

ポスター発表(1日目)

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

■ 偶数 (1P-002~1P-048)

[1P-002] Methyl-CpG-binding domain融合Luciferaseを用いたCpG特異的メチル化レベル測定法の開発

*後藤 綾乃¹、吉田 亘¹ (1. 東京工科大院バイオニクス)

[1P-004] Yn設計ペプチドによる細胞内でのクラスター形成を伴う蛋白質間相互作用解析

*橋本 匡浩¹、三木 卓幸¹、中井 太一¹、三原 久和¹ (1. 東京工業大学 生命理工学院)

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

*Liu Hanrui¹、Kuroda Daisuke¹、Ueki Ryosuke¹、Sando Shinsuke¹ (1. The University of Tokyo)

[1P-008] 非天然アミノ酸を導入した抗菌ペプチドフォルダマーの開発

*平野 元春^{1,2}、齋藤 千尋³、川野 竜司³、三澤 隆史²、出水 庸介^{1,2} (1. 横浜市大院生命医科学、2. 国立衛研、3. 農工大院生命工)

[1P-010] Tau由来ペプチドとの光架橋による微小管の構造安定化

*渡 宗英¹、稲葉 央¹、Arif Md. Rashedul Kabir²、角五 彰²、佐田 和己²、松浦 和則¹ (1. 鳥取大院工、2. 北大院理)

[1P-012] 植物ホルモナー受容体相互作用に寄与する拡張デグロン配列の同定

*中山 美涼¹、齊藤 里菜²、林 謙吾¹、野本 春菜¹、高岡 洋輔¹、齋藤 大明³、山神 壮平²、武藤 俊哉¹、上田 実^{1,2} (1. 東北大学大学院理学研究科、2. 東北大学大学院生命科学研究科、3. 北陸大学薬学部)

[1P-014] 細胞内タンパク質結晶を利用した天然変性タンパク質の構造解析

*小島 摩利子¹、安部 聡¹、上野 隆史¹ (1. 東京工業大学生命理工学院)

[1P-016] ラッソ・グラフト改変VenusによるCD24-Siglec10免疫チェックポイント阻害剤の開発

*黄 薇恩¹、寺坂 尚紘¹、菅 裕明¹ (1. 東京大学理学部)

[1P-018] Dicer-PAZ/PlatformとdsRNAの光クロスリンク解析による基質認識機構の解明

*鈴木 駿也¹、横田 徳子¹、津田 弘貴¹、神谷 由紀子¹、浅沼 浩之¹ (1. 名古屋大学工学研究科生命分子工学専攻)

[1P-020] 分子ストッパーによるAMPA型グルタミン酸受容体の活性制御

*三浦 裕太¹、小島 憲人²、浜地 格²、清中 茂樹¹ (1. 名大院工、2. 京大院工)

[1P-022] 天然化合物を擬似基質として利用可能なP450BM3変異体の指向性進化法による開発とその構造解析

*横山 侑弥¹、唐澤 昌之¹、有安 真也¹、愛場 雄一郎¹、杉本 宏^{2,3}、荘司 長三^{1,2} (1. 名大院理、2. JST CREST、3. 理研 Spring-8)

[1P-024] タンパク質酸化的フォールディングを促進する低分子化合物の官能基配置効果

*岡田 隼輔¹、松崎 元紀²、奥村 正樹³、村岡 貴博^{1,4} (1. 東京農工大学工学府、2. 徳島大学先端酵素学研究所、3. 東北大学学際フロンティア研究所、4. 東京農工大学グローバルイノベーション研究院)

[1P-026] 天然・転写tRNAによるSer/Leu交換遺伝暗号の翻訳高効率化

*藤野 公茂¹、戸崎 将弘¹、村上 裕^{1,2} (1. 名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻、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-028] メンブレンコンタクトの化学遺伝学操作を介した膜脂質代謝の可逆制御

*吉川 優¹、阿喰 萌香²、中津 史³、築地 真也¹ (1. 名古屋工業大学工学研究科、2. 名古屋工業大学工学部、3. 新潟大学医歯総合研究科)

[1P-030] 固定化駆動法による脳内での分子動態解析を指向した新規プローブの開発

*對馬 暁洋¹ (1. 京都大学大学院工学研究科)

[1P-032] PET加水分解酵素と高付着性タンパク質の連結体構築

*澤田 美波¹、吉本 将悟¹、堀 克敏¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科)

[1P-034] インクジェット装置による膜透過性ペプチドを用いた細胞内導入技術の開発

*大村 美香¹、中瀬 生彦^{1,2} (1. 大阪府立大学 生命環境科学域 理学類 生物科学課程、2. 大阪府立大学 大学院理学系研究科)

[1P-036] 膜融合配列によるエンドソーム脱出促進を指向したペプチド性薬物キャリアの合成

*廣田 翔吾¹、今井 崇人¹、山崎 正幸¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)

[1P-038] ミトコンドリア移行シグナルペプチドを表面修飾した金ナノロッドの合成

*中村 翔也¹、今井 崇人¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)

[1P-040] 二つの異なる蛍光色素を修飾したタンパク質を構成要素とするハイドロゲルの調製

*印南 拓希¹ (1. 阪大院工)

[1P-042] 液-液相分離による抗体と高分子送達ペプチドの濃縮と抗体の細胞内送達

*岩田 恭宗¹、広瀬 久昭¹、坂本 健太郎¹、平井 勇祐¹、Arafiles Jan Vincent V.¹、秋柴 美沙穂¹、今西 未来¹、二本 史朗¹ (1. 京大化研)

[1P-044] 2'-β-プロパルギルセレノヌクレオシドを用いた逆転写酵素不可逆阻害の機構解析

*吉田 祐希¹、新美 結士¹、伏原 大地¹、村瀬 裕貴¹、木村 康明¹、阿部 洋^{1,2,3} (1. 名古屋大学大学院 理学研究科 物質理学専攻 (化学系)、2. JST CREST、3. iGCORE)

[1P-046] 核酸医薬への応用を指向したStaple核酸の短鎖化および安定性の追求

*木田 朋輝¹、勝田 陽介¹、嘉村 匠人¹、北村 裕介¹、萩原 正規²、佐藤 慎一³、井原 敏博¹ (1. 熊本大学大学院先端科学研究部、2. 弘前大学理工学部、3. 京都大学化学研究所)

[1P-048] 効率的な遺伝子発現能を有する超巨大人工細胞の構築を目的とした超巨大リポソーム調製法の改良

*高橋 萌¹、小川 敦司¹ (1. 愛媛大PROS)

Methyl-CpG-binding domain 融合 Luciferase を用いた CpG 特異的メチル化レベル測定法の開発

○後藤 綾乃・吉田 亘（東京工科大院バイオニクス）

Development of CpG methylation level measurement system using Methyl-CpG-binding domain fused luciferase (Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology) GOTO, Ayano; YOSHIDA, Wataru

DNA メチル化とは主にシトシン・グアニン塩基(CpG)配列中のシトシンの 5 位がメチル化される反応であり、遺伝子発現制御において重要な役割を果たしている。正常な細胞では正常なメチル化パターンが形成されているが、がん細胞では異常なメチル化パターンが形成されているため、これはがんのバイオマーカーとして利用できる。がん細胞における異常なメチル化パターンの特徴として、①遺伝子特異的なメチル化状態の異常と、②ゲノム DNA 全体のメチル化レベルの低下があげられる。本研究ではこれまでに、Methyl-CpG-binding domain (MBD)と Firefly Luciferase (Fluc)の融合蛋白質(MBD-Fluc)を構築し、これを用いたゲノム DNA 全体のメチル化レベル測定法を開発した^{1,2)}。これは MBD-Fluc と DNA インターカレーターで起こる生物発光共鳴エネルギー移動を利用した方法である。そこで、本研究では MBD-Fluc を用いて遺伝子特異的なメチル化レベル測定法を開発することを目的とした(Fig.)。想定した原理を以下に示す。メチル化した一本鎖プローブ DNA を固相に固定化し、そこに標的遺伝子をハイブリダイゼーションさせる。標的遺伝子がメチル化されている場合は固相で形成される二本鎖 DNA は両鎖ともメチル化されたフルメチル化状態となる。一方、標的遺伝子がメチル化されていない場合は固相で形成される二本鎖 DNA はプローブ DNA のみメチル化されたヘミメチル化状態となる。MBD はフルメチル化 DNA に特異的に結合するため、結合した MBD-Fluc 量をルシフェラーゼの活性を指標に測定すれば標的遺伝子のメチル化レベルを測定できると想定した。

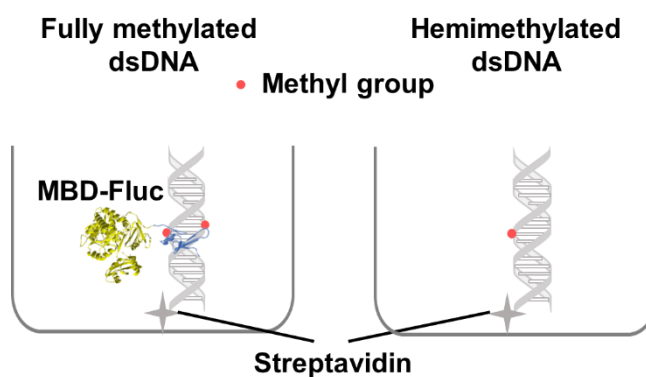


Fig. MBD-Fluc を用いた遺伝子特異的メチル化レベル測定法の原理図

本研究では結腸直腸癌で高度にメチル化されている *SEPT9* を標的遺伝子として用いた。pET30c-*StreptagII-MBD-Fluc* で形質転換した大腸菌 BL21 (DE3)を培養し、OD₆₀₀ = 0.7 の時に 1.2 mM IPTG を添加し、MBD-Fluc の発現誘導を行った。得られた湿菌体を破碎し、水溶性画分を調製し、Strep-Tactin カラムを用いて MBD-Fluc を精製した。精製画分を SDS-PAGE により解析を行った結果、目的の位置付近にバンドが確認されたことから、MBD-Fluc を精製できたことが示された。次に、ビオチン修飾メチル化 *SEPT9* プローブ DNA をストレプトアビジンプレートに固定化した。化学合成したメチル化 *SEPT9* DNA または非メチル化 *SEPT9* DNA をそれぞれ添加し、ビオチン修飾メチル化 *SEPT9* プローブ DNA にハイブリダイゼーションさせた。そこに MBD-Fluc を添加し、洗浄後、発光基質であるルシフェリンを加えルシフェラーゼの活性を測定した。その結果、メチル化 *SEPT9* DNA を添加した場合において高い発光強度が観察された。つまり、本手法によりメチル化 *SEPT9* DNA を検出できることが示された。

1) W. Yoshida, Y. Baba, I. Karube, *Anal. Chem.*, **88**, 9264 (2016)

2) Y. Baba, I. Karube, W. Yoshida, *Anal. Lett.*, **52**, 754, (2019)

Yn 設計ペプチドによる細胞内でのクラスター形成を伴う蛋白質間相互作用解析

○橋本匡浩¹・三木卓幸¹・中井太一¹・三原久和¹ (¹ 東工大生命理工)

In Cell analysis of protein-protein interaction accompanied by cluster formation by Yn-designed peptides

(School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology¹) HASHIMOTO, Masahiro¹; MIKI, Takayuki¹; NAKAI, Taichi¹; MIHARA, Hisakazu¹

細胞内のシグナル伝達や液-液相分離などの様々な生理イベントにおいて、蛋白質のクラスター化を契機として生じる蛋白質間相互作用がよく見られる。個々の蛋白質間の相互作用は弱い、クラスター化により局所的に濃度が高まることで、パートナーと強く相互作用できる。このようなクラスター化と相互作用の関連を解析するためには、「細胞内で Bait 蛋白質を人工的に集積化し、その濃縮率を人為的に変化させ、Prey 蛋白質との結合を評価できる技術」が重要である。当研究室では、細胞内で蛋白質を集積化できる Y15 ペプチドタグ (YEYKYEYKYEYKYEY) を開発し、Y15 を融合した AzamiGreen (Y15-AG) が細胞内で顆粒状の集合体を形成することを見出している¹⁾。さらに、Y15-AG の集合体をスキヤホールドとし、そこに機能性の蛋白質を Y15 の融合により濃縮することができた。そこで我々は Y15 の鎖長を短縮して相互作用点を減らした 4 つのガイドタグを開発することで、Y15-AG スキヤホールドに対するガイドタグ融合 Bait 蛋白質の濃縮率を制御し、Prey 蛋白質との結合を評価できると考えた (図 1)。

本研究では、まず鎖長の異なる 4 つの Yn ペプチド (9,11,13,15 残基) を mCherry に融合し、Y15-AG スキヤホールドへの濃縮率を CLSM 観察により評価した。その結果、鎖長依存的に濃縮率が増大し、Yn ペプチドは濃縮率が制御可能なガイドタグとして機能した。また、沈降アッセイや蛍光異方性測定においても、Y15-AG と Yn-mCherry の共集合を示した。

次に、これらのガイドタグを用いて、アダプター蛋白質 Nck (Bait) を異なる濃縮率で集積化させ、その相互作用パートナーである N-WASP 蛋白質 (Prey) との相互作用を CLSM 観察により評価した (図 2A)。その結果、Nck の濃縮率に比例して、N-WASP がリクルートされた (図 2B)。さらに、Nck の濃縮率が低い Y9 タグ融合 Nck の場合、N-WASP の濃縮率の方が高い傾向にあった (図 2C)。N-WASP がバルクに拡散した Nck よりも、クラスター化した Nck とより強く相互作用することが示された。

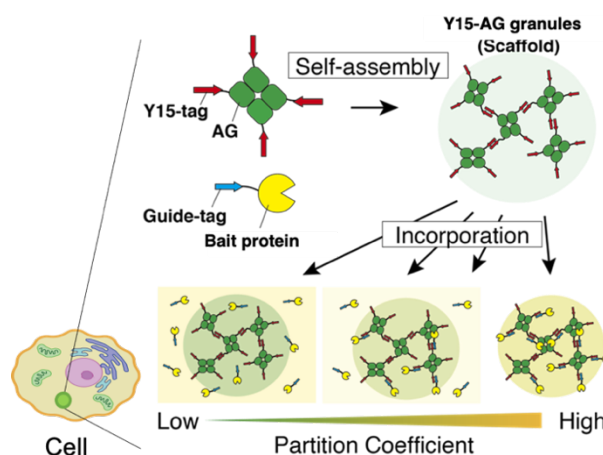


図 1. ガイドタグによる Bait 蛋白質の濃縮率制御の概要図

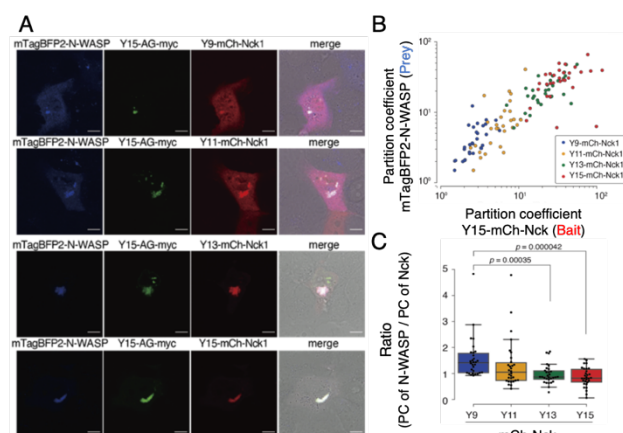


図 2. ガイドタグによる Nck (Bait) の濃縮および N-WASP (Prey) との相互作用解析 (A) Yn-mCh-Nck と mTagBFP2-N-WASP の CLSM 観察 (B) Nck と N-WASP それぞれの濃縮率 (C) Nck と N-WASP の濃縮率の比

[参考文献]

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

in silico 設計に基づく増殖因子のアゴニスト活性制御○劉翰睿¹・黒田大祐¹・植木亮介¹・山東信介¹ (¹ 東大院工)*In silico* design of growth factors with modulated agonistic activity (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹) LIU Hanrui¹; KURODA Daisuke¹; UEKI Ryosuke¹; SANDO Shinsuke¹

Cell surface receptors interact with various protein ligands such as growth factors, cytokines, and hormones. These soluble ligands induce or stabilize receptor dimerization, initiating intracellular signal transduction, which regulates various cellular functions like proliferation, differentiation, and immune responses. The cell signaling induced by these ligands plays an essential role in the development and maintenance of cellular activities.^{1,2} On the other hand, most of these signaling pathways are also associated with cancer development and metastasis.³ Therefore, protein ligands that can achieve a designated receptor activation level to lead a desired cellular phenotype hold great promise as safer therapeutics.⁴ Approaches to obtain such protein ligands include site-directed mutagenesis and *in vitro* evolution, which were commonly used for altering binding affinity, increasing thermal stability, and improving protein expression level.⁵ In recent years, computational methods have also been developed to predict optimal amino acid mutations for desired functions.⁶

In this research, we aim to establish a novel *in silico* design guideline for creating growth factors with controlled signal transduction intensity. To achieve this goal, we used Flex_ddG, one of the methods in the Rosetta macromolecular modeling suite, to computationally estimate binding free energies changes upon introduction of a mutation into a growth factor. Based on the prediction, mutations were introduced at the binding interface between the ligand and the receptor to produce different activation intensities of the receptor. Mutations were also designed at the ligand dimer interface to regulate ligand dimerization efficiency to control the dimerization efficiency of corresponding receptors. In this presentation, I will introduce *in silico* design of growth factor mutants, the expression and purification of protein ligands, and their characterization *in vitro*.

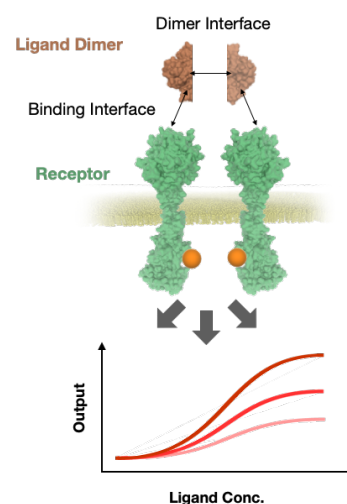


Figure. Fine-tuning of receptor signaling strength through design of protein-protein interface.

- 1) X. Wang, P. Lupardus, S. L. LaPorte, K. C. Garcia, *Annu. Rev. Immunol.*, **27**, 29 (2009).
- 2) M. Atanasova, A. Whitty, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **47**, 502 (2012).
- 3) M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Cell*, **141**, 1117 (2010).
- 4) C. C. M. Ho, A. Chhabra, P. Starkl, P. J. Schnorr, S. Wilmes, I. Moraga, H. S. Kwon, N. Gaudenzio, R. Sibilano, T. S. Wehrman, M. Gakovic, J. T. Sockolosky, M. R. Tiffany, A. M. Ring, J. Piehler, I. L. Weissman, S. J. Galli, J. A. Shizuru, K. C. Garcia, *Cell*, **168**, 1041 (2017).
- 5) D. S. Jones, A. P. Silverman, J. R. Cochran, *Trends in Biotechnology*, **26**, 9 (2008).
- 6) A. Morin, J. Meiler, L. S. Mizoue *Trends in Biotechnology*, **29**, 4160 (2011).

非天然アミノ酸を導入した抗菌ペプチドフォルダマーの開発

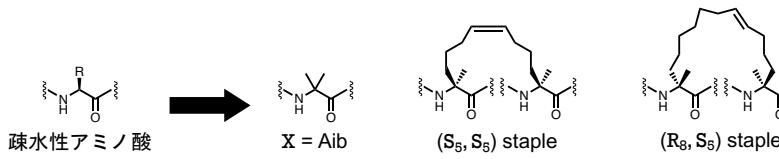
○平野元春^{1,2}・齋藤千尋³・川野竜司³・三澤隆史²・出水庸介^{1,2} (¹横浜市立生命医科学、²国立衛研、³農工大院生命工)

Development of antimicrobial peptide foldamers introducing non-proteinogenic amino acids (Grad. Sch. Med. Life. Sci., Yokohama City Univ.¹, NIHS², Dept. Biotech. Life Sci., Tokyo Univ. Agr. Tech.³) HIRANO, Motoharu^{1,2}; SAITO, Chihiro³; KAWANO, Ryuji³; MISAWA, Takashi²; DEMIZU, Yosuke^{1,2}

様々な細菌によって引き起こされる感染症には、ペニシリンをはじめ、多くの抗菌薬が発見され使用されてきた。しかし現在では、抗菌薬の長期使用や使用量の増加に伴い、従来の抗菌薬に対する耐性を獲得した薬剤耐性菌の出現が大きな問題となっており、新規抗菌薬の開発が求められている。そこで注目されているのが、抗菌ペプチド (Antimicrobial Peptides; AMPs) である。AMPs は従来の抗菌薬とは異なり、細菌の細胞膜を直接の作用点とすることから、AMPs に対する耐性を獲得しにくいと考えられている。

AMPs の抗菌活性発現には、ヘリカル構造の形成とカチオン性残基及び疎水性残基が空間的に分離して配置された両親媒性を示すことが重要であることが報告されている¹⁾。当研究室ではこれまでに、合理的な設計に基づいた AMPs の開発を行っており、顕著な溶血性を示すことなく強い抗菌活性を示す Magainin 2 誘導体 **17KKV**²⁾ 及び両親媒性ヘリカルペプチド **Stripe**³⁾を見出している。そのため、ペプチドのヘリカル構造を安定化することで、さらなる抗菌活性の向上が見込めると考えた。本研究では、**17KKV** 及び **Stripe** をリードとして、非天然アミノ酸を用いてペプチドのヘリカル構造制御を行う

ことにより、AMPs のさらなる高活性化を目指した。ペプチドのヘリカル構造を安定化させる手法として、 α, α -ジ置換アミノ酸 (disubstituted amino acid; dAA) の導入やアミノ酸側鎖の架橋化 (ステーブル) を用いた。具体的には、**17KKV** 及び **Stripe** の疎水性領域に dAA やステーブル構造を導入したペプチド **1-4** を設計・合成し、CD スペクトルを用いた二次構造や薬剤耐性菌を含むグラム陽性菌及びグラム陰性菌に対する抗菌活性評価、ヒト赤血球細胞に対する溶血活性評価を行なった³⁻⁵⁾ (Fig 1)。本発表では、その詳細について報告する。



Peptide	Sequence	MIC (μ M)			
		Gram (+)		Gram (-)	
		S.a.	E.c.	P.a.	MDRP
17KKV	G I K K F L K S A K K F V K A F K	6.25	3.125	1.56	N.D.
1	G I K K F L K S X K K F V K X F K	12.5	3.125	3.125	3.125
2	S ₅ I K K S ₅ L K S A K K F V K A F K	3.125	1.56	1.56	1.56
Stripe	K L L K K A G K L L K K A G K L L K K A G	12.5	3.125	3.125	3.125
3	K L L K K X G K L L K K X G K L L K K X G	3.125	1.56	1.56	1.56
4	K L L K K R ₅ G K L L K K S ₅ G K L L K K A G	25	6.25	12.5	25

S.a. : 黄色ブドウ球菌
E.c. : 大腸菌, P.a. : 緑膿菌, MDRP : 多剤耐性緑膿菌

Fig 1. 両親媒性ペプチドの設計と抗菌活性

- 1) H. Yokoo, M. Hirano *et al.*, *ChemMedChem*. **2021**, *16*, 1226-1233.
- 2) C. Goto, M. Hirano *et al.*, *ChemMedChem*. **2019**, *14*, 1911-1916.
- 3) T. Misawa, M. Hirano *et al.*, *MedChemComm*. **2019**, *10*, 896-900.
- 4) M. Hirano *et al.*, *Molecules*. **2021**, *26*, 444.
- 5) M. Hirano *et al.*, *ChemPlusChem*. **2020**, *85*, 2731-2736.

Tau 由来ペプチドとの光架橋による微小管の構造安定化

○渡宗英¹・稲葉央¹・Arif Md. Rashedul Kabir²・角五彰²・佐田和己²・松浦和則¹ (¹鳥取大院工、²北大院理)

Structural stabilization of microtubules by photocrosslinking of a Tau-derived peptide (Graduate School of Engineering, Tottori University¹, Graduate School of Science, Hokkaido University²) WATARI, Soei¹; INABA, Hiroshi¹; KABIR, Arif Md. Rashedul²; KAKUGO, Akira²; SADA, Kazuki²; MATSUURA, Kazunori¹

微小管はチューブリンの重合により形成される内径 15 nm のチューブ状細胞骨格であり、近年微小管に結合して安定化 (脱重合阻害)する薬剤が多数開発されている¹⁾。抗がん剤である Taxol は、微小管内部の疎水性ポケットに結合することで微小管の構造を安定化し、細胞分裂を抑制する。我々はこれまでに、微小管関連タンパク質 Tau から Taxol と同じ微小管内部ポケットに結合するペプチド TP を開発した²⁾。また TP ($K_d = 6.0 \mu\text{M}$)に比べ環状 TP がチューブリンにより強く結合 ($K_d = 0.94 \mu\text{M}$)し、微小管を安定化させることを見出している³⁾。しかし、TP や環状 TP とチューブリンの結合は可逆的であり、Taxol と比べ微小管安定化能が低いという課題があった。そこで、光反応によって標的タンパク質との間に共有結合を形成する光アフィニティラベル技術に着目した。光アフィニティラベル剤であるジアジリンは UV 光を照射することでカルベンとなり、近接する部位と共有結合を形成する。本研究では TP にジアジリンを導入することで、TP と微小管の光架橋による微小管安定化を試みた。赤色蛍光色素 TMR を修飾した TP (DA-TP-TMR)を合成し、微小管に内包後に UV 光照射を行うことで、チューブリンへの共有結合形成を利用した微小管安定化を試みた (図 1A)。

チューブリンと DA-TP-TMR を複合化後に UV 光を照射し SDS-PAGE の蛍光スキャンを行ったところ、チューブリン-TP 間の共有結合形成が示唆された。共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM)により DA-TP-TMR の微小管への局在が確認され、Taxol との競合実験により DA-TP-TMR が Taxol 結合部位に結合していることが明らかとなった。また UV 光照射後に Taxol を添加しても DA-TP-TMR が置

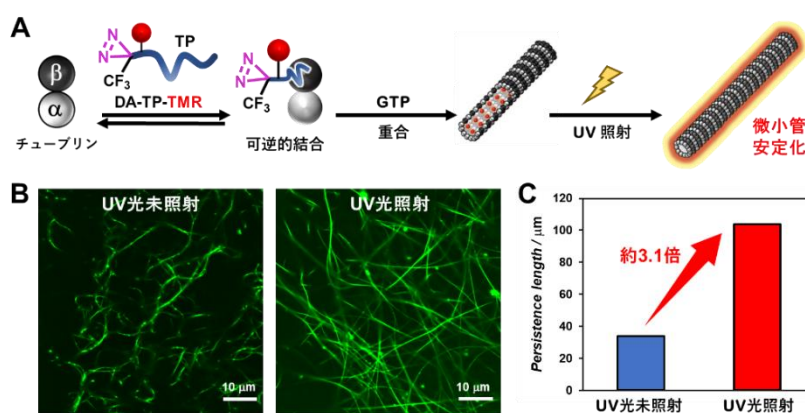


図 1. (A) DA-TP-TMR の内包と光照射による微小管安定化
(B) CLSM 像 (C) 微小管の持続長の比較

換されなかったため、UV 光照射により微小管と共有結合を形成することが明らかとなった。一般的に不安定な微小管が形成される GTP を用いて微小管の安定性評価を行ったところ、DA-TP-TMR を内包し UV 光照射すると安定な微小管が形成され、脱重合条件でも微小管構造の維持が確認された (図 1B)。UV 光照射により微小管の長さおよび持続長 (剛直性の指標)の増大が確認されたことから、光未照射時と比べ微小管構造が変化することが明らかとなった (図 1C)。現在、DA-TP-TMR を細胞内に導入することで、UV 光照射による微小管安定化を利用した細胞機能の光制御を検討している。

1) Y. Mimori-Kiyosue, *Cytoskeleton*, **68**, 603 (2011)

2) H. Inaba, T. Yamamoto, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Chem. Eur. J.*, **24**, 14958 (2018)

3) H. Inaba, M. Nagata, K. Juliano Miyake, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Polym. J.*, **52**, 1143 (2020)

植物ホルモン-受容体相互作用に寄与する拡張デグロン配列の同定

○中山美涼¹・齊藤里菜²・林 謙吾¹・野本春菜¹・高岡洋輔¹・齋藤大明³・山神壮平²・武藤俊哉¹・上田 実^{1,2} (¹東北大院理、²東北大院生命、³北陸大薬)

Extended JAZ degnon sequence for plant hormone binding in jasmonate co-receptor of tomato (Graduate School of Science, Tohoku University¹, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University², Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokuriku University²) NAKAYAMA, Misuzu¹; SAITO, Rina²; HAYASHI, Kengo¹; NOMOTO, Haruna¹; TAKAOKA, Yousuke¹; SAITO, Hiroaki³; YAMAGAMI, Souhei²; MUTO, Toshiya¹; UEDA, Minoru^{1,2}

ジャスモン酸イソロイシン (JA-Ile) は、生長阻害や防御応答などの多様な応答に関与する重要な植物ホルモンである。この作用は、JA-Ile が植物体内の F-box タンパク質 COI1 と天然変性タンパク質でもある転写リプレッサーJAZ からなる COI1-JAZ 共受容体と結合することで引き起こされる¹⁾。

モデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) における AtCOI1-JA-Ile-AtJAZ1 の結晶構造から、AtJAZ の COI1 結合ドメインである Jas motif のうち、短いデグロン配列(V/L)P(Q/T)AR(R/K)が JA-Ile と直接コンタクトすることが知られている²⁾(Fig. 1a)。また、AtJAZ1-13 のデグロン配列は相同性が 37.0 % と低く、AtJAZ デグロン配列のわずかな違いによって AtCOI1-JA-Ile との親和性 (K_d) に差が生じると考えられた³⁾ (Fig. 1a)。

今回我々は、トマト (*Solanum lycopersicum*) の SIJAZ1-13 (Fig. 1b) のうち、全く同じデグロン配列 LPIARR を持つ SIJAZ1-4/13 と SICOI1-JA-Ile との親和性に顕著な差が見られるという興味深い結果を得た⁴⁾。SIJAZ1-4/13 はデグロンの下流側 (down-stream-of-degnon、DOD、Fig. 1b) の配列 XSLX に違いがあり、この領域が親和性に影響を与えていることが示唆された。DOD 配列の影響を調べるために、配列を入れ替えたキメラ型の各種 SIJAZ 変異体を作製し、結合親和性評価を行った結果、JAZ デグロンと DOD を含む拡張デグロン配列 (Extended degnon、Fig. 1b) が、SIJAZ と SICOI1-JA-Ile との親和性に影響を与えていることが明らかになった。また、*in silico* docking study により、天然変性領域である DOD 配列は JA-Ile と直接相互作用しないが、SICOI1 との相互作用を増強し、親和性の違いに影響を及ぼすことが示唆された。近年、植物ホルモン受容体における天然変性領域の機能が注目されつつあるが⁵⁾、本発見は、植物ホルモン受容体のリガンド認識機構について新たな知見を与えるものと期待される。

(a) シロイヌナズナ



(b) トマト



Figure 1. (a) シロイヌナズナ、および (b) トマトにおける Jas motif のシーケンスロゴ

1) Wasternack, C., Hause, B., *Ann. Bot.*, **111**, 1021, (2013).

2) Sheard, L., *et al.*, *Nature*, **468**, 400, (2010).

3) Takaoka, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **294**, 5074, (2019).

4) Saito, R., *et al.*, *Sci. Rep.*, **11**, 13612, (2021).

5) Niemeyer, M., *et al.*, *Nat. Commun.*, **11**, 2277, (2020).

細胞内タンパク質結晶を利用した天然変性タンパク質の構造解析

○小島摩利子¹・安部聡¹・上野隆史¹ (¹ 東工大生命理工)Structure analysis of intrinsically disordered protein using in vivo protein crystal (Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Thechnology¹) KOJIMA, Mariko¹; ABE, Satoshi¹; Ueno, Takafumi¹

【緒言】近年、タンパク質結晶を外来分子や金属錯体の固定化により機能性固体材料として利用する研究が展開されている¹。タンパク質結晶はアミノ酸変異と X 線結晶構造解析による精密な設計検討が可能である。特に、高分解能性を有するタンパク質結晶への外来タンパク質の固定化は、単分子での結晶化が困難なターゲットタンパク質の構造解析を可能にすると期待されている。例えば、天然変性タンパク質(Intrinsically Disordered Protein; IDP)はその柔軟性の高さから従来法での結晶化が困難である²。これまでに報告されている IDP の立体構造は IDP の結合ターゲットタンパク質との複合体形成時の構造に制限されている。よって実験室で安定な複合体を形成しない多数の IDP に対する構造解析法は確立されていない。そこで私達は、多角体病ウイルスの感染により昆虫細胞内で結晶化するタンパク質結晶、Polyhedra crystal(PhC)に注目した³。PhC はアミノ酸置換や欠損による結晶エンジニアリング後でも X 線マイクロビームによる高分解能構造解析が可能のため、IDP を固定する鋳型結晶として利用できると考えた。さらに当研究室では、昆虫細胞内でのみ結晶化すると考えられていた PhC が無細胞タンパク質合成系でも結晶化し、高分解能の構造解析が可能であることを見出した(Fig.1a)。無細胞系合成による結晶化プロセスの迅速化は、網羅的な設計検討を可能にすると期待できる。本研究では、PhC を鋳型結晶として様々な IDP 由来ペプチドを融合した IDP 融合 PhC の構造解析を目的とし、無細胞系合成による結晶化と X 線結晶構造解析を試みた(Fig. 1c)。

【方法と結果】 PhC モノマーの N 末端, C 末端の Y224-Q248, 中間部の E70-N77(Loop1 領域; L1) をターゲット配列の融合箇所として選定した(Fig.1b)。HIF-1 α 由来ペプチドフラグメント HIF を融合した変異体 HIF-PhC, PhC Δ Cter-HIF, PhC Δ L1-HIF を設計した。コムギ胚芽由来無細胞系において各融合変異体の発現を行い、翻訳反応開始から 3 日後に得られる沈殿物を回収した。SDS-PAGE により発現確認を行い、SEM により沈殿物の外形を観察した。その結果、HIF-PhC と PhC Δ L1-HIF の立方体結晶形成が確認できた。得られた結晶に対し微小結晶用のビームラインである SPring-8 BL32XU にて X 線回折測定を行った。現在、回折データの解析と構造精密化を行っている。

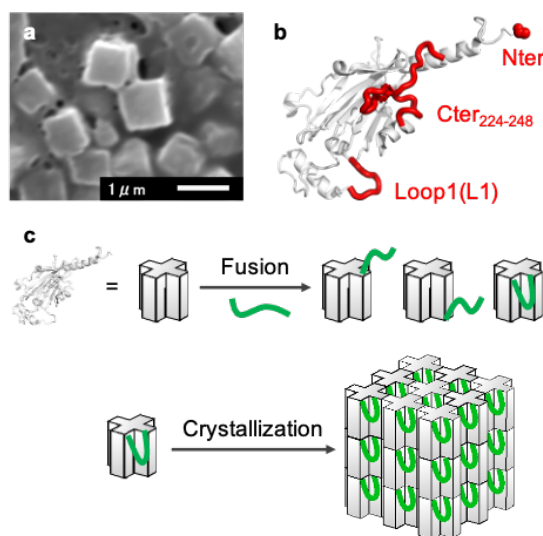


Fig.1 (a) コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系で結晶化した PhC の SEM 画像。(b) PhC モノマーの立体構造とターゲットタンパク質の融合箇所。(c) ターゲットタンパク質と PhC モノマーの融合変異体の結晶化。

[1] S. Abe and T. Ueno, *et al.*, *Chem. Commun.*, 2016, 52, 6496, [2] F. Delhommel, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 2020, 432, 2890, [3] F. Coulibaly, *et al.*, *Nature*, 2007, 446, 97

ラッソ・グラフト改変VenusによるCD24-Siglec10免疫チェックポイント阻害剤の開発

○黄薇恩¹・寺坂尚紘¹・菅 裕明¹ (1東京大学理学部)

Development of lasso grafted Venus-based CD24—Siglec-10 immune checkpoint inhibitor (Graduate School of Science, The University of Tokyo¹) HUANG, Wei-En¹; TERASAKA, Naohiro¹; SUGA, Hiroaki¹

Triple negative breast cancer (TNBC) is one of the lethal diseases affecting women and its lack of three marker receptors made it challenging for chemotherapy. In TNBC, the CD24-Siglec10 (sialic-acid-binding Ig-like lectin 10) axis is identified as the dominant innate immune checkpoint¹. (Fig. 1 (A)). Siglec-10 on tumor-associated macrophage (TAM) recognizes sialosides on CD24 surface. This interaction activates “Don’t eat me signal” assisting cancer cells to evade phagocytosis by macrophage¹. Currently, anti-CD24 antibody block CD24—Siglec-10 interaction and phagocytosis of macrophage to CD24-expressed cancer cell was increased¹. However, the development of antibody is relatively challenging especially in time and cost effectiveness issue.

In our lab, we developed a protein engineering technology, lasso-grafting to create a multi-functional therapeutic protein². In lasso grafting, we insert pharmacophore sequence of cyclic peptides (about 2 kDa) derived from RaPID³, an affinity-based screening platform to discover potent cyclic peptide inhibitor, into a protein scaffold. Both function of parental peptide and protein scaffold can be maintained. I aim to develop lasso-grafted Venus (yellow fluorescent protein)⁴ to inhibit CD24—Siglec-10 interaction. Venus is a structurally stable protein and can be used as an imaging tool with its own fluorescence. The cyclic peptides against Siglec-10 derived from RaPID were inserted into loops in Venus scaffold respectively. The grafted-Venus were successfully expressed by *E.coli* and showed binding affinity to Siglec-10. In future, this mono-grafted Venus is possible to achieve multi-functional by multi-grafting.

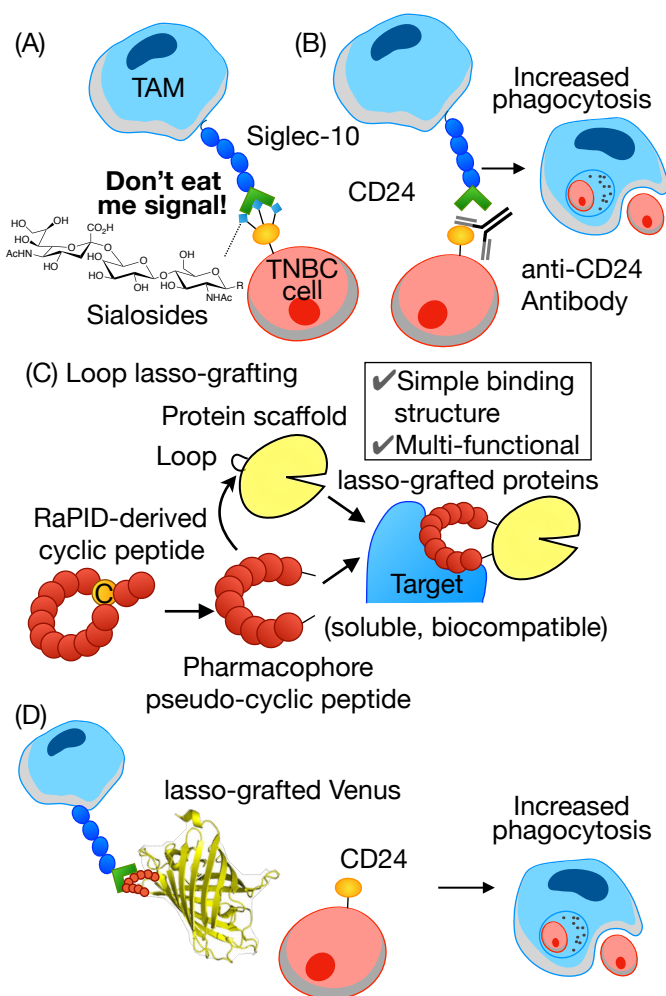


Fig. 1. (A) Schematic of the inhibition of phagocytosis by CD24—Siglec-10¹ (B) Anti-CD24 antibody blocks CD24—Siglec-10 interaction¹ (C) Work flow for loop lasso-grafting² (D) lasso-grafted Venus targets Siglec-10, blocking CD24—Siglec-10 and inducing phagocytosis

1) A. A. Barkal, R. E. Brewer, M. Markovic et al. *Nature* **572**, 392–396 (2019)

2) E. Mihara, S. Watanabe, N. K. Bashiruddin et al. *Nat. Commun.* **12**, 1543 (2021)

3) T. Passioura, H. Suga, *Chem. Commun.*, **53**, 1931–1940 (2017)

4) A. Rekas, J. Alattia, T. Nagai, A. Miyawaki, M. Ikura, *J. Biol. Chem* **277**:50573–50578 (2002)

Dicer-PAZ/Platform と dsRNA の光クロスリンク解析による基質認識機構の解明

○鈴木 駿也・横田 徳子・津田 弘貴・神谷 由紀子・浅沼 浩之（名大院工）

Analysis of interaction site between Dicer-PAZ/Platform and dsRNA by using photo crosslink reaction

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) SUZUKI, Shunya; YOKOTA, Noriko; TSUDA, Hiroki; KAMIYA, Yukiko; ASANUMA, Hiroyuki

RNAi 機構は遺伝子発現を抑制する生体反応であり、これらのシステムを応用した核酸医薬の開発が期待されている。RNAi 機構において重要な役割をもつタンパク質である Dicer は pre-miRNA や pre-siRNA を切断し、短鎖 dsRNA (miRNA, siRNA) を生産する。Dicer によって生み出された短鎖 dsRNA は Ago2 タンパク質に受け渡され RISC を形成し、標的である mRNA を切断する。このことから、Dicer による dsRNA の認識・切断機構の解明は RNAi を理解する上でも、RNAi を基盤とする核酸医薬を開発する上でも非常に重要である。

Dicer は巨大マルチドメインタンパク質であり、基質 RNA の認識・切断のステップで柔軟に構造を変化させると予想されている。これまでに Dicer の各ドメインの結晶構造解析や、RNA と Dicer の複合体のクライオ電子顕微鏡解析が行われているが、Dicer による RNA 認識・基質選別を理解する相互作用は捉えられていない。そこで本研究では、基質 RNA の 3' 末端を認識することが知られている Dicer の PAZ ドメインとそれに続く Platform ドメイン (Dicer-Platform/PAZ, Dicer-PP) を用い、光クロスリンク法によって Dicer-PP による dsRNA 認識の解析を試みた。

クロスリンカーとして、Trifluoromethyl phenyl diazirine に平面性分子である Carbazole を導入した化合物を設計・合成した (Fig. 1 a)。Dicer の基質ではない短鎖 dsRNA やステムループ構造をもつ dsRNA、Dicer の基質である長鎖 dsRNA や pre-miRNA を模倣したバルジ構造をもつ dsRNA に対し、クロスリンカーの位置を変えて導入し、Dicer-PP との光クロスリンクを行った。さらに、LC-MS/MS 解析を行うことで相互作用部位の同定を行った (Fig. 1 b)。

クロスリンカーの位置が異なる dsRNA の光クロスリンク反応産物を SDS-PAGE によって比較したところ、長鎖 dsRNA の末端から 14 nt までにクロスリンカーを導入した場合は光クロスリンクが確認でき、それより 3' 末端側にクロスリンカーを導入した場合は光クロスリンクが起らなかった。このことから、Dicer-PP は dsRNA の末端だけでなく、内部とも相互作用することが明らかになった。また、14 nt におけるクロスリンク効率は、フルマッチ dsRNA よりも内在性の Dicer の標的を模したバルジ構造を持つ dsRNA において増加した。このことから、Dicer-PP は dsRNA の鎖長と末端から内部領域の構造を読み取り、基質識別を行う機能をもつと考えられた。さらに、LC-MS/MS 解析の結果から、これまでの構造解析では得られなかった、新たな Dicer-PP・dsRNA 複合体の相互作用を解明することに成功した。

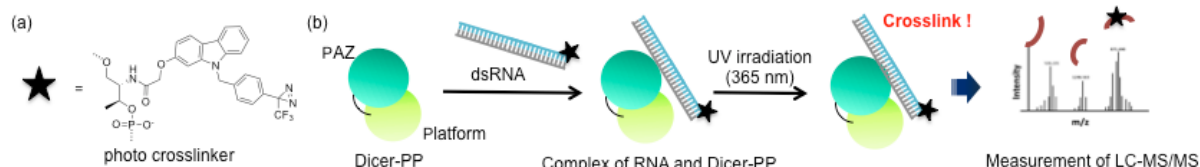


Fig. 1 Overview of photo-crosslinking of modified RNA to Dicer

分子ストッパーによる AMPA 型グルタミン酸受容体の活性制御

○三浦裕太¹・小島憲人²・浜地格²・清中茂樹¹ (¹名大院工、²京大院工)

Control the AMPA-Type Glutamate Receptor Activity Utilizing the Molecular Stopper Approach (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Graduate School of Engineering, Kyoto University²) MIURA, Yuta¹; OJIMA, Kento²; HAMACHI, Itaru²; KIYONAKA, Shigeki¹

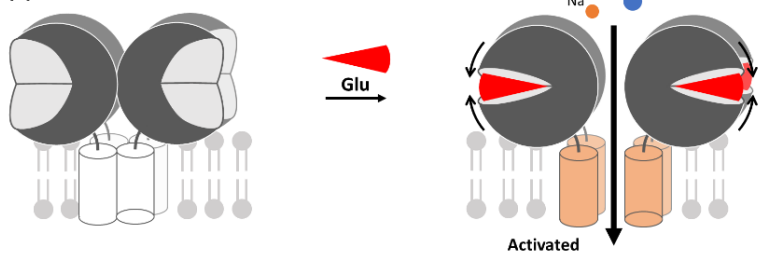
AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPA)は、中枢神経系での速い興奮性神経伝達を担う 4 量体カチオンチャンネルであり、その発現様式が記憶や学習に大きく関連している。AMPA には GluA1-4 からなる 4 種のサブユニットが存在し、それぞれ異なる機能を有すると考えられる。しかし構造的相同性の高さからサブユニット選択的活性制御が難しく、各サブユニットに固有な機能の理解には至っていない¹⁾。

このような背景の下、我々は受容体の構造変化に着目した新規ケモジェネティクス法「配位ケモジェネティクス」の開発を進めている。約 30 種存在するグルタミン酸受容体は、グルタミン酸の結合に伴いリガンド結合ドメインが開いた構造から閉じた構造へと変化し、活性化するという共通メカニズムを持つ(Fig. 1a)。我々はその構造変化を利用して、グルタミン酸受容体を人為的に活性化させることに成功した²⁾。具体的には、まずリガンド結合部位近傍の上下に配位性アミノ酸である His の変異導入を行う。そこに Pd(bpy)錯体を加えることで変異導入された His と配位結合を形成し、閉構造への変化を誘起して活性化させた(Fig. 1b)。

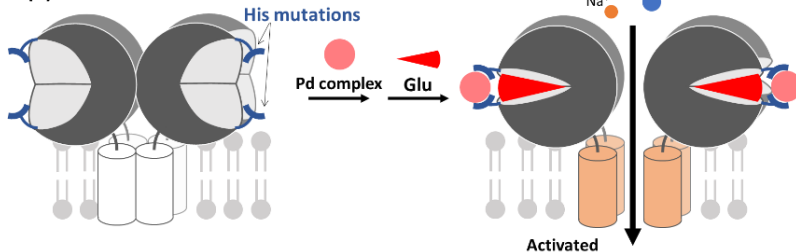
本研究では、配位ケモジェネティクスによって活性化させる先行研究とは異なり、Pd 錯体の配位子が比較的嵩高いことに着目した。

狙った位置に導入した配位サイトへ錯体が配位結合する事で、構造変化に干渉する分子ストッパーとして機能するのではないかと構想した。まず AMPAR の活性化時に大きく構造変化する位置に、配位性アミノ酸である His を近接するように 2 残基変異導入して配位サイトを作製した。そこに嵩高い錯体を配位させることで、閉構造への変化を妨げて受容体の活性を阻害する事に成功した(Fig. 1c)。本手法は、従来の方法で不可能だったサブユニット選択的な活性阻害を可能にするものである。

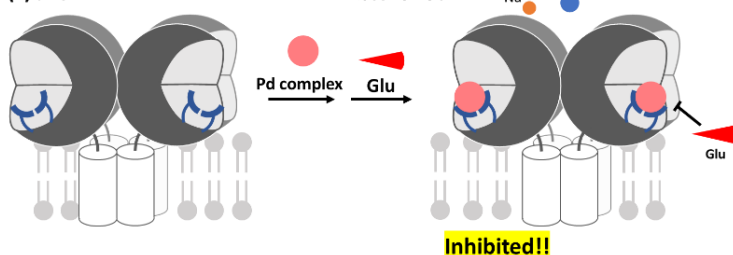
(a) AMPARのグルタミン酸による活性化



(b) 配位ケモジェネティクスによる活性化



(c) 配位ケモジェネティクスによる活性阻害



1) J. M. Henley et al., *Nature Rev. Neurosci.* (2016)

2) S. Kiyonaka et al., *Nature Chem.* (2016)

Fig. 1 (a) Glutamate-induced activation mechanism of AMPARs. (b) Coordination-chemogenetic activation of AMPARs. (c) Coordination-chemogenetic inhibition of AMPARs utilizing the molecular stopper approach.

天然化合物を擬似基質として利用可能な P450BM3 変異体の指向性進化法による開発とその構造解析

○横山侑弥¹・唐澤昌之¹・有安真也¹・愛場雄一郎¹・杉本宏^{2,3}・荘司長三^{1,2}
(¹名大院理、²JST CREST、³理研 Spring-8)

Directed Evolution and Structure Analysis of P450BM3 Utilizing Natural Products as Decoy Molecules
(Graduate School of Science, Nagoya University¹, JST CREST², RIKEN Spring-8³) YOKOYAMA, Yuya¹; KARASAWA, Masayuki¹; ARIYASU, Shinya¹; AIBA, Yuichiro¹; SUGIMOTO, Hiroshi^{2,3}; SHOJI, Osami^{1,2}

シトクロム P450BM3 (P450BM3) は長鎖脂肪酸の水酸化を高効率に触媒するヘム酵素である。一方我々は、天然基質を模倣して合成した擬似基質「デコイ分子」を野生型 P450BM3 に添加することで、その基質特異性を改変し、ベンゼンなどの非天然基質の効率的な水酸化を達成している¹ (Fig. 1)。近年では、酵素の精製と高価な補酵素 NADPH の添加が不要な、菌体内反応系が開発されている²。しかし、これまでの反応系ではデコイ分子の合成と外部添加が必須となっており、さらなる応用に向けてデコイ分子調製におけるコスト削減が求められている。そこで本研究では、既存のデコイ分子と似た骨格を有し、一部の細菌が分泌する C10-アシルホモセリンラクトン (C10-AHL) に着目し、C10-AHL 分泌菌と P450BM3 発現大腸菌の共培養により、デコイ分子の合成と添加が不要な反応系開発を目的とした (Fig. 2)。しかし、野生型 P450BM3 に対して C10-AHL を用いた際のベンゼン水酸化活性は低いため、C10-AHL をデコイ分子として利用可能な P450BM3 変異体を指向性進化法によって開発する。

野生型 P450BM3 ヘムドメインにランダム変異を導入し、約 1600 変異体のスクリーニングを C10-AHL 存在下での菌体内ベンゼン水酸化によって行ったところ、野生型の約 1.5 倍の活性を持つ変異体を得た。この変異体には、A74V と L188P という、活性部位入り口付近の変異が確認されたため、第二世代として A74V, L188P 周辺の 17 残基に対し飽和変異を導入した変異体ライブラリーを構築し、そのスクリーニングを行った。その結果、高い活性と、野生型に比べて約 50 倍の C10-AHL 応答性を示し、活性部位の入り口に位置する R47W 変異を持った 10-G10 変異体を開発した (Fig. 3)。

次に、開発した第二世代変異体 (10-G10) の構造を調査するため、X 線結晶構造解析を行った。解析の結果、L188P の位置する F-G ループを中心に、野生型 P450BM3 と比べてその主鎖の構造が大きく変化していることがわかった (Fig. 4)。現在、さらなる活性と C10-AHL 応答性の向上を目指し、第三世代変異体の作製とスクリーニングを行っており、これに関しても発表する予定である。

1) O. Shoji, *et. al.*, *ACIE*. **2017**, 56, 10324-10329.

2) M. Karasawa, *et. al.*, *ACIE*. **2018**, 57, 12264-12269.

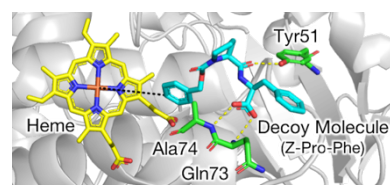


Fig. 1 Crystal structure of P450BM3 WT and decoy molecule (Z-Pro-Phe)

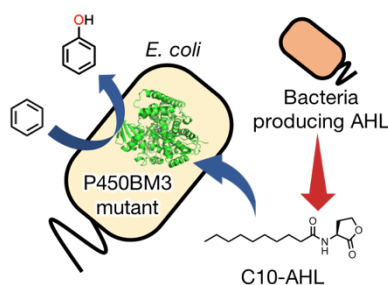


Fig. 2 Whole-cell benzene hydroxylation using C10-AHL as a decoy molecule

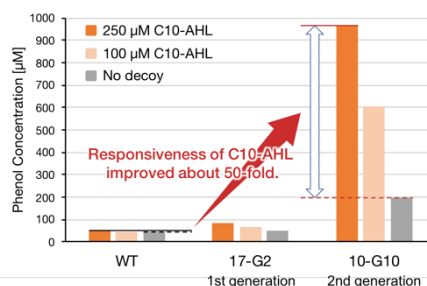


Fig. 3 Whole-cell benzene hydroxylase activity of developed mutants with C10-AHL

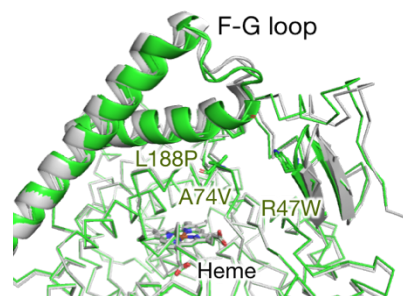


Fig. 4 Crystal structure of 10-G10 (green) and WT binding decoy (gray, PDB: 6JLV)

タンパク質酸化的フォールディングを促進する低分子化合物の官能基配置効果

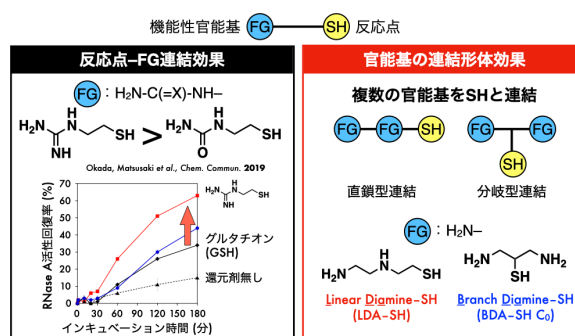
○岡田隼輔¹・松崎元紀²・奥村正樹³・村岡貴博¹ (¹東農工大院工、²徳島大先端酵素研、³東北大学際研)

Structural Effects of Conjugation between Thiol and Functional Groups on Accelerating Oxidative Protein Folding (¹Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, ²IAMS, Tokushima University, ³FRIS, Tohoku University) OKADA, Shunsuke¹; MATSUSAKI, Motonori²; OKUMURA, Masaki³; MURAOKA, Takahiro¹

タンパク質は、多様な生命機能を担う生体分子であるとともに、機能性材料や薬剤などとしても重要な物質群である。その機能や薬効は、タンパク質固有の立体構造と密接に関係している。例えば、筋肉中に多く含まれるミオグロビンは、8個の α -ヘリックス構造を有する。これらヘリックスがヘムを固定化し、酸素貯蔵の機能を実現している。また、医薬品に広く用いられるIgG抗体は、重鎖と軽鎖が多数のSS結合を形成し天然構造へと折り畳まれ、抗原認識作用、及び結合・免疫細胞活性化など免疫維持作用を示す。従って、ポリペプチド鎖の折り畳み(フォールディング)は、タンパク質としての生命機能を発現する上で重要なプロセスである。しかし、大腸菌などを用いてある目的タンパク質の発現を行なう際、可溶性画分の天然構造収率は必ずしも高くない。目的タンパク質を効率的に天然構造へフォールディングさせることは、タンパク質の応用上重要な技術であるが、特にジスルフィド(SS)結合形成を伴うタンパク質のフォールディングを促進する分子、材料の有効な設計指針は未確立である。

複数のSS結合を有するタンパク質は、システイン側鎖のチオール基(SH)が、他のSH基と反応してSS結合を形成する酸化反応を伴いながらフォールディングする(酸化的フォールディング)。ここで、天然型のシステイン対でSS結合が組まれると、天然構造へ導かれる。他方、非天然型システイン対によるSS結合は、非天然構造(ミスフォールド構造)を与える。従って、活性タンパク質の収率向上を指向する上で、非天然型SS結合を切断し、天然型SS結合へと組み替えるアプローチが有効と考えられる。我々は、非天然型SS結合の還元的切断が可能であるSH基に着目し、天然構造へのフォールディングを効果的に進めるSH化合物の開発を行っている。SH基と機能性官能基(FG)の連結を分子設計の基本コンセプトとし、これまで、ウレア骨格($\text{NHC}(=\text{X})\text{NH}_2$, $\text{X} = \text{O}$ or NH)を導入したSH化合物が、還元変性タンパク質に対し、天然構造へのフォールディングを著しく促進することを見出した¹⁾。さらに、SH基とFGの連結距離がタンパク質の天然構造形成効率に影響を及ぼすことを報告した²⁾。

本研究では、FGの連結形態が与える効果に注目し、複数のFGをSH基に対して異なる形で配置した化合物を新たに開発した(FG-SH直鎖型連結分子、FG-SH分岐型連結分子)。還元変性タンパク質に対するフォールディング促進効果を定量評価した結果、FG-SH連結形態の違いがフォールディング促進効果に明確な差を与えることが示された。各合成化合物のSH基の化学的性質も評価し、フォールディング実験結果と合わせて議論する。



- 1) S. Okada, M. Matsusaki, K. Arai, Y. Hidaka, K. Inaba, M. Okumura, T. Muraoka, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 759.
- 2) S. Okada, M. Matsusaki, M. Okumura, T. Muraoka, *Molecules* **2021**, 26, 879.

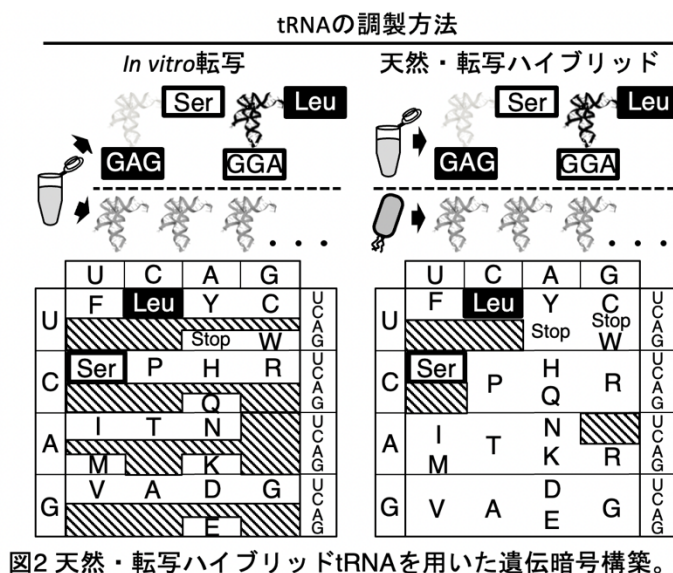
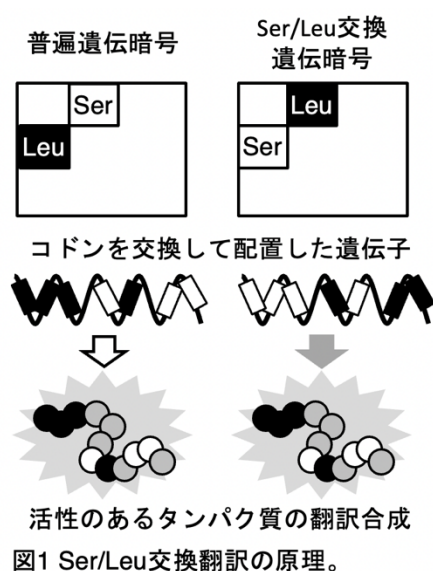
天然・転写 tRNA による Ser/Leu 交換遺伝暗号の翻訳高効率化

○藤野 公茂¹・園田 凌吾¹・村上 裕^{1,2} (1名大院工、2名大ナノライフ)

Improvement of the translation efficiency with a Ser/Leu-swapped genetic code by using native and *in vitro* transcribed tRNAs. (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University²) FUJINO, Tomoshige¹; SONODA, Ryogo¹; MURAKAMI, Hiroshi^{1,2}

組み換えタンパク質を作製する研究では、外部環境への組み換え遺伝子拡散のリスクが常に問題となる。無細胞翻訳系の利用は、一見すると有効な解決手段と見えるが、実際には、化学合成 DNA をクローニングすることで、正しい配列を選択する必要がある、完全にリスクを払拭できてはいない。これに対し、我々は先行研究において、普遍遺伝暗号と直交性を持つ「Ser/Leu 交換遺伝暗号」の構築を考案した(図1)。この遺伝暗号では、翻訳反応に使用する、tRNA^{Ser,Leu} のアンチコドンを交換してキメラ tRNA とすることで、これら2つのアミノ酸のコドンが交換されている。遺伝子設計の時点で、予め Ser と Leu コドンを変換して配置しておくことで、翻訳時に再度交換が起こり、結果として正しい配列のタンパク質が得られる仕組みである。コドン交換遺伝子は、仮に環境へ漏洩したとしても、通常の生物の持つ普遍遺伝暗号では正しい配列に翻訳できないため、遺伝子拡散によって生じる問題は根本から解消されると考えられる。

しかし、先行研究の Ser/Leu 交換遺伝暗号を持つ無細胞翻訳系は、その翻訳合成量が、通常の翻訳系の20%程度と、非常に低いという問題があった。これは、キメラ tRNA を含む全21種の tRNA を、*in vitro* 転写によって用意していたためと考えられた。そこで、本研究では、交換を行わない大部分の tRNA については、大腸菌から抽出した天然 tRNA を利用することで、タンパク質合成活性の高い、Ser/Leu 交換遺伝暗号を持った翻訳系の構築を目指した(図2)。天然 tRNA を変性電気泳動で長さ毎に分離し、tRNA^{Ser,Leu} を含むバンドを除去した後、キメラ tRNA を加えることで、天然・転写ハイブリッド tRNA を調製した。これを用いて Ser/Leu 交換遺伝暗号を持った無細胞翻訳系を構築し、その機能の評価を行った。その結果、モデルタンパク質 sfGFP の合成量を、天然 tRNA のみを用いた通常の無細胞翻訳系と同程度まで改善させることに成功した。さらに、ハイブリッド tRNA を用いたことで、使用可能なコドンが増えたため、コドンを自由に選択した遺伝子の設計が可能になった。本系は、毒素タンパク質などの、遺伝子漏洩の場合にリスクの大きいタンパク質を、その危険な遺伝子を用いずに作製するツールとして、応用可能であると期待される。



メンブレンコンタクトの化学遺伝学操作を介した膜脂質代謝の可逆制御

○吉川優¹・阿喰萌香²・中津史²・築地真也¹ (1 名工大院工、² 名工大工、³ 新潟大院医歯)

Reversible control of lipid metabolism in living cells by chemogenetic membrane contact manipulation
(Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology¹, Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology², Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University³) YOSHIKAWA, Masaru¹;
AJIKI, Moeka², NAKATSU Fubito², TSUKIJI Shinya¹

真核生物の細胞内には細胞小器官（オルガネラ）と呼ばれる、高度に専門化された機能を持つさまざまな構造体が存在している。個々のオルガネラは脂質膜に覆われるなどしてそれぞれ空間的に独立しているが、さまざまな物質輸送機構を介して協奏的に機能していることが知られている。近年、異なるオルガネラの膜同士が近接することで「メンブレンコンタクト」と呼ばれる膜-膜接触部位が形成されており、これが新たな輸送機構として機能していることが明らかとなった。コンタクト部位では主に脂質の交換輸送などが行われているが、その詳細な形成機構や機能については未知の部分が多く残されている。したがって、任意のオルガネラ間におけるコンタクト形成を人為的に制御可能な技術は、その生理的役割を理解する上で強力な研究ツールになるものと期待される。

本研究では、小胞体（ER）と細胞膜（PM）間のコンタクト（ER-PM contact）を人為的に制御するための新規ツールの開発を目指した。オキシステロール結合タンパク質である ORP5/8 は小胞体表面に発現しており、PH ドメインを用いて細胞膜上のイノシトールリン脂質 PI4P に結合する性質を有している。そのため、細胞膜上の PI4P 濃度が上昇すると ORP により ER-PM contact が形成され、コンタクト部位で ORP5/8 は PI4P とホスファチジルセリン（PS）の交換輸送を駆動する。一方、我々はこれまでに、細胞質中の標的タンパク質の局在を細胞膜特異的に移行させることができる化学遺伝学システムを開発している¹⁻³。このシステムでは、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素（eDHFR）の改変体「iK⁶eDHFR」をタグとして標的タンパク質に融合する。これを発現させた細胞にパルミチン酸を連結した TMP リガンド（palTMP）を添加すると、iK⁶eDHFR 融合タンパク質を細胞質から細胞膜へ局在移行させることができる。そこで今回、ORP5 中の PH ドメインを iK⁶eDHFR タグに置き換えることで、palTMP の添加によって人為的に ER-PM 間の架橋を形成可能なシステムを構築した（図 1）。実際に、本システムを用いることで ER-PM contact の形成が誘導され、細胞膜上の PI4P の交換輸送と代謝を制御できることが培養細胞実験において確認された。本発表では、このメンブレンコンタクト操作システムの特性と、これを用いた細胞内脂質代謝の制御について報告する。

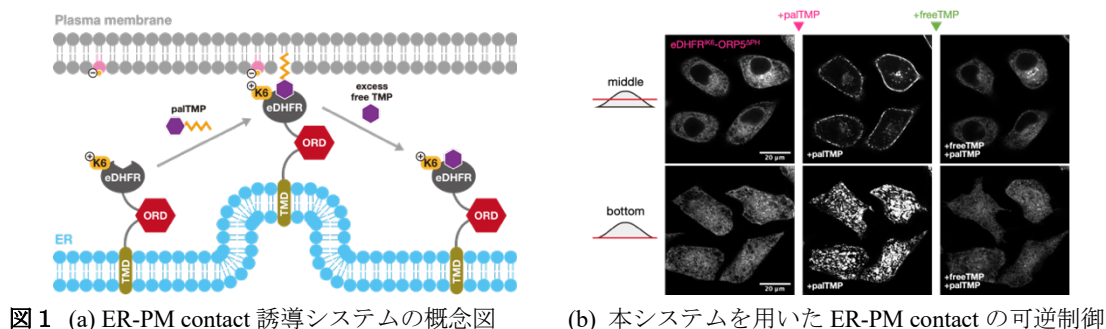


図 1 (a) ER-PM contact 誘導システムの概念図

(b) 本システムを用いた ER-PM contact の可逆制御

- 1) M. Ishida et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 12684 (2013); 2) A. Nakamura et al., *ACS Chem. Biol.*, **15**, 1004 (2020); 3) Y. Hatano et al., bioRxiv, DOI: 10.1101/2021.03.16.435568

固定化駆動法による脳内での分子動態解析を指向した新規プローブ開発

對馬暁洋¹・美野丈晴¹・天池一真¹・石川守²・坂本清志¹・野中洋^{1,2}・浜地格^{1,2} (¹京都大院工, ²JST ERATO)

Development of Fixation-driven Chemical Crosslinking Probes for Pharmacokinetic Analysis in Brain (Graduate School of Engineering, Kyoto University¹, ERATO JST²) TSUSHIMA, Akihiro¹; MINO, Takeharu¹; AMAIKE, Kazuma¹; ISHIKAWA, Mamoru²; SAKAMOTO, Seiji¹; NONAKA, Hiroshi^{1,2}; HAMACHI, Itaru^{1,2}.

薬剤をはじめとした外来性分子の拡散・浸透・滞留性の評価は、薬剤の標的選択性・メカニズム・持続性の理解に直結するもので、薬理学的に極めて重要である。既存の外来性分子の動態解析手法として、放射性同位元素を標識した分子を用いる陽電子断層撮像法(PET)が知られている。PETはパワフルな解析手法であるが、空間分解能が低いといった原理上の問題がある。そのため、外来性分子の動態を詳細に解析可能な新規手法の開発が現在求められている。

当研究室では、このような背景から高解像度に外来性分子の動態解析を行う手法として、固定化駆動クロスリンク法(Fixation-driven chemical crosslinking: FdCC)を開発してきた。FdCC法では、まず解析対象となるリガンドに蛍光色素と1級アミノ基を組み込んだ分子プローブ(Fig. 1A)を生きた動物個体に投与する。次に、任意のタイミングでパラホルムアルデヒド(PFA)水溶液による灌流固定(クロスリンク処理)を行うことで、プローブと相互作用タンパク質の求核性官能基が架橋される(Fig. 1B)。最後に、固定された生体組織を蛍光イメージングすることで、分子プローブの動態を高解像度に解析する手法である。

今回我々は、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体の一種であるAMPA受容体(AMPA受容体(AMPA)のアンタゴニストPFQXと、ドーパミン受容体(DRD2)のアンタゴニストであり定型抗精神病薬であるSpiperoneを対象とした新規のFdCCプローブの開発を行った。まず、AMPA受容体を発現させたHEK293T細胞に対して、PFQX-FdCCプローブをインキュベートしPFA処理したところ、AMPA発現細胞の膜表面からプローブ由来の蛍光が観測された。リガンド認識を阻害した条件や、アミノ基がないプローブを用いた条件では、そのような蛍光は確認されず、AMPA受容体との相互作用とPFAによるクロスリンクに基づくプローブの固定化であることが確認された。さらに、生きたマウス脳内にプローブを投与し、PFAによる灌流固定を行うとAMPA受容体が高発現する海馬や小脳分子層から蛍光シグナルが見られ、固定化駆動クロスリンク法によりPFQX-FdCCプローブの脳内での分布を解析できることが示唆された。同様に、Spiperone-FdCCプローブを合成し、DRD2を発現したHEK293T細胞を用いて評価したところ、DRD2との相互作用とPFAによるクロスリンクに基づく蛍光シグナルを確認した。本発表では、これらの新規FdCCプローブの詳細に関して報告する。

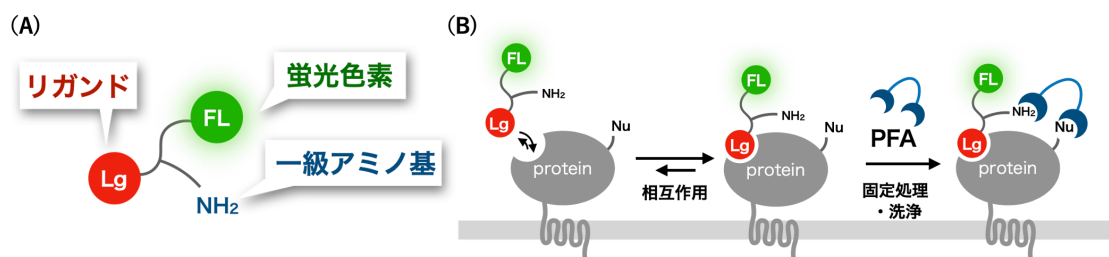


Fig 1. 固定化駆動クロスリンク法に用いる分子プローブ(A)と、その原理(B)

PET 加水分解酵素と高付着性タンパク質の連結体構築

○澤田美波・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Construction of a fusion protein consisting of a PET hydrolase and an adhesive protein (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SAWADA, Minami; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

プラスチックはひとたび環境中に排出されると環境中に長期間にわたり残存するため、適切に処理する方法が求められている。近年、環境負荷の低いプラスチックの処理方法として生体触媒（酵素）による分解が注目されている。この方法ではプラスチックをモノマーに分解し、それを原料として再びプラスチックを生産できるため、温和なケミカルリサイクルとして資源循環型社会の実現への寄与が期待されている。しかし、固体表面を基質とするプラスチックの酵素分解には、反応速度が遅いという問題点がある。

当研究室で発見された高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 由来のファイバータンパク質 AtaA は、プラスチックからガラス、金属など様々な固体材料表面に対する高い付着性を示す¹⁾。AtaA は他の分子と連結することで付着性を付与し、任意の材料表面に分子を付着させられることが示されている²⁾。そこで同様に、プラスチック分解酵素に AtaA を連結すれば、基質であるプラスチック表面に酵素を集積して接触頻度を上げ、分解速度を向上できるのではないかと考えた。そこで本研究では、ポリエチレンテレフタレート (PET) 加水分解酵素のひとつである LCC³⁾をモデルとして、AtaA との連結体の構築を試みた。

AtaA と LCC の連結には、混合するだけで特異的な架橋反応が起こる SpyTag/SpyCatcher システムを利用した⁴⁾。ホモ三量体を形成する AtaA に SpyCatcher を、LCC に SpyTag を付加したリコンビナントタンパク質を設計し、大腸菌でそれぞれ生産、精製した (Fig. 1A)。LCC と SpyTag の間のリンカーには、柔軟な (GGGGS)₅ と堅い (EAAAK)₅ の2つを検討した (Fig. 1B)。それらを 1.5 ml チューブ内で混合し 37℃ で 1 時間反応したところ、(EAAAK)₅ リンカーで SpyTag を付加した LCC は AtaA-SpyCatcher と連結したが、(GGGGS)₅ リンカーで SpyTag を付加した LCC は AtaA-SpyCatcher とほとんど連結しなかった。SpyTag-(EAAAK)₅-LCC と AtaA の連結体をアフィニティー精製し、そのエステラーゼ活性を酢酸 p-ニトロフェニルの分解試験で評価したところ、AtaA と連結させていない LCC と同等の活性を維持していた。これらの結果から、SpyTag/SpyCatcher システムを用いて AtaA-LCC 連結体を構築できることが示された。

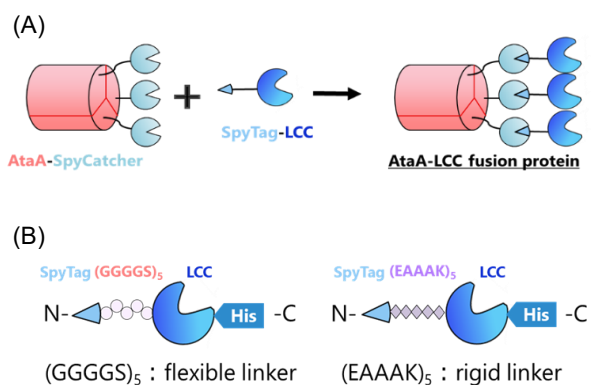


Fig. 1. (A) Schematic illustration of construction of AtaA-LCC fusion protein. (B) Two types of linkers used in SpyTag-LCC.

- 1) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLOS ONE*, 7, e48830 (2012)
- 2) K. Noba, M. Ishikawa, *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, 141(48), 19058-19066 (2019)
- 3) V. Tournier, C. M. Topham, *et al.*, *Nature*, 580, 216-219 (2020)
- 4) A. H. Keeble, A. Banerjee, *et al.*, *Angewandte Chemie. International Edition*, 56(52), 16521-16525

インクジェット装置による膜透過性ペプチドを用いた細胞内導入技術の開発

○大村美香¹・中瀬生彦^{1,2} (¹ 阪府大生命環境、² 阪府大院理)

Development of inkjet system-based intracellular delivery technology using cell-penetrating peptides (College of Life, Environment, and Advanced Sciences, Osaka Prefecture University¹, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University²) OMURA, Mika¹ NAKASE, Ikuhiko^{1,2}

細胞内導入技術は種々存在するが、代表的な方法としてマイクロインジェクション法が挙げられる。この方法は確実性が高く細胞内導入効率が高い一方で、作業効率が低く細胞生存率への影響が大きい。そこで本研究ではこれらの問題点を解決するために、インクジェット装置と膜透過性ペプチド (cell-penetrating peptides, CPP) を用いた新たな細胞内導入技術の開発を進めている。インクジェット装置により液滴量と滴下速度、滴下位置を精密に制御し、加えて超微細インクジェットヘッドを併用することで微量の標的投与が可能となる。また高い細胞膜透過機能を有する CPP は、通常なら細胞膜を透過できない高分子の薬物やナノ粒子を細胞内へ送達できることが明らかにされている¹。本研究では、液滴の吐出の強さを調節することで滴下速度をコントロールし、導入液とその濃度を変化させて最適条件の検討を行った。また、インクジェットシステムにおいて適用可能な CPP の探索を行い、高効率な細胞内導入の技術構築を進めている。

インクジェット装置 (クラスターテクノロジー社) は、専用ドライバ (WaveBuilder[®])、カメラ付き観測装置 (InkjetLaboTM)、及び、超微細インクジェットヘッド (PulseInjector[®]) を搭載したシステムを用いた。全てのペプチドは Fmoc 固相法で合成し、C 末端に配置したシステインの側鎖を介して蛍光標識 (Alexa488) を行った。脱保護、及び、HPLC で精製後に得られたペプチドの分子量を MALDI-TOFMS を用いて測定した。各種ペプチドを超微細インクジェットヘッドへ充填し、電圧、周波数、波形、吐出回数を設定した後、カメラ付き観測装置で吐出位置を確認しながら HeLa 細胞に添加した。その後、蛍光顕微鏡、及び、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光標識ペプチドの局在を観察した。

膜透過性ペプチドの蛍光標識 FHV ペプチド²⁾ (PBS 溶解) を本インクジェット装置により細胞へ添加したところ、通常の細胞操作による添加時に比べて、低濃度かつ少量でのサイトゾル移行が可能であることを確認した。また装置電圧を上昇し滴下速度を高めることで、ペプチドの細胞膜通過効率が上昇することが示唆された。本実験条件において、細胞へのダメージはほとんど無いことも示されている。また、細胞死誘導配列ペプチド (PAD)³⁾ について、FHV 配列を PAD に付加することで、インクジェット装置による本技術での細胞内導入、及び、顕著な細胞死誘導を確認することができた。

以上のように、インクジェットシステムを使用することで、狙った細胞群への膜透過性ペプチドの滴下ができ、高効率なサイトゾル導入が可能になった。本手法は、新たな細胞内導入技術の基盤構築に繋がることが考えられる。本技術を用いた生理活性分子の細胞内導入評価についてさらに展開させたい。

【参考文献】

- 1) S. Futaki, I. Nakase, *Acc. Chem. Res.* **50**, 2449-2456 (2017)
- 2) I. Nakase *et al.*, *Mol. Ther.* **11**, 1868-1876 (2009)
- 3) C.L. Ellerby *et al.*, *Nature* **5**, 1032-1038 (1999)

膜融合配列によるエンドソーム脱出促進を指向したペプチド性薬物キャリアの合成

○廣田 翔吾¹・今井 崇人¹・山崎 正幸²・富崎 欣也¹ (¹龍谷大理工、²龍谷大農)

Synthesis of A Peptide-Based Drug Carrier for Facilitating Endosomal Escape by A Fusogenic Sequence

(¹Department of Materials Chemistry, ²Department of Food Sciences and Human Nutrition, Ryukoku University)HIROTA, Shogo¹; IMAI, Takahito¹; Yamasaki, Masayuki²; TOMIZAKI, Kin-ya¹

薬物は生体システムにとって異物であるために、体内で分解や排出を受けやすく、また、様々な副作用を引き起こす。そこで効果の増強や、副作用の低減を目的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が盛んに行われている。近年では特に、ガン細胞など、細胞を特異的に標的化した DDS が注目を集めている。しかし細胞内に薬物が取り込まれる主要な経路であるエンドサイトーシスでは、エンドソームによる内包が薬効の抑制や薬物の分解等の様々な問題を引き起こす。したがって、膜貫通孔形成や膜融合によって、エンドソーム膜を不安定化させることで、エンドソームからの薬物の放出を促進し、効率的な薬物の送達が可能となる。本研究では、先行研究において設計・合成された薬物キャリアペプチド (Cap-p: Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂)^[1] の N 末端に細胞膜透過性の核移行シグナルペプチド (NLS) 及び pH 応答性の膜融合ペプチドとして知られている GALA ペプチド^[2] の部分配列を有する 2 種のキャリアペプチドをそれぞれ設計した。さらに細胞内還元環境による薬物放出を期待して、2 種のキャリアペプチドを、ジスルフィド結合を介して二量化することでヘテロダイマー (GALA-NLS) を新たに設計・合成しその機能について評価した。

Cap-p をベースにカルボキシフルオレセイン (FAM) を修飾した FAM-NLS-p-C 及び GALA-p-C(S-Py) を固相合成法により合成した。さらにそれらを超純水中で 1 時間反応させることで、ジスルフィド結合を介した GALA-NLS を合成した (Fig. 1)。次いで CD スペクトル測定による二次構造の pH 応答性、還元剤ジチオトレイトール (DTT) によるジスルフィド結合の解離評価、そして、システインを含まない FAM-NLS-p 及び GALA-p を対照ペプチドとして、カルセインを用いた細胞内挙動の評価をヒト子宮頸ガン由来の HeLa 細胞を用いて行った。



Fig. 1. ペプチドの配列 (2Naf = L-2-naphthylalanine)

CD スペクトル測定の結果、エンドソーム内の pH 相当の pH5.5 において pH7.5 よりも α -ヘリックス性が高いことを示唆するスペクトルが得られた。また、DTT 処理によりジスルフィド結合の解離が確認された。次いで、カルセイン存在下でペプチドを細胞導入したところ GALA-NLS を用いた場合のみ細胞全体から緑色蛍光が確認され、GALA-NLS がエンドソームから内包物を放出する機能を有していることが示唆された (Fig. 2)。今後は薬剤モデルとして核酸の送達を試みる予定である。

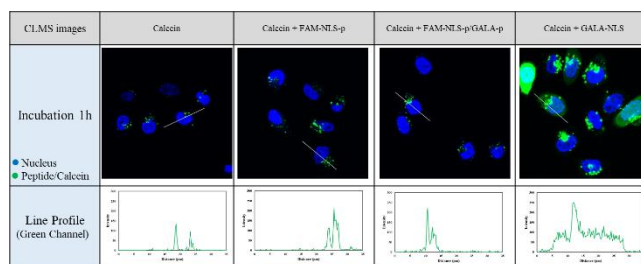


Fig. 2. カルセインの細胞内拡散評価

本研究の一部は、2021 年度龍谷大学科学技術共同研究センタープロジェクト及び科研費 (基盤研究 C: JP20K05713) の支援を受けて実施されたものである。

[1] Tomizaki, K.-Y. et al., *Molecules* **2017**, 22, 1916.[2] Subbarao, N. K. et al., *Biochemistry* **1987**, 26, 2964.

ミトコンドリア移行シグナルペプチドを表面修飾した金ナノロッドの合成

○中村翔也・今井崇人・富崎欣也（龍谷大理工）

Synthesis of Gold Nanorods Surface-Modified with Mitochondrial Targeting Signal Peptides (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) NAKAMURA, Shoya; IMAI, Takahito; TOMIZAKI, Kin-ya

薬剤をガン細胞に投与すると、薬剤の一部は ABC トランスポーターとよばれる膜タンパク質の働きにより細胞外に放出されるものの、その多くは細胞内に滞留し、薬効を発揮する。しかしながら、ABC トランスポーターが過剰発現した多剤耐性ガン細胞に薬剤を投与すると、大部分の薬剤は細胞外に放出され、薬効が十分に発揮されないという課題が指摘されている。この課題の解決策として、金ナノロッドの近赤外光に対する光熱効果により ABC トランスポーターのエネルギー源であるアデノシン 3 リン酸を産生するミトコンドリアに損傷を与え、薬剤耐性を克服する方法が挙げられる。そこで本研究では、多剤耐性ガン細胞のミトコンドリアに金ナノロッドを送達・集積させることを指向し、ミトコンドリア移行シグナル (MTS) と金ナノロッドの複合体の形成を目的とした。

金ナノロッドの表面修飾に用いる MTS ペプチドとして L-シクロヘキシルアラニン (Cha) と D-アルギニン (DArg) を 3 回くり返したペプチド^[1]にリンカーを介してシステインを配置した (ChaDArg)₃ をデザインした (Fig.1)。(ChaDArg)₃ は Fmoc 固相合成法を用いて合成した。次いで、臭化セチルトリメチルアンモニウムミセルを鋳型として金ナノロッドの合成を行った。さらに、ペプチド-金ナノロッド複合体に親水性および分散性をもたせるためにポリエチレングリコールメチルエチルチオール (PEG-SH) を金ナノロッドの表面に修飾し、その後 (ChaDArg)₃ ペプチドによる金ナノロッドへの表面修飾を試みた。



Fig. 1. (ChaDArg)₃ の配列

(ChaDArg)₃ ペプチドは HPLC 上単一のピークとして得られ、MALDI-TOF-MS にて想定する分子イオンピークが得られたことから目的ペプチドの合成を確認した。次いで、金ナノロッドの形成評価を UV-vis 吸収スペクトルおよび TEM により行った。UV-vis 吸収スペクトルにおいて、金ナノロッドの長軸および短軸由来のプラズモン吸収がそれぞれ 800 および 500 nm 付近にみられた (Fig.2)。また、TEM 画像からロッド形の金ナノ結晶が確認できた (Fig.3)。以上の結果より、金ナノロッドの合成に成功したと考えられる。今後はペプチドおよび PEG-SH を金ナノロッドに修飾し、ゼータ電位および IR 測定を行ってペプチドを表面修飾した金ナノロッドの形態評価を行う予定である。

本研究の一部は、科研費（基盤 C：20K057130002）の支援により実施された。

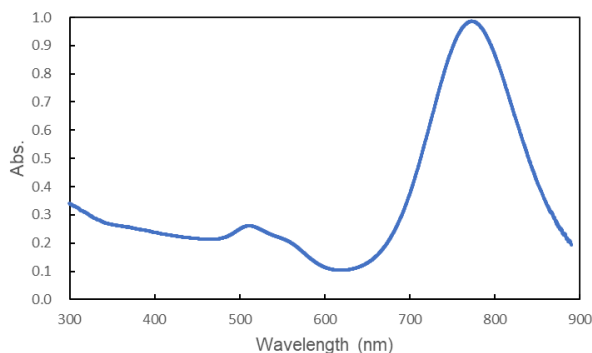


Fig. 2. 金ナノロッドの吸収スペクトル

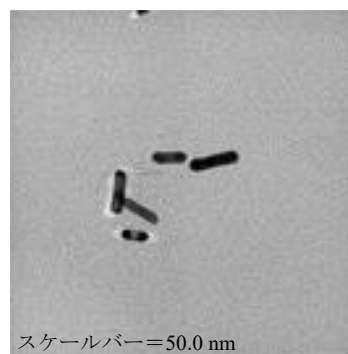


Fig. 3. 金ナノロッドの TEM 画像

[1] Sea Rin Jean.et.al. Mol. Pharmaceutics 2014, 11, 2675–2682

二つの異なる蛍光色素を修飾したタンパク質を構成要素とするハイドロゲルの調製

○印南拓希・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Preparation of Hydrogel Containing a Protein Unit Modified by Two Different Fluorophores (Graduate School of Engineering, Osaka University) INNAMI, Hiroki; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

高分子ハイドロゲルは、三次元網目構造を形成する高分子鎖が水和し、膨潤した物質である。多数のハイドロゲルが報告されているが、その中には外部刺激に応答して形状や物性を変化させるものがある。このような刺激応答性ゲルの構築法の一つとして、刺激応答性を有する機能性分子をゲルの構造内部に導入する手法が挙げられ、機能性分子由来のユニークな特性の発現が期待される。例えば、メカノフォアと呼ばれる機械的刺激に応答して吸収・発光特性を変化させる分子と高分子を複合化させた材料は、局所的な応力集中を可視化できることが報告されている¹⁾。一方で、タンパク質は、温度や pH に応答して構造や物性を変化させる多様な刺激応答性を有するため、ゲルに導入する機能性分子として注目されている。安定な共有結合を介してタンパク質を三次元網目構造中に有するゲルは、マクロな外部刺激をタンパク質のミクロな形状変化として反映するユニークな材料構築が可能であると考えられる。そこで、我々は新しいタイプの応力集中可視化ゲルの開発を目指し、タンパク質の変性と折り畳みに注目した。具体的には、応力集中を定量評価するために、構成要素となるタンパク質に対して、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) のドナーおよびアクセプターとして機能する二つの異なる蛍光団の導入を試みた。FRET は距離依存性が強いので、タンパク質中に二つの蛍光団を導入すれば、タンパク質の変性と折り畳みに伴う大きな構造変化によって蛍光波長が変化すると予想される。溶液中でのタンパク質の変性と折り畳みに伴うエネルギー変化とそれに伴う FRET の蛍光変化を関連づけることで、ゲルへの応力に伴う局所的なエネルギー変化の定量的な可視化が期待される。

ハイドロゲルの構成要素として用いるタンパク質としてβ-ラクトグロブリンを用い、タンパク質に導入するドナーおよびアクセプター蛍光色素としてフルオレセインとテトラメチルローダミンをそれぞれ選択した。まずβ-ラクトグロブリンに一つだけ存在するフリーのシステイン残基を標的とし、マレイミド基を有するフルオレセイン誘導体を修飾した。次にタンパク質の N 末端を既報に従ってアジド化²⁾した後に、ジベンゾシクロオクチン (DBCO) を有するテトラメチルローダミン誘導体を歪み解消型クリック反応を用いて導入した。得られたβ-ラクトグロブリンを質量分析法および分光学的手法により評価した。本発表では、さらにβ-ラクトグロブリン表面に多数存在するリジン残基と、グルタルアルデヒドの反応を利用したハイドロゲルの調製について報告する。

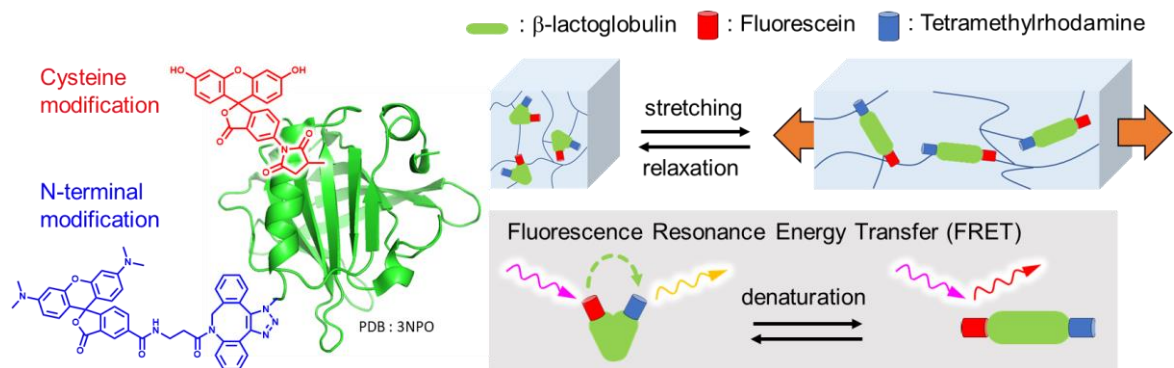


Fig 1. Schematic representation of the mechanofluorescent gel

- 1) Y. Sagara *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*, 5519-5525.
- 2) S. Schoffelen *et al.*, *Chem. Sci.*, **2011**, *2*, 701-705.

液-液相分離による抗体と高分子送達ペプチドの濃縮と抗体の細胞内送達

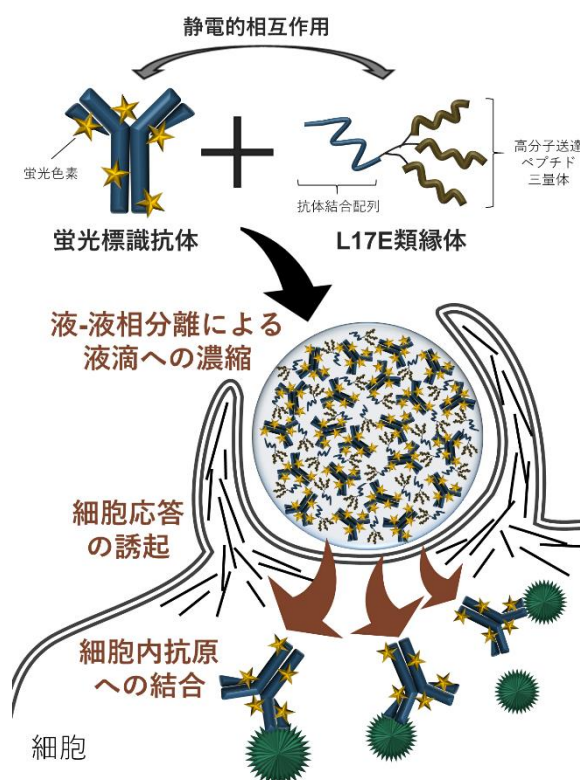
○岩田恭宗、広瀬久昭、坂本健太郎、平井勇祐、Jan Vincent V. Arafiles、
秋柴美沙穂、今西未来、二木史朗（京大化研）

Condensation of Antibodies and Macromolecule Delivery Peptides into Liquid Droplets by Liquid-Liquid Phase Separation and Intracellular Delivery of Antibodies (Institute for Chemical Research, Kyoto University) IWATA, Takahiro; HIROSE, Hisaaki; SAKAMOTO, Kentarou; HIRAI, Yusuke; ARAFILES, Jan Vincent V.; AKISHIBA, Misao; IMANISHI, Miki; FUTAKI, Shiroh

抗体は優れた抗原認識能を有しており、生命科学分野における分子解析ツールとして用いられているだけでなく、分子標的薬としての開発が進んでいる。しかし抗体はサイズの大きさ（約 150 kDa）や親水性のために細胞膜を透過することができず、細胞内分子を標的とすることは困難である。そのため、抗体医薬品の利用は細胞外分子を標的とするものに限られている。抗体を効率よく細胞内へと送達する手法を開発することができれば、抗体医薬品の適用範囲を細胞内分子にまで拡張することが可能である。当研究室では溶血性ペプチド M-lycotoxin の配列を改変した高分子送達ペプチド“L17E”を開発した[1]。L17E により抗体を含む高分子を効率よく細胞内へと送達することが可能となった。しかし、L17E による効果的な細胞内送達と抗体の細胞内での標的認識を達成するためには両者ともに高濃度で投与しなければならず（L17E 40 μ M, IgG 0.5-1 mg/mL）、細胞生物学などの基礎研究への適用や臨床応用を見据えると、L17E と抗体がより低濃度で効率的に細胞内に送達可能な手法の開発が求められる。

我々は、抗体の効率のよい細胞内送達を実現するためには膜近傍での抗体と L17E の局所濃度の増加が重要であるという仮説を立てた。そこで、L17E の局所濃度の増加のために L17E を多量体化させ、抗体との複合体形成のために抗体に結合親和性を持つペプチド配列を付与した L17E 類縁体を作製した。作製した L17E 類縁体を用いることで L17E よりも低いペプチドおよび抗体濃度で蛍光標識抗体を細胞内に効率よく導入することに成功した。また、その送達様式は元来の想定とは異なり、L17E 類縁体と蛍光標識抗体が静電的相互作用により液-液相分離を引き起こすことが重要であるということが分かった[2]。

L17E 類縁体による抗体の細胞内送達メカニズムの詳細等についても本発表にて説明したい。



[1] Akishiba, M. *et al.*, *Nat. Chem.*, 9, 751-761 (2017)

[2] Iwata, T. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press. DOI: 10.1002/anie.202105527

2'-β-プロパルギルセレンヌクレオシドを用いた逆転写酵素不可逆阻害の機構解析

○吉田祐希¹・新美結士¹・伏原大地¹・村瀬裕貴¹・木村康明¹・阿部洋^{1,2,3} (¹名大院理、²JST CREST、³iGCORE)

Mechanistic Study of Irreversible Inhibition of Reverse Transcriptase with 2'-β-propargyl-seleno Nucleoside Analogue. (Graduate School of Science, Nagoya University¹, JST CREST², iGCORE³) YOSHIDA, Yuki¹; NIMI, Yushi; FUSHIHARA, Daichi¹; MURASE, Hirotaka¹; KIMURA, Yasuaki¹; ABE, Hiroshi^{1,2,3}

DNA や RNA といった核酸の構成要素であるヌクレオシドは、遺伝情報の保存のみならず、代謝の調節など様々な機能を持つ重要な生体分子である。天然のヌクレオシドはリボースの糖部と核酸塩基部からなる構造を持つ。この構造を模倣したヌクレオシドアナログはウイルス性疾患の治療薬として研究開発が行われている。AIDS や B 型肝炎などの重篤な疾患に対しても、逆転写酵素を標的として様々なヌクレオシドアナログが抗ウイルス薬として開発されてきた。しかしながら、それらの多くは DNA 鎖の伸長を停止させるだけであり、逆転写酵素を本質的には阻害していないため、複製阻害効果は一過性である。さらに、HIV のような複製エラーが起こりやすいウイルスでは薬剤耐性株の出現も問題になっており、新規の阻害形式を持つ逆転写酵素阻害剤の開発が強く求められる。

そこで当研究室では新たな阻害形式を期待して、デオキシアデノシンの 2'-β 位にメチルセラニル基を導入した 2'-deoxy-2'-β-methyl-selanyladenosine (dA^{Me-Se}) を合成した (図 1 (A))。この dA^{Me-Se} は逆転写酵素による伸長中の DNA に取り込まれた際、3'位のリン酸化を引き金にしてセレン原子が 3'位に求核攻撃し、鎖切断を引き起こすことが見出された (図 1 (B))。さらに、鎖切断に伴い求電子性の高いカチオン性セレニラン環を形成することで逆転写酵素の活性部位近傍のアミノ酸残基と反応し、逆転写酵素に対する共有結合阻害も期待された。実際に、dA^{Me-Se} を三リン酸化した dA^{Me-Se}TP は AMV 逆転写酵素を不可逆的に阻害することが一塩基伸長アッセイにより明らかとなった。しかし、共有結合を形成した逆転写酵素のアミノ酸残基や活性種であるカチオン性セレニラン環の反応点は不明であり、詳細な不可逆阻害メカニズムは明らかになっていない。

本研究では 2'-β-セレン修飾ヌクレオシドの不可逆阻害メカニズムを解明するために、2'-deoxy-2'-β-propargyl-selanyladenosine (dA^{Pro-Se}) を設計し (図 2)、それを用いて逆転写酵素に対する共有結合形成様式の解明に取り組んだ。dA^{Pro-Se} の三リン酸体は、逆転写酵素により伸長中の DNA 鎖に取り込まれると、図 1 (B) のメカニズムに基づき、逆転写酵素に対してアルキンタグ化が行われると考えられる。このアルキンタグ化された逆転写酵素に対してアジ化デスチオビオチンで Huisgen 環化付加反応によってビオチンラベル化し、affinity 精製により反応した逆転写酵素を回収する。現在 affinity 精製の条件最適化と単離されたタンパク質の MS 解析を進めている。発表ではその詳細について報告を行う予定である。

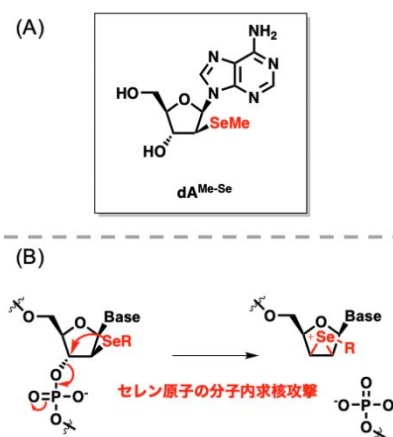
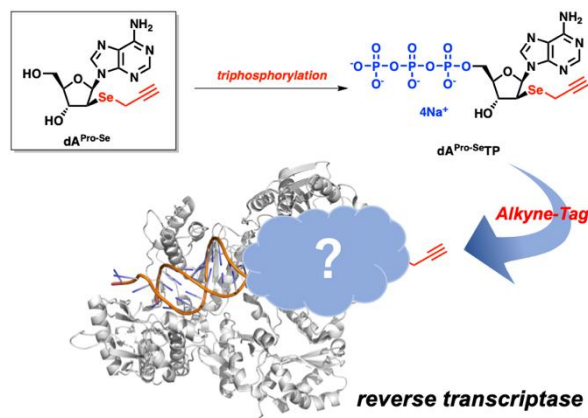


図 1. (A) dA^{Me-Se} の構造

(B) DNA 鎖切断メカニズム



核酸医薬への応用を指向した Staple 核酸の短鎖化および安定性の追求

○木田朋輝¹・勝田陽介¹・嘉村匠人¹・北村祐介¹・萩原正規²・佐藤慎一³・井原敏博¹ (¹ 熊本大学大学院先端科学研究部、² 弘前大学理工学部、³ 京都大学化学研究所)

Pursuit of shorten and stability of Staple oligomer for application to a nucleic acid medicine (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University¹, Faculty of Science and Technology, Hirosaki University², Institute for Chemical Research, Kyoto University³) KIDA, Tomoki¹; KATSUDA, Yousuke¹; KAMURA, Takuto¹; KITAMURA, Yusuke¹; HAGIHARA, Masaki²; SATO, Shin-ichi³; IHARA, Toshihiro¹)

核酸医薬は、低分子医薬や抗体医薬では狙うことが難しい mRNA を標的とすることが可能であることから、希少疾患の治療を可能とする新しい創薬モダリティとして大きな注目を集めている。一方、薬価が高いことが問題の一つとして挙げられており、医薬品としての品質を満たす核酸医薬を 100g 合成する場合には、天然塩基のみで構成した場合においても約 21 億円の費用がかかるとされている。従って核酸医薬の一般的な利用を拡大させるために、①投与核酸を短鎖化することで合成コストを削減する、②核酸医薬の生体内安定性を向上させ導入核酸を少量化する、という二点を考慮することが必須である。しかし、①の短鎖化に関しては、既存の標的 mRNA 切断型遺伝子発現抑制技術では導入する核酸を短鎖化することで標的 mRNA への結合に基づく副作用（オフターゲット効果）が顕著化してしまい、②の少量化に関しては、生体内安定性を向上させることが知られている人工核酸（Xeno Nucleic Acids : XNAs）を使用することで標的 mRNA 切断酵素に対する基質能が大きく低下し薬効が減弱するジレンマに挟まれる。

このような背景から、我々のグループは Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を用いて、RNA G-quadruplex (RGq) の形成を誘導し、標的遺伝子の発現を抑制する技術を開発した。本技術は、Staple 核酸が RGq の形成に必要なグアニン繰り返し配列近傍に結合することで機序を発動することから、標的外配列に結合して遺伝子発現制御機能を作動することはない。従って、Staple 核酸の短鎖化に伴うオフターゲット効果は限りなく弱いことが想定される。また、Staple 核酸は mRNA 切断酵素の基質となる必要はなく、使用する XNAs の位置および数に制限がない (Fig. 1)。標的 mRNA 切断型の核酸医薬で多く見られる Gapmer やヘテロ核酸とは異なるアプローチで核酸の医薬品化を目指すことが可能となる。

本発表では、種々の長さに短鎖化した Staple 核酸の RGq 形成誘導および XNAs を利用した Staple 核酸 (Staple XNAs) の遺伝子発現抑制効果に関して報告する。

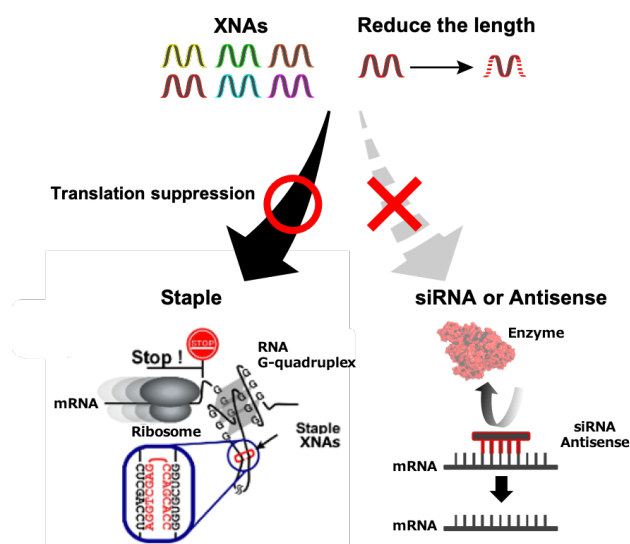


Fig. 1 The concept of Staple systems.

効率的な遺伝子発現能を有する超巨大人工細胞の構築を目的とした 超巨大リポソーム調製法の改良

○高橋萌・小川敦司（愛媛大 PROS）

Improvement of the method for preparing super-giant liposomes to construct a giant artificial cell capable of efficient gene expression in the interior (Proteo-Science Center, Ehime University) TAKAHASHI, Hajime; OGAWA, Atsushi

【緒言】人工細胞は、現時点では、生細胞機能の一部（遺伝子発現など）を模倣する小胞のことを指し、リポソームなどのカプセルに特定の生体分子を封入することで作製できる。人工細胞のカプセルには、生細胞サイズの巨大リポソーム（GUV, 直径 1~200 μm ）がよく使用されており、これまでに幾つかの GUV 調製法が報告されている。中でも「water-in-oil (W/O) エマルジョン界面通過法」が簡便で、リン脂質を含む油相（上相）の W/O エマルジョン（リン脂質逆ミセル）を、リン脂質単分子膜（油水界面）下の水相（下相）に移すだけで、簡単にリポソームを調製できる。逆ミセルの油水界面通過には一般的に遠心沈降が用いられるが、リポソームが破裂や融合するのを避けるために、逆ミセルに高密度溶質を封入することで、水相との密度差により自発的に界面を通過させることも可能である。特に、後者の自発通過法を用いれば、リポソームのサイズを制御できるだけでなく、肉眼観察可能な直径数 mm の超巨大リポソーム（SGUV）も調製できる。GUV に比して SGUV は、サイズ・量を厳密制御できることや観察が容易であるといった利点があるが、リポソーム内の高密度溶質が生化学反応（特に遺伝子発現）を阻害してしまう問題もあってか、人工細胞のカプセルとしては使用されてこなかった。そこで本研究では、SGUV の調製法を改良することで、コムギ無細胞系を“活性を保ったまま” SGUV に封入し、高効率な遺伝子発現活性を有する SGUV サイズの超巨大人工細胞の作製を試みた。

【実験】SGUV を調製するには、逆ミセル内にコムギ無細胞系とともに高密度溶質（スクロースなど）を封入する必要があるが、既報告の条件下では遺伝子発現が大幅に阻害されてしまう。そこで、初めに、コムギ無細胞系における黄色蛍光タンパク質（YPet）の発現を 20%以上阻害しない最大のスクロース濃度を調査した。次に、当該スクロース濃度下でコムギ無細胞系を封入するための SGUV の調製条件（油相ならびに水相の組成、温度条件）を最適化した。さらに、最適条件下で形成させたコムギ無細胞系封入 SGUV の内部で YPet を発現させ、SGUV 外の YPet 発現量と比較することで、SGUV 内の発現効率を評価した。

【結果】コムギ無細胞系の遺伝子発現を阻害しない最大スクロース濃度は約 1.5%で、既報告の SGUV 形成条件（約 30%）に比して極めて低濃度であった。1.5%スクロース濃度下では逆ミセルと水相の密度差が小さく、SGUV の調製は困難を極めたが、油相・水相組成および温度条件を最適化することで、安定なコムギ無細胞系封入 SGUV（直径 1.7 mm）の調製に成功した（存在時間：約 60 min 以上、調製確率: 90%以上）。また、最適条件下で調製した SGUV の内部における YPet の発現効率は、SGUV の外部における YPet の発現効率と同等であった（Fig. 1）¹⁾。

1) *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9*, 1608-1614.

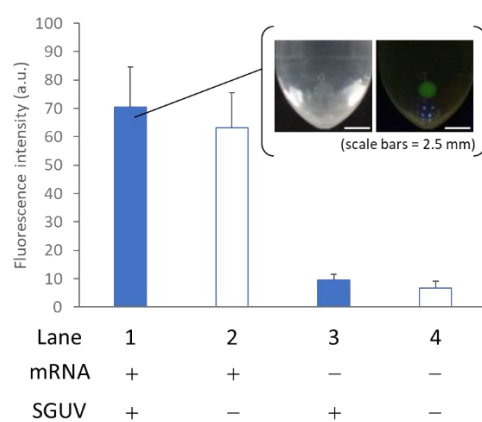


Fig. 1 SGUV 内外におけるコムギ無細胞系の YPet 遺伝子発現効率の比較
(写真左: 可視光 image、右: 蛍光 image)