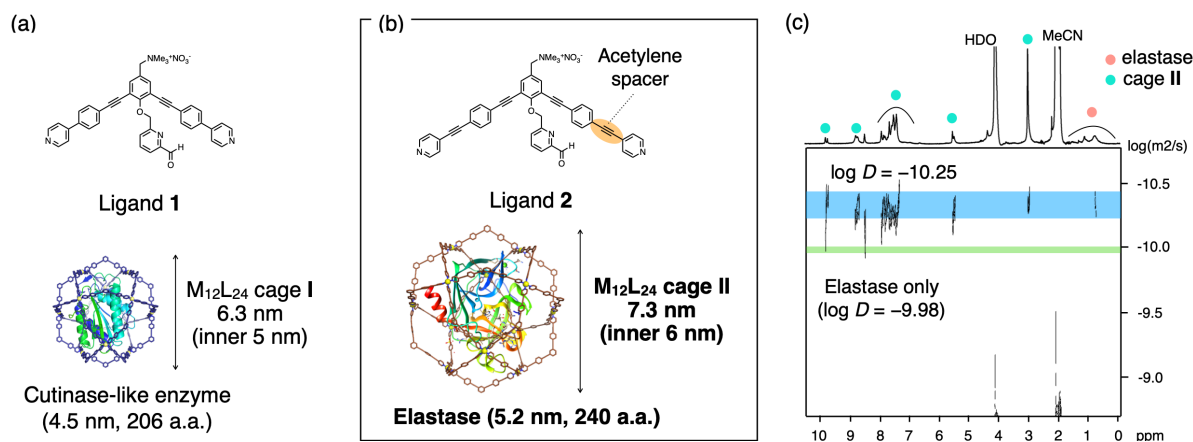


Fig. 1 (a, b) Encapsulation of a protein within a self-assembled hollow $M_{12}L_{24}$ cage. Cage **II** with an extended cavity (b) was constructed to encapsulate larger proteins than those by the previous cage **I** (a). (c) ¹H DOSY NMR analysis of the encapsulation of elastase within cage **II** (500 MHz, $D_2O/CD_3CN = 1:1$, 300 K).

- 1) (a) D. Fujita *et al.*, *Nat. Commun.* **3**, 1093 (2012); (b) D. Fujita *et al.*, *Chem*, accepted
- 2) J. I. MacDonald, H. K. Munch, T. Moore, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **11**, 326–331 (2015)

循環置換と α ヘリックス挿入を用いた3ユニット環状ヘムタンパク質の設計と構築

○藤原綱大¹・山中優¹・真島剛史¹・小林直也¹・大西遥喜¹・内橋貴之²・廣田俊¹
¹ (¹ 奈良先端大物質・² 名大院理)

Design and construction of the three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion

(Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology¹, Graduate School of Science, Nagoya University²) FUJIWARA, Kodai¹; YAMANAKA, Masaru¹; MASHIMA, Tsuyoshi¹; KOBAYASHI, Naoya¹; ONISHI, Haruki¹; UCHIHASHI, Takayuki²; HIROTA, Shun¹

天然では、秩序的に集合化した超分子構造をとることで機能を発揮するタンパク質が存在する。その機能発現機構を人工的に模倣し応用するために、自在にタンパク質超分子構造を構築する手法が求められている。

本研究室ではこれまでに、超好熱菌由来シトクロム *c*₅₅₅ のドメインスワップ二量体構造を基に、ヒンジループ前後でスワップする N 末端領域と C 末端領域の順番を入れ替え、接合部位に 9 残基の α ヘリックスリンカーを挿入

した循環置換タンパク質(circularly permuted Cyt *c*₅₅₅, CPC)を設計した(Fig. 1)¹。組み換え大腸菌を用いて発現させた CPC はエタノール処理や熱処理によってドメインスワッピングし、選択的に環状 3 量体を形成した。そこで、本研究では、三角形形状となるタンパク質構造体をより簡便かつ安定的に構築することを目指し、CPC を 3 分子連結したタンパク質(CPC₃)を構築し、環化条件の検討を行った。この CPC₃ は CPC の N 末端領域と C 末端領域の間に 2 つのシトクロム *c*₅₅₅ が挿入された分子に対応する。

培養・精製後の CPC₃ に終濃度 50% 以上になるようエタノールを添加し、凍結乾燥にてエタノールを取り除き、得られた粉末を再溶解させることで CPC₃ の環化を試みたところ、二量体、三量体、高次多量体の形成が確認された。エタノール処理前後の単量体では SEC における溶出位置がわずかにシフトし、単量体構造が溶液中で変化することが確認された。そこでエタノール処理前後の単量体構造を原子間力顕微鏡(AFM)を用いて観察したところ、CPC₃ の単量体はエタノール処理前では直鎖状構造をとり、エタノール処理により N 末端と C 末端が分子内で閉環した環状構造を形成することが示唆された(Fig. 2)。

[参考文献]

[1] A. Oda, et al., *Chem. Asian J.*, **13**, 964-967 (2018).

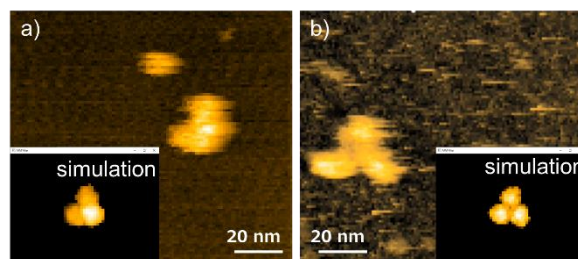
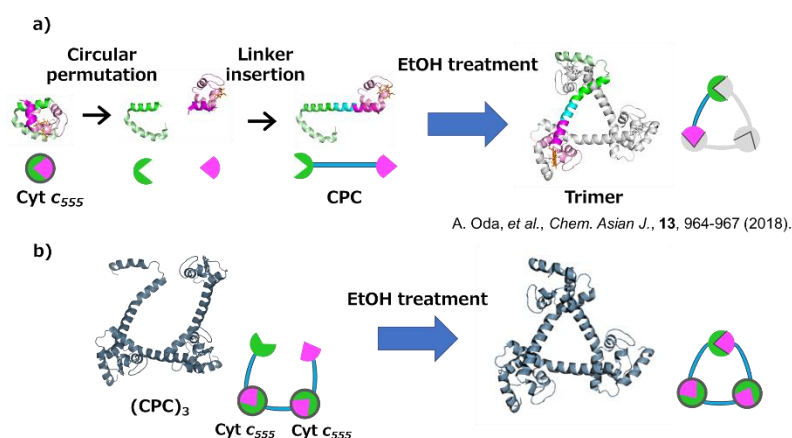


Figure 2. Representative and simulated AFM images of CPC₃ monomer a) before and b) after ethanol treatment.

セラミド誘導体の生細胞に対するアポトーシス活性

○辻村 晃也・木下 祥尚・松森 信明（九大院理）

Apoptotic activity of ceramide derivative towards living cells.(Graduate School of Science, Kyusyu University)

TSUJIMURA, Koya; KINOSHITA, Masanao; MATSUMORI, Nobuaki

セラミド(pCer ; Fig. 1)はスフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合をした構造をした細胞膜脂質の一つであり、細胞の分化や増殖などを引き起こすシグナル伝達物質としての重要な機能を担っている。また、セラミドは抗がん剤やストレスにより細胞内で増殖し、カスパーゼ群を活性化させることによってアポトーシスを誘導するとの報告があり、この機構として2つの仮説が立てられている¹⁾。一つはセラミドが受容体タンパク質と特異的に相互作用することでカスパーゼ群を活性化させるというもの、もう一つはセラミドが細胞膜で凝集し、ドメインを形成することによってカスパーゼ群を活性化させるというものである。しかし、セラミドによるアポトーシス誘導の詳細なメカニズムは解明されていない。一方、当研究室では、セラミドの頭部のヒドロキシ基を変えた各種セラミド誘導体を合成し (Fig. 2)、人工膜におけるドメイン形成能を評価した^{2), 3)}。本研究ではこれらのセラミド誘導体を生細胞に作用させアポトーシス活性を評価することで、セラミドドメイン形成能との関連について検討を行った。

まず Fig. 2 のセラミド誘導体を報告に従って再合成した。次にこれらの誘導体のアポトーシス活性を CHO-K1 細胞を用いて検討した。アポトーシス細胞ではホスファチジルセリンが細胞膜内葉から外葉に露出するため、ホスファチジルセリンに特異的に結合する Annexin V の蛍光標識体を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、pCerNH₂を除く全ての誘導体でアポトーシス活性が確認された (Fig. 3)。発表では、顕微鏡観察以外にフローサイトメトリーを用いたアポトーシス活性の定量評価の結果、およびセラミドドメイン形成との関連について議論する。

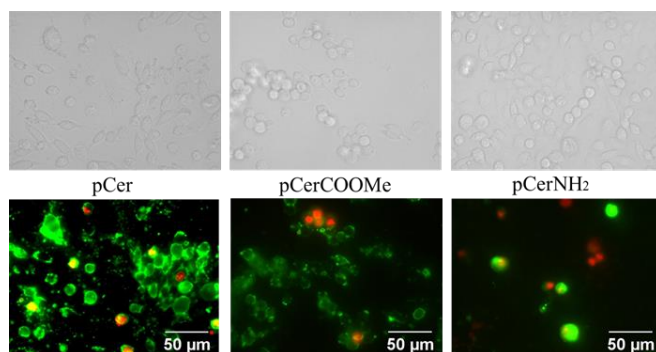


Fig. 3 アポトーシス観察 (一部)

上：位相差画像

下：蛍光顕微鏡画像

緑：アポトーシス細胞 赤：死細胞

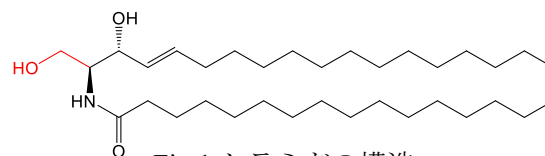


Fig.1 セラミドの構造

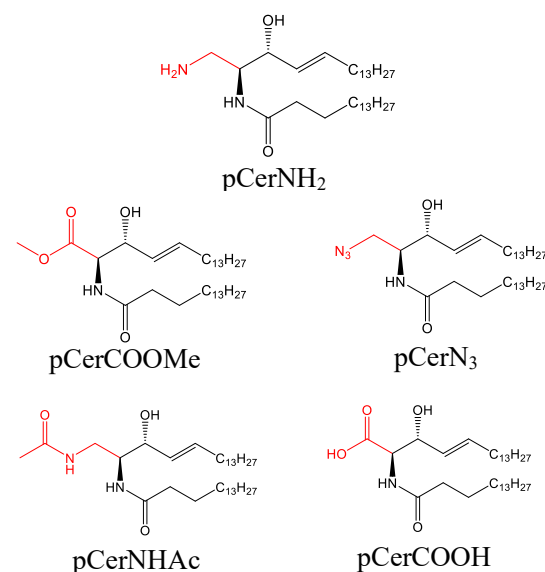


Fig. 2 セラミド誘導体の構造

(1) Y A. Hannun, L M. Obeid, Trends Biochem. Sci. 1995, 20 (2), 73-77.

(2) T. Matsufuji, M. Kinoshita, A. Möuts, et al., Langmuir 2018, 34 (1), 465-471.

(3) A. Möuts, E.Vattulainen, et al., Langmuir. 2018, 34 (51), 15864-15870.

糖鎖結合タンパク質のアフィニティーラベリングに向けた求電子性 マルチバレントプローブの開発

○鴨下潮音¹・櫻井香里¹ (¹東京農工大学院工)

Development of multivalent electrophilic probes for exploring carbohydrate binding proteins.

(Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology¹) Kamoshita Shione¹; Sakurai Kaori¹

糖鎖結合タンパク質の同定は、シグナル伝達に關与する細胞表層糖鎖の機能解明に重要である。このため、糖鎖をリガンドとしたアフィニティーラベリングプローブが開発されてきた¹⁾。しかし、多くの糖鎖-タンパク質間相互作用は結合強度が弱いため、親和性を利用して細胞プロテオームから糖鎖タンパク質を精製することは困難であった。当研究室では捕捉効率の改善に向けて、糖鎖リガンドと求電子基を多価に提示した金ナノ粒子アフィニティーラベリングプローブを開発した²⁾。このプローブは、糖鎖の局所的な濃度増大効果により、糖鎖結合タンパク質のラベリングを効率化した。そこで、求電子基をさらに探索することで、糖鎖結合タンパク質の高効率的な同定につながると考えた。本研究では、lactose と種々の求電子基を多価に共修飾した金ナノ粒子アフィニティーラベリングプローブを設計、合成し、モデル系結合タンパク質を用いた反応性解析を行った。Lactose および求電子基のモノマーを、金ナノ粒子結合部位を有するリポ酸の誘導体として合成し、リガンド交換法によって金ナノ粒子に修飾した。これらのプローブと lactose 結合タンパク質である PNA と RCA を反応させた後 (Fig. 1)、SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、蛍光イメージングによってラベル化効率を比較評価した。この結果、*p*-および *m*-arylsulfonyl fluoride 基が高いラベル化効率を示した。また、非標的タンパク質である BSA の共存下でラベリングを行ったところ、*m*-arylsulfonyl fluoride 基が最も高い選択性を示した。このことから、arylsulfonyl fluoride 基は未知の糖鎖結合タンパク質の捕捉に向けた金ナノ粒子アフィニティーラベリングプローブにおいて、ラベル化効率と選択性に優れた求電子基であることが示唆された。

1) Wu, H and Kohler, J, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2019**, 53, 173-182.

2) Suto, N, Kamoshita, S, Hosoya, S and Sakurai, K, *Angew.Chem.Int.Ed.*, **2021**,133,2-10

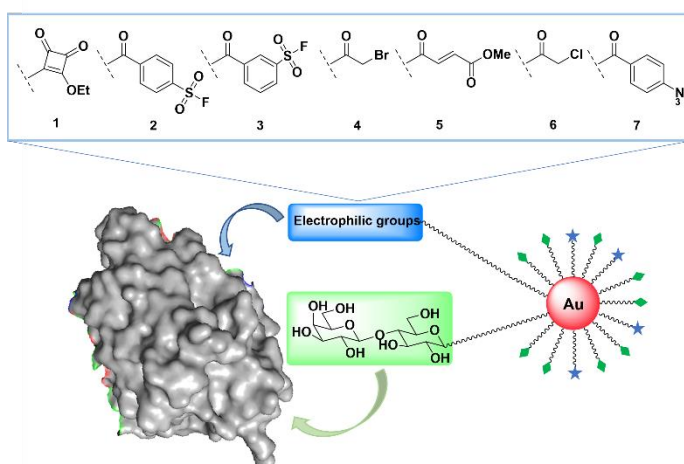


Figure 1. Affinity labeling of a carbohydrate binding protein by gold nanoparticle-based probes presenting ligands and electrophiles.

多糖-ポルフィリン誘導体ナノ複合体による光線力学療法

○山名啓太・河崎陸・杉川幸太・池田篤志（広大院先進理工）

Complex of porphyrin derivatives with polysaccharides for photodynamic therapy (Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University) YAMANA, Keita; KAWASAKI, Riku; SUGIKAWA, Kouta; IKEDA, Atsushi

近年の医療技術や科学技術の進展に伴って、がんの治療成績は向上してきた。それに伴って、患者の臓器を温存した低侵襲な治療法の開発が健康長寿社会の実現において求められている。そのような治療法の一つとして、光線力学療法（PDT）が挙げられる。PDT では生体透過性に優れた光照射によって励起された光増感剤（PS）が生成する細胞障害性の高い活性酸素種によりがん細胞を死滅させる。ここで活性酸素種の半減期が極めて短いことから、PS を腫瘍選択的に蓄積させることによって、がん細胞選択的な殺傷を実現することができる。PS として、生体透過性に優れた可視光領域に吸収帯を有するポルフィリン誘導体が広く用いられてきたが、一般にこれら π 共役系化合物は疎水性が高く、水中で容易に会合・凝集することによって、その機能を失ってしまうことが知られている。そのため、ポルフィリン誘導体のバイオメディカルの分野への応用は制限されてきた。

当研究室では、ボールミルを用いた多糖によるフラーレンなど π 共役系化合物の可溶化について報告してきた。この固相で機械的に混合する手法（高速振動粉碎法）の利用によって、疎水性の高い π 共役系化合物の水溶化を極めて簡便に行うことができる。そこで本研究では、本システムを光増感剤としてのポルフィリン誘導体へと拡張し、その光増感剤としての機能について評価した結果について報告する（図1）。ここで用いる多糖として、アニオン性多糖である λ -カラギーナン¹⁾と温度応答性多糖であるヒドロキシプロピルセルロース²⁾を採用した。

高速振動粉碎法によって、多糖-ポルフィリン誘導体を作製した。紫外可視吸収分光法の結果、ポルフィリンに由来するピークが観測され、確かに多糖によって、効率的に水中にポルフィリンが水溶化されていることが明らかとなった。また従来法である超音波法や加熱法と比較して、吸収ピークが大きかったことから、本システムの可溶化における有用性が示された。ここでポルフィリンに由来するスペクトルに着目すると、その概形がブロード化していたことから、多糖が形成するポリ

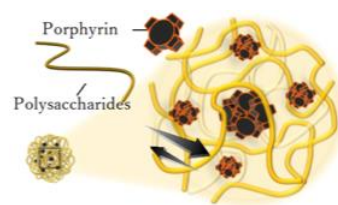


図1. 本研究の概要

マーマトリックス内部でポルフィリン誘導体は会合していることが示唆された。さらに蛍光スペクトル測定の結果、蛍光が消光していたことも、ポルフィリン誘導体が会合していることを支持している。また、複合体の粒子径が 200-300 nm と比較的小さな値を示すことが動的光散乱測定の結果から明らかした。また、ヒドロキシプロピルセルロースを用いた場合、これらの光機能や放出制御について、温度によって制御可能であった。

これらの複合体を用いてがん細胞（HeLa 細胞）に対する光線力学活性を評価したところ、光照射に基づく濃度依存的な細胞障害性が確認された。それだけでなく、その光線力学活性は臨床に用いられている PS（Photofrin）と比較して、非常に高い活性を実現させた。ここで、ヒドロキシプロピルセルロースを用いた系では、細胞内の発熱器官の一つであるミトコンドリアへの効率的な集積が確認され、細胞内の温度に応答することでミトコンドリア選択的な送達を実現し、効率的な細胞死を誘導したものと考えられる。以上の結果から、多糖-ポルフィリン誘導体複合体は優れた光線力学療法用治療薬として期待できる。

参考文献

1) K. Yamana, *et. al.*, *ACS Appl. Bio Mater.*, **3**, 3217. (2020). 2) R. Kawasaki, *et. al.*, *ACS Omega*, **6**, 3209. (2021).

タンパク質油中分散化技術を用いた経皮マラリアワクチンの創製

○田中 敬佑¹・南畑 孝介²・若林 里衣²・神谷 典穂^{2,3,4}・後藤 雅宏² (¹ 九大院工、² 九大院工学研究院、³ 次世代経皮吸収研究センター、⁴ 未来化学創造センター)

Development of transdermal malaria vaccine using protein oil dispersion technology (Kyushu University Graduate School of Engineering¹, Graduate School of Engineering, Kyushu University², Next Generation Transdermal Absorption Research Center³, Center for Future Chemistry and Innovation⁴) Keisuke, Tanaka¹; Kosuke, Minamihata²; Rie, Wakabayashi^{2,3}; Noriho, Kamiya^{2,3,4}; Masahiro, Goto^{2,3,4}

1. 緒言

マラリアは、マラリア原虫がハマダラカによって媒介され、吸血時にヒト体内へ侵入し、肝細胞および赤血球を破壊しながら増殖することで、貧血や、腎不全などを引き起こす感染症である。マラリアワクチンが必要とされる地域の多くでは医療体制が不十分であり、注射を行う医療従事者の不足や、注射によって生じる皮膚の損傷が新たな感染症の原因になるといった問題点が存在する。

本研究では、非侵襲的かつ簡便な、「塗るマラリアワクチン」の開発を目的とした。皮膚を介して抗原を体内に送達する戦略として Solid-in-oil (S/O) 化技術を選択した。この技術は親水性分子を疎水性界面活性剤で被覆することで油中分散させる技術であり、皮膚に馴染みやすい油中へ分散させることで良好な皮膚浸透性が期待できる。今回は、S/O 化技術をマラリア抗原へ適用することで、マラリアワクチンの経皮製剤化を試みた。本発表では、マラリア抗原である Pvs25 を内包した S/O 製剤の抗体産生能について報告する。

2. 実験

Pvs25 水溶液を L-195/cyclohexane 溶液へ加え、ホモジナイザーで高速攪拌することで W/O エマルションを形成させ、凍結乾燥を行った。凍結乾燥後の Pvs25/L-195 複合体を Isopropyl myristate 中に分散させ、Pvs25 を内包した S/O 製剤を調製した。ナノ粒子を形成しているかの確認のため、動的散乱光法 (DLS) 測定によって粒子系を測定した。BALB/c マウスの背部を除毛し、調製した S/O 製剤を添加したパッチを 24 h 貼付し、経皮投与を行った。経皮投与は 1 週間おきに計 3 回行った。最終投与から経時的に採血を行い、ELISA 法によって血清中に含まれる Pvs25 に対する IgG の定量を行った。

3. 結果および考察

Fig.1 へ調製した S/O 製剤の DLS 測定結果を、**Fig.2** へ免疫化後のマウス血清中における抗体価 (Total IgG) 測定結果を示す。DLS 測定結果から、200 nm 程のピークが確認され、PDI 値も低いことから、S/O 化によって均一なナノ粒子が形成されたことが確認された。抗体価測定結果から、Pvs25 水溶液を注射した群は採血初期から高い抗体価を示した。一方、S/O 製剤を経皮投与した群では、免疫化後 16 日目以降から抗体価の顕著な上昇が確認され、43 日目の血清では注射群に匹敵する抗体価が確認された。中長期的に抗体価上昇が見られる現象は、経皮製剤によるワクチンではしばしば見られる現象ではあるが、表皮中に存在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞への抗原送達から、免疫誘導までの過程が、注射とは異なる経路を辿っているためではないかと考えられる。これらの結果から、Pvs25 を S/O 化することで、経皮マラリアワクチンとして利用できる可能性が示唆された。

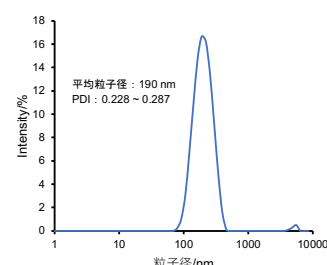


Fig.1 S/O 製剤の DLS 測定結果

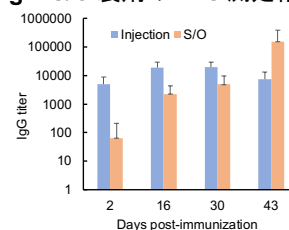


Fig.2 抗 Pvs25 抗体価測定結果

トランスクリプトーム及びゲノム変異解析を用いた

分子標的薬投与後の肺がん微小領域における細胞多様性の解明

○山崎美輝^{1,2}・松永浩子³・細川正人^{1,3}・有川浩司³・鈴木直子³・林大久生⁴・竹山春子^{1,2,3,5} (¹ 早大院先進理工、² 産総研早大 CBBDOIL、³ 早大ナノライフ創新研、⁴ 順大人体病理病態学講座、⁵ 早大生命動態研)

Transcriptome and genome mutation analysis of non-small cell lung cancer for elucidation of cell diversity in cancer microenvironment after EGFR-TKI treatment (Department of Advanced Science and Engineering, Waseda University¹, CBBDOIL, AIST-Waseda University², Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University³, Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Department of Human Pathology, Graduate School of Medicine, Juntendo University⁴, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University⁵) YAMAZAKI, Miki^{1,2}; MATSUNAGA, Hiroko³; HOSOKAWA, Masahito⁴; ARIKAWA, Koji³; SUZUKI, Naoko³; HAYASHI, Takuo⁵; TAKEYAMA, Haruko^{1,2,3,6}

がん組織は、形態や増殖性、薬剤耐性の異なる細胞集団で構成されており、それら細胞の相互作用により病態が形成される。分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤など、がん特有の分子を標的とした薬剤の開発により、無増悪生存期間は改善されている。しかし、細胞多様性や蓄積されたゲノム変異による薬剤耐性が課題となっている。当研究室では、空間情報を用いた生体組織の包括的な解析を目指し、生体組織の微小領域(直径100μm)を網羅的かつ高速に採取する独自のシステムを開発してきた¹⁾。また、当システムを用いた微小領域の遺伝子発現解析における検出感度の向上、及び微小領域を対象としたマルチオミクス解析に向けて研究開発を行なっている²⁾。本研究では、分子標的薬投与後の肺がん微小領域における細胞多様性を捉え、薬剤耐性マーカーの特定を目指した。

分子標的薬投与後の EGFR 変異陽性肺がん組織から、正常部位、残存する腫瘍部位、腫瘍周辺の間質、寛解部の間質を、形態学的に分類した上で採取した。比較対象として、薬剤投与前の腫瘍部位を採取した。各微小領域から遺伝子発現情報及びゲノム情報を取得し、細胞型の比較や相互作用を予測した。薬剤投与後の腫瘍部位では投与前に比べて、細胞外マトリックスと受容体の相互作用が活性化しており、薬剤耐性機構への影響が示唆された。腫瘍周辺の間質は寛解部の間質と比較して、免疫チェックポイント阻害剤の標的である PD-L1 発現と PD-1 チェックポイント経路の活性化が見られた。今後更に知見を積み重ねることで、がん微小環境における各細胞の薬剤応答を捉え、新たな耐性獲得メカニズムの解明が期待される。

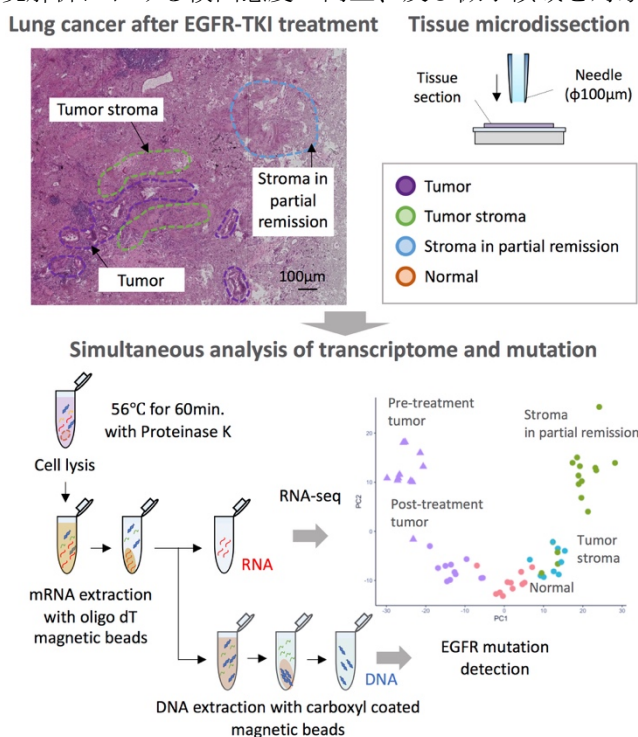


Fig 1. Workflow of transcriptome and genome mutation analysis of micro-tissue in non-small cell lung cancer

1) T. Yoda, M. Hosokawa, K. Takahashi, C. Sakanashi, H. Takeyama, H. Kambara, *Sci. Rep.*, 7(1), 1-11 (2017)

2) M. Yamazaki, M. Hosokawa, K. Arikawa, K. Takahashi, C. Sakanashi, T. Yoda, H. Matsunaga, H. Takeyama, *Sci. Rep.*, 10(1), 1-8(2020)

金選択的回収機能を有するアントラセン誘導体の合成

○寺村 駿吾¹・今井 崇人¹・浅野 昌弘²・富崎 欣也¹ (龍大理工)

Synthesis of An Anthracene Derivative with Selective Gold Recovery Mechanism (¹Department of Materials Chemistry, ²Course of Environmental Ecological Engineering, Ryukoku University) TERAMURA, Shungo; IMAI, Takahito; ASANO, Masahiro; TOMIZAKI, Kin-ya

貴金属は、化学的安定性、電気伝導性、触媒能を有することから、電子部品などに用いられ、AI技術が発展してきた現代社会において、欠かせないものとなっている。しかし、生産量が少なく、埋蔵量も限られているため、廃電子部品や工業廃液などの産業廃棄物からの貴金属回収の重要性が高まっている。貴金属の回収方法として、種々産業化されているものの、均一・低濃度溶液からの貴金属回収については更なる技術開発が必要である。当研究室では、貴金属回収方法として、自己集合化能を有するペプチドを利用して、貴金属イオン濃度を局所的に高め、希薄貴金属混合水溶液からの選択的回収が可能であると考えた^{1,2,3)}。これまでに当研究室では、HAuCl₄とH₂PtCl₆の希薄混合水溶液から金イオンをより優位に還元鉱物化するペプチド (RU065₄₋₈: Ac-K-A-2Ant-K-I-NH₂) (Fig. 1) を得ている。本研究では、産業応用を指向して、RU065₄₋₈の構造を基に、非ペプチド性のアントラセン誘導体 (diAnt) を化学合成し、金選択的回収機能の評価を行った。本研究で用いる diAnt は RU065₄₋₈ の構造を基に、金イオンに電子を与えるためのアントラセン環を含み、AuCl₄⁻ 取り込みのためのカチオンおよび分離回収を容易にするための水素結合性基を含む構造とした (Fig. 2)。合成した diAnt を ¹H-NMR、¹³C-NMR および MALDI-TOF-MS にて同定した。芳香族化合物を低濃度の塩酸に溶解させた溶液と、HAuCl₄とH₂PtCl₆の希薄混合水溶液を混合し、40℃、24 時間反応 ([HCl] = 0~50 mM, [HAuCl₄] = 50 μM, [H₂PtCl₆] = 50 μM, [diAnt] = 200 μM) させた。反応溶液の UV-vis スペクトルを測定したところ、[HCl] = 0~1 mM の範囲で金ナノ粒子特有のピークが見られたが、塩酸濃度の増大により、白金粒子のピークが顕著に見られた。塩酸 1 mM において、回収した沈殿物を FE-SEM (EDS) を用いて分析したところ、沈殿物の Au/Pt 原子数比は約 12 であり、反応溶液の上澄み溶液を ICP-OES を用いて分析したところ、97%の金イオンが還元された。

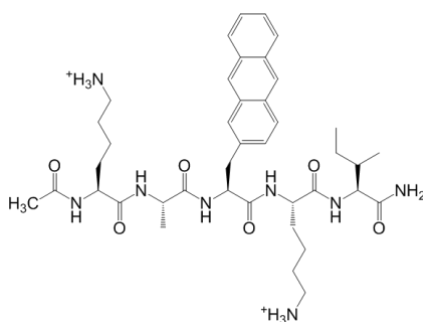
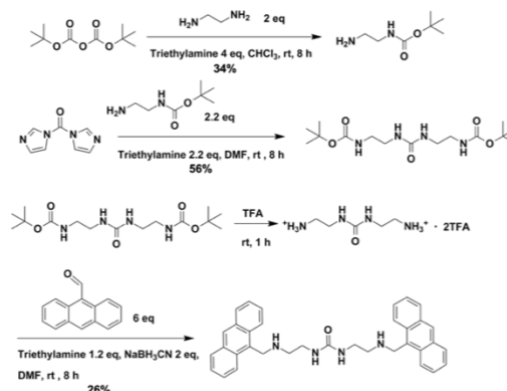
Fig. 1. RU065₄₋₈ ペプチドの構造

Fig. 2. diAnt の合成経路

- 1) Tomizaki, K.-Y. et al. *Langmuir* **2014**, *30*, 846-856.
- 2) Tomizaki, K.-Y. et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 7282-7291.
- 3) Tomizaki, K.-Y. et al. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5060.