

ポスター発表(2日目)

■ 2021年9月9日(木) 14:40 ~ 15:40 | 後半番号 Zoom

■ 奇数 (2P-049~2P-093)

[2P-049] DNA液相大量合成法のためのユニバーサルmPEG担体の開発

*西川 智貴¹、葛谷 明紀¹ (1. 関西大化学生命工)

[2P-051] 化学修飾プライマーを用いる一塩基変異識別定量PCR

*藤井 政幸¹、藤田 亮祐¹、園川 舞華¹、久野 雅明¹ (1. 近畿大学産業理工学部)[2P-053] 点変異mRNA選択的な遺伝子発現抑制を志向した光応答性 α -プロモアルデヒド修飾核酸の開発*小畑 健太郎¹、Dvořáková Ivana¹、太田 良¹、辰巳 颯一¹、和久 友則¹、小堀 哲生¹ (1. 京都工芸繊維大学)

[2P-055] DNAナノ構造体を足場にした多量体RuBisCOの構築

*小西 宏明¹、Dinh Huyen²、中田 栄司^{1,2}、跡見 晴幸³、森井 孝^{1,2} (1. 京都大学 エネルギー科学研究科、2. 京都大学 エネルギー理工学研究所、3. 京都大学 工学研究科)

[2P-057] 神経変性疾患に関わるリピートRNAとペプチドの相互作用解析

*建石 寿枝¹、大山 達也¹、田中 成典²、杉本 直己^{1,3} (1. 甲南大学 先端生命工学研究所 (FIBER)、2. 神戸大学院システム情報学、3. 甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科 (FIRST))

[2P-059] 活性化剤内包型ポーラスガラス上での核酸合成法の開発と光制御

*赤澤 紗彩¹、宮崎 祐宇¹、宮内 幸一郎¹、伊藤 優¹、大窪 章寛¹ (1. 東京工業大学生命理工学院)

[2P-061] DNA凝縮剤のカチオンクラスター長がDNA凝縮およびin vitro転写・翻訳に及ぼす影響

*根木 滋¹、山根 李奈¹、藪田 恵¹、神谷 亜門¹、羽森 真美¹、中川 由佳² (1. 同志社女子大学、2. 兵庫県立大学)

[2P-063] 超高速光架橋反応を利用したメチルシトシンからチミンへの光化学的塩基編集

*篠崎 一世¹、万 李成¹、中村 重孝¹、藤本 健造¹ (1. 北陸先端科学技術大学院大学)

[2P-065] Regulation of liposome aggregation using ultrafast DNA photocrosslinking

*ZUMILA HAILILI¹、Masakatsu Ichikawa¹、Shigetaka Nakamura¹、Kenzo Fujimoto¹ (1. School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[2P-067] Prototype Screening of HaloTag-based Chemigenetic Indicators

*Dazhou CHENG¹、Wenchao ZHU¹、Takuya TERA¹、Yusuke NASU¹、Robert Earl CAMPBELL^{1,2} (1. Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo、2. Department of Chemistry, University of Alberta)[2P-069] 感染症マーカーとしての α -アミラーゼを検出する¹⁹F MRIプローブの開発*大寺 雄也¹ (1. 大阪大学大学院工学研究科)

[2P-071] 微小液滴への組換え体大腸菌 1 細胞の封入によるタンパク質酵素スクリーニング系の構築

*安部 雄大¹、井川 善也²、松村 茂祥² (1. 富山大学大学院理工学教育部、2. 富山大学大学院理工学研究部)

[2P-073] 高コントラストながん幹細胞イメージングを指向したALDH1A1応答性turn-on型蛍光プローブの開発

*鈴木 叶瑛¹、麻植 雅裕¹、三木 康嗣¹、大江 浩一¹ (1. 京大院工)

[2P-075] 糖鎖高分子ブラシ界面を用いたサイトカインバイオセンシング

*寺田 侑平^{1,2}、高松 漂太³、齋藤 真人^{1,2}、民谷 栄一^{1,4} (1. 産総研 先端フォトニクス・バイオセンシングオープンイノベーションラボラトリ、2. 大阪大学工学部、3. 大阪大学医学部、4. 大阪大学産研)

[2P-077] 光レドックス触媒を内部に有する水溶性ナノ粒子を用いた光クリック反応の開発

*西岡 賢¹、中村 光伸¹、高田 忠雄¹ (1. 兵庫県立大学院工)

[2P-079] 液-液相分離環境下の超分子構造体の相選択性と酵素反応制御

*大林 洋貴¹、若林 里衣¹、後藤 雅宏^{1,2}、神谷 典穂^{1,2} (1. 九州大学工学部、2. 九州大学未来化学創造センター)

[2P-081] 両親媒性4-アミノキノリン誘導体のpHおよび塩濃度依存的な自己集合挙動の評価

*程 方舟¹、久松 洋介²、山本 勝宏³、高瀬 弘嗣⁴、梅澤 直樹²、樋口 恒彦² (1. 名古屋市立大学薬学部、2. 名古屋市立大学大学院薬学研究科、3. 名古屋工業大学大学院工学研究科、4. 名古屋市立大学大学院医学研究科)

[2P-083] Oxidation Ability of Tetrahedral Cu(II) Complexes Having Labile Coordination Site Relevant to Biological Copper Reaction Centers

*Lan Yang¹, Yuma Morimoto¹, Hideki Sugimoto¹, Shinobu Itoh¹ (1. Osaka University)

[2P-085] 抗炎症性脂肪酸代謝物17,18-EpETEの生体安定性向上を志向した類縁体合成

*秋田 真悠子¹、齋藤 雄太郎¹、雑賀 あずさ²、長竹 貴広²、上水 明治³、青木 淳賢³、國澤 純^{2,4}、山東 信介¹ (1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 国立医薬基盤・健康・栄養研究所、3. 東京大学大学院薬学系研究科、4. 大阪大学大学院薬学研究科)

[2P-087] GM3糖鎖およびGg3糖鎖で修飾したナタデココの合成と糖鎖間相互作用によって引き起こされる会合の評価

*飛渡 瑞希¹、長谷川 輝明² (1. 東洋大学大学院生命科学研究科、2. 東洋大学生命科学部)

[2P-089] キャピラリー電気泳動法を用いたリポソーム界面における物質透過現象のモーメント解析

*稲葉 隼汰¹、宮部 寛志¹ (1. 立教大学理学研究科)

[2P-091] メソポーラスシリカナノ粒子を用いたがんペプチドワクチンに関する研究

*上野 朋哉¹、後藤 浩一¹、松本 陽子¹ (1. 崇城大学大学院 工学研究科 応用生命科学専)

[2P-093] 核医学治療法を目指したAt-211標識機能化金ナノ粒子創製と評価

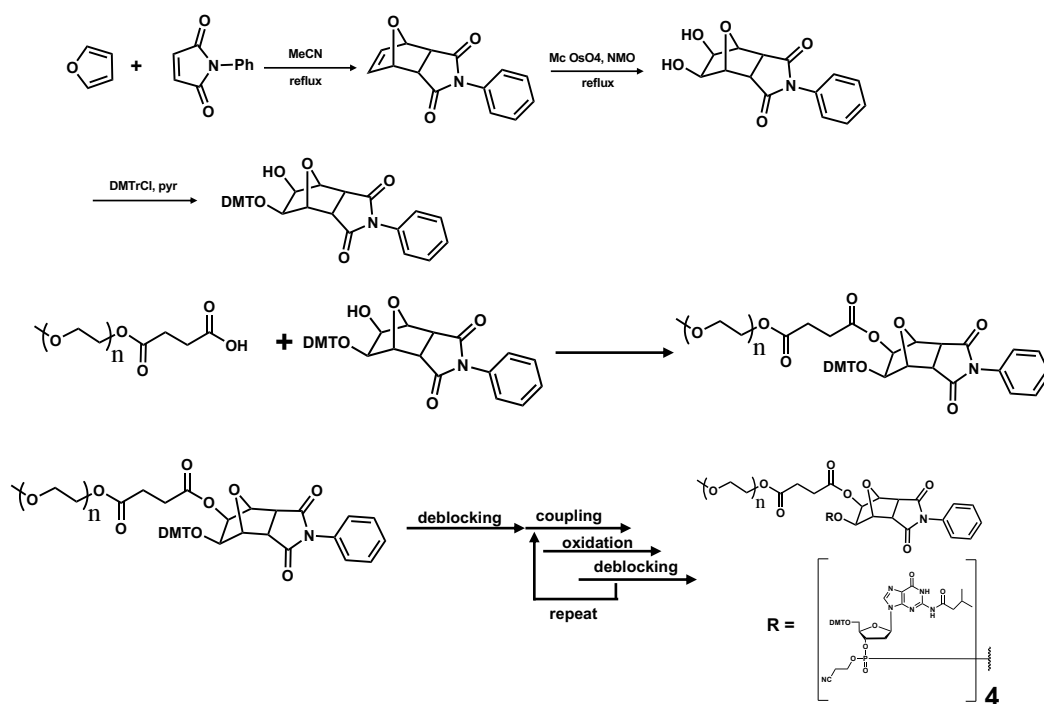
*黄 栩昊¹、樺山 一哉^{1,2,4}、角永 悠一郎^{2,4}、下山 敦史^{1,2,4}、大江 一弘^{3,4}、豊嶋 厚史^{2,4}、篠原 厚^{2,5}、深瀬 浩一^{1,2,4} (1. 大阪大学大学院理学研究科、2. 大阪大学放射線科学基盤機構、3. 大阪大学大学院医学系研究科、4. 大阪大学大学院理学研究科附属基礎理学プロジェクト研究センター、5. 大阪青山大学)

DNA 液相大量合成法のためのユニバーサル mPEG 担体の開発

○西川 智貴・葛谷 明紀（関西大化学生命工）

Development of universal mPEG carrier for mass synthesis of DNA liquid phase (Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai Univ.) Nishikawa Tomoki; Akinori Kuzuya.

核酸はナノテクノロジー分野での利用だけに留まらず、アプタマー¹⁾をはじめとするターゲット分子の検出分野や、アンチセンス試薬などの核酸医薬の分野でも利用されている。さらに近年、DNA の配列特異的な認識能や DNA への化学修飾が容易な点を利用することによる、DNA ヒドロゲルを開発する研究も盛んに行われている²⁾。DNA ヒドロゲルは、組織再生用足場材料や細胞培養基材、DDS (Drug Delivery System) 用材料の様な医療材料や、マイクロ流路などのスイッチング剤としての利用が期待されている。しかしながら、DNA ヒドロゲルの実用化は、大量に合成することが難しいため容易では無い。当研究室は、mPEG を担体として用いる Bonora らの HELP 法³⁾を活用し、PEG-DNA 間にエステル結合を有さない複合体の大量合成に成功している⁴⁾。本研究では、DNA 自動合成法のためのユニバーサルサポートとして利用されている UnyLinker⁵⁾を HELP 法に適用することで、個別の mPEG 担体の調製をすることなく DNA を大量に合成することを検討した。



Scheme 1. Synthesis of universal mPEG support.

Scheme 1 に示したように既法に従い UnyLinker を合成した。その後コハク酸で活性化されたメトキシ PEG とカップリングし、ユニバーサル mPEG 担体を合成した。この担体を用いてデオキシグアニンを四塩基伸長した。

- 1) Damm, K, Hemman, *et al.*, *EMBO J.* **2001**, 20, 6958–68.
- 2) Nagahara, S, *et al.*, *Polym. Gels Networks* **1996**, 4, 111–127.
- 3) G. M. Bonora *et al.*, *Biol. Proced. Online* **1998**, 44, 60-69.
- 4) S. Tanaka, *et al.*, *Chem. Asian J.* **2017**, 12, 2388-2392.
- 5) Vasulinga T. Ravikumar, *et al.*, *Chem. American S.* **2008**, 12, 3, 399-410.

化学修飾プライマーを用いる一塩基変異識別定量 PCR

○藤田亮祐、園川舞華、久野雅明、藤井政幸（近畿大産理工）

Quantitative PCR Discriminating Single Point Mutation Using Chemically Modified Primers (Department of Biological & Environmental Chemistry, Kindai University) FUJITA, Ryosuke; SONOKAWA, Maika; HISANO, Masaaki; FUJII, Masayuki

一塩基多型(SNPs)や癌ドライバー遺伝子における点変異の解析はゲノム医療の基盤技術として重要性を増している。PCR 技術は遺伝子解析を含めあらゆるバイオサイエンスの分野で汎用されている。しかしながら、野生型遺伝子と変異型遺伝子を同時に発現しているヘテロ型対立遺伝子を有する細胞内で両者を識別して定量解析することは困難である。

本研究では 3'-末端に 2'-OMe/LNA ホスホロチオエート骨格を導入した PCR プライマーを利用して *KRAS^{wt}* と *KRAS^{G12D}* を識別できる PCR 技術を開発することを目的として検討を行った。用いたテンプレート、プライマーは以下のとおりである。

T1 (227G)/ T2 (227A):

acttgtgtagtggagctg(g/a)ggcgtaggcaagagtccttgacgatacagctaattca-gaatcattttgtggacgaatatgatccaa

Reverse: 5'-ttgatcatattcgtccacaa-3'

F-KRAS((227G): 5'-acttgtgtagtggagctg^G-3'

F-KRAS (227A): 5'-acttgtgtagtggagctg^A-3'

大文字 = 2'-OMeRNA, LNA、小文字 = DNA、^ = ホスホロチオエート

DNA ポリメラーゼには TaKaRa Taq™, TaKaRa EX Taq™, HiDi DNA Polymerase™ の 3 つを用いた。TaKaRa Taq™ と HiDi DNA Polymerase™ は 3'-エクソヌクレアーゼ活性を持たず、TaKaRa EX Taq™ は 3'-エクソヌクレアーゼ活性（プルーフリーディング活性）を持っている。一例としてホスホロチオエートプライマーと TaKaRa Taq™ を用いた結果を表に示す。テンプレートとプライマー 3'-末端のミスマッチがある場合でも増幅反応が起こっていることがわかる。この場合、ミスマッチ塩基対のまま DNA 鎖を伸長したと考えられる。また、A-C ミスマッチでは増幅が遅かったが、G-T ゆらぎ塩基対ではかなり早い増幅が見られた。その他のポリメラーゼ、化学修飾プライマーの組み合わせについても考察する。

表. ホスホロチオエートプライマーと TaKaRa Taq™ を用いた *KRAS^{wt}/KRAS^{G12D}* 遺伝子の定量解析

	T1 (227G)		T2 (227A)	
Primer	Product	Ct	Product	Ct
G1 (PO)	++	16.12	+ (G-T)	17.52
G2 (PS)	++	15.57	+ (G-T)	16.50
A1 (PO)	+ (A-C)	20.84	++	17.10
A2 (PS)	+ (A-C)	19.48	++	16.87

点変異 mRNA 選択的な遺伝子発現抑制を志向した光応答性 α -ブromoアルデヒド修飾核酸の開発

○小畑健太郎・Ivana Dvořáková・太田良・辰巳颯一・和久友則・小堀哲生（京工繊大院工芸）

Photo-cross-linking oligonucleotides with a photoresponsive α -bromoaldehyde moiety for regulation of mRNA point mutations. (Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology) Kentaro Kobata, Ivana Dvořáková, Ryo Ota, Soichi Tatsumi, Tomonori Waku, Akio Kobori

特定の遺伝子上に生じる一塩基の変異が細胞のガン化に関与することが明らかとなっている。GTP 結合タンパク質をコードする K-ras 遺伝子は、コドン 12 のグアニンが、ウラシルまたはアデニンへと変異することで細胞のガン化を誘導することが報告されている。また、同じく GTP 結合性遺伝子の一つである Rac 遺伝子の点変異も細胞のガン化を誘導することが報告されている。このような遺伝子上に生じる一塩基の違いを識別することは非常に困難であり、従来の抗がん剤では変異型の遺伝子だけでなく、正常な遺伝子の機能も抑制し、副作用を引き起こすという問題があった。そのため一塩基の差を正確に識別し、点変異をもつ遺伝子の選択的な翻訳抑制を可能とする新たな抗がん剤の開発が強く望まれている。

我々は、点変異を有する変異型 RNA とのみ反応する光架橋性核酸を利用することで、疾患関連タンパク質の選択的発現制御を可能とする薬剤の開発を目指している。当研究室ではこれまでに、光反応性基である光応答性 α -クロロアルデヒドを有する光架橋性核酸 $^{pro}PCA-ODN^{(1)}$ を開発しており、生理的条件下においてアデノシンおよびシトシンと選択的かつ高効率で架橋できることを報告している。また一方で、我々は細胞内で光架橋反応を利用した遺伝子発現抑制について評価しており、架橋効率だけでなく反応速度も重要であるという知見を得ている⁽²⁾。そこで本研究では、反応速度のさらなる向上を目指し、 α -ハロアルデヒド部位の塩素を臭素へと変更した光架橋性核酸 $^{pro}PBA-ODN$ (Figure 1a) を新たに設計した。

合成した $^{pro}PBA-ODN$ と標的 RNA を用いて光架橋実験を行った。その結果、 $^{pro}PBA-ODN$ は点変異 RNA (ORN(A), $\square$)と選択的に光架橋反応を起こした(Figure 1b)。また、その反応速度を $^{pro}PCA-ODN$ ($\square$)と比較したところ、5.3 倍増加することが明らかとなり、架橋反応の反応速度を向上させることに成功した。本発表では、変異型 K-ras mRNA を発現する Panc-1 細胞内において、 ^{pro}PBA を導入した光架橋性核酸による遺伝子発現抑制効果を検討したことについても発表する。

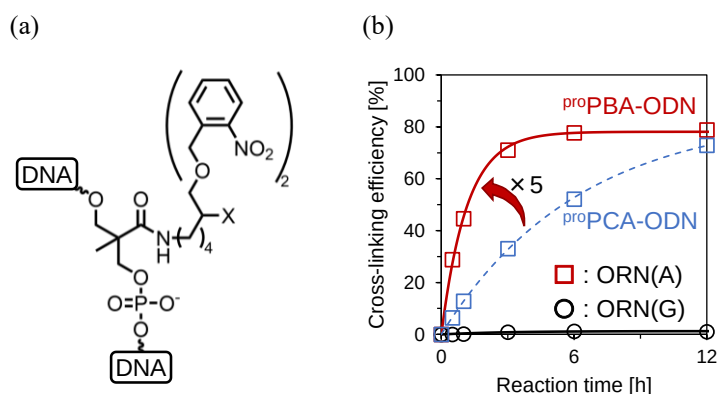


Figure 1. Photo-cross-linking studies on ODNs containing ^{pro}PBA . (a) Chemical structure of Photoresponsive ODNs. ($^{pro}PCA-ODN:X=Cl$, $^{pro}PBA-ODN:X=Br$) (b) Time course of the photo-cross-linking reactions between ORNs and $^{pro}PXA-ODN$.

(1) Y. Sugihara, *et al.*, *J. Org. Chem.*, **2016**, *81*, 981-986.

(2) Y. Sugihara, *et al.*, *Chem. Lett.*, **2017**, *46*, 1265-1268.

DNA ナノ構造体を足場にした多量体 RuBisCO の構築

○小西宏明¹・Dinh Huyen²・中田栄司^{1,2}・跡見晴幸³・森井孝^{1,2} (¹京大院エネ、
²京大エネ研、³京大院工)

Folding of the multimer RuBisCO on the DNA nanostructure scaffold (Graduate School of Energy Science, Kyoto University¹, Institute of Advanced Energy, Kyoto University², Graduate School of Engineering, Kyoto University³) KONISHI, Hiroaki¹; HUYEN Dinh²; NAKATA, Eiji^{1,2}; ATOMI, Haruyuki³; MORII, Takashi^{1,2}

生体細胞内での酵素は、単一の酵素が多量体を構築したり、複数の酵素が区画内で連続して配置されることで、空間的に制限を受けていることが知られている。代謝に関わる酵素もこのような組織化によって、反応物や中間体の濃度を制御して酵素反応の効率化が実現されと考えられる。植物細胞や細菌中に存在する酵素 RuBisCO は炭酸固定化反応を担う酵素であり、多量体を構築することで活性を持ち、その多量体が集合した区画の中で高効率な反応を進める系も存在する¹⁾。このような酵素複合体を試験管内で再現することで、生体内での高効率な代謝反応の機構を解析できる。本研究では、ホモ十量体からなる好熱性古細菌由来の RuBisCO (Tk-RuBisCO)²⁾に着目し、DNA オリガミ法³⁾で構築した DNA ナノ構造体上に集積させる方法を検討した。当研究室ではこれまでに、DNA 結合性タンパク質を介して、DNA ナノ構造体上の特定の位置に目的タンパク質を配列特異的に一分子ずつ配置する技術を開発してきた^{4,5)}。この方法を用いることで、平面に 5 箇所の二量体タンパク質結合部位を有する DNA ナノ構造体が Tk-RuBisCO 十量体を配置する足場になると考えた。

Tk-RuBisCO に GCN4 ロイシンジッパーを融合したタンパク質 GCN4-Tk-RuBisCO (G-TkRBC) (Fig. (a))を合成し、その酵素活性をリブローズ-1,5-ビスリン酸のカルボキシル化反応から評価した。その結果、元の Tk-RuBisCO に比べて低いものの活性が確認された。次に、GCN4 が結合する DNA 配列を含む DNA ナノ構造体 (Fig. (b))に G-TkRBC が結合することを原子間力顕微鏡 (AFM) 観察とアガロースゲル電気泳動によって確認した。また、この複合体の酵素活性を評価した結果、遊離状態の G-TkRBC よりも活性の増大が見られた。

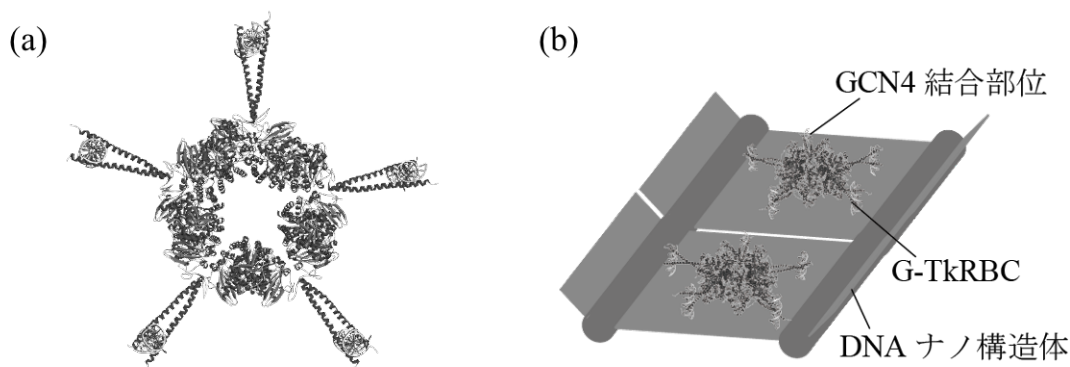


Figure. (a) 十量体 G-TkRBC および (b) GCN4 結合部位を含む DNA ナノ構造体との複合体の模式図

- 1) Bonacci, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012, **109**, 478-483.
- 2) Kitano K.; Maeda N.; Fukui T.; Atomi H.; Imanaka T.; Miki, K.; *Structure* 2001, **9**, 473-481.
- 3) P. W. K. Rothmund, *Nature* 2006, **440**, 297-302.
- 4) Ngo, T. A.; Nakata, E.; Saimura, M.; Kodaki, T.; Morii, T. *Methods* 2014, **67**, 142-150.
- 5) Ngo, T.; Dinh, H.; Nguyen, T.M.; Liew, F-F.; Nakata, E.; Morii, T. *Chem. Commun.* 2019, **55**, 12428-12446

神経変性疾患に関わるリピート RNA とペプチドの相互作用解析

○建石寿枝¹・大山達也¹・田中成典²・杉本直己^{1,3} (¹ 甲南大 FIBER、² 神戸大院システム情報学、³ 甲南大 FIRST)

Analysis for interactions between repeated RNAs and peptides involved in neurodegenerative diseases

(¹Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), ²Department of Computational Science, Graduate School of System Informatics, Kobe University, ³Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University) TATEISHI-KARIMATA, Hisae¹; OHYAMA, Tatsuya¹; TANAKA, Shigenori²; SUGIMOTO, Naoki^{1,3}

神経変性疾患に関わるリピート配列をもつ RNA とペプチドの相互作用により形成される凝集体は、神経変性疾患細胞内において毒性を示すため、凝集体形成の詳細な機構を解明することが求められている (1)。本研究では、試験管内及び実細胞内において、神経変性疾患に関連するリピート RNA(r(GGGGCC)₈ および r(GGGUUA)₈)を用いて、リピート RNA の構造やリピート RNA とペプチドの相互作用を解析した。まず、CD スペクトルおよび未変性ゲル電気泳動によってリピート RNA の構造を解析した結果、100 mM KCl を含む緩衝溶液中において r(GGGGCC)₈ と r(GGGUUA)₈ は四重らせん構造を形成することが示された (Figure 1)。さらに、これらのリピート RNA を含む溶液の 350 nm の紫外線散乱強度を測定した結果、四重らせん構造を形成するリピート RNA は液滴を形成することが示された (2)。さらに、四重らせん構造を形成するリピート RNA に、神経変性疾患細胞内で蓄積しているペプチド (GR リピートなど) を添加すると、RNA-ペプチドの凝集体が形成されることが明らかになった。神経変性疾患の細胞内環境は、正常細胞と大きく異なると推察され、また、これまでの研究成果によって、四重らせん構造の形成は、周辺環境の影響を顕著に受けることを我々は見出している (3)。講演では、細胞内の環境変化に応答したリピート RNA の構造や液滴形成についても解析し、化学的観点から液滴形成メカニズムを考察する。

【参考文献】

- 1) H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, *49*, in press.
- 2) H. Tateishi-Karimata*, Y. Teng*, and N. Sugimoto (*Equal contribution), *Biochemistry*, **2020**, *59*, 1961–2040.
- 3) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 642–651.

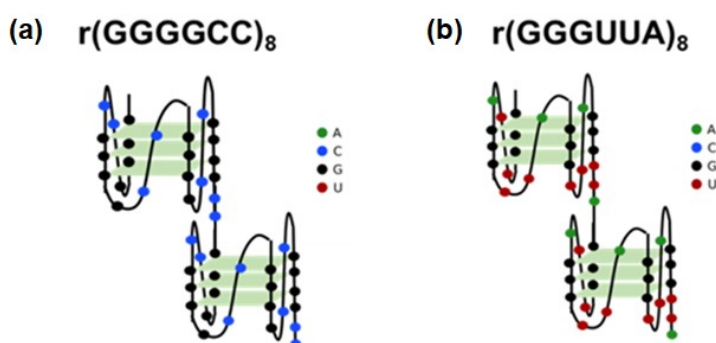


Figure 1. Expected structures of (a) r(GGGGCC)₈, and (b) r(GGGUUA)₈.

活性化剤内包型ポーラスガラス上での核酸合成法の開発と光制御

○赤澤紗彩・宮崎祐宇・宮内幸一郎・伊藤優・大窪章寛（東工大生命）

Development of a new method using photolabile protective groups for synthesis of oligonucleotides on a porous glass contain an activator (Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)
AKAZAWA, Saaya; MIYAZAKI, Yu; MIYAUCHI, Koichiro; Ito, Yu; OHKUBO, Akihiro

現在、汎用されている核酸合成では 100 nm 程度の細孔径を有するポーラスガラスを固相担体として用いる。このポーラスガラスは光透過性が低く、光分解性保護基を利用した核酸合成では使用できないと考えられてきた。そこで、今回、我々はポーラスガラスの光透過率の向上を目指して屈折率の違う様々な溶媒を使用し、それぞれの光透過性を詳細に検討した。その結果、トルエン-ジオキサン、またはトルエン-ジクロロメタンを一定の割合で混合した溶媒を用いれば、大幅に光透過性が向上する（80%以上）ことがわかった。

ついで、この知見に基づき、図 1 のように、ポーラスガラスに担持したヌクレオシド 5'-水酸基に導入した光分解性保護基の脱保護実験を行ったところ、1mm 厚の板状ポーラスガラス上でも、迅速に保護基が分解することを見出した。

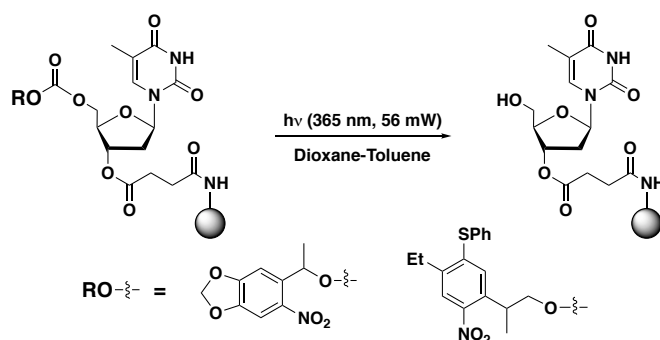


図 1

一方で、活性化剤を導入したポーラスガラスを用いれば、図 2 に示すように担体上に活性中間体を捕捉することができ、オリゴヌクレオチドの合成における縮合反応の効率が向上するということも見出している。そこで、さらなる合成効率の向上を期待し、様々なリンカーを介して HOBt 誘導体を導入した固相担体を合成し、この担体を用いたオリゴヌクレオチドの合成効率評価を行った。また、これらの反応を用いた核酸合成の光制御も行ったので、あわせて報告する。

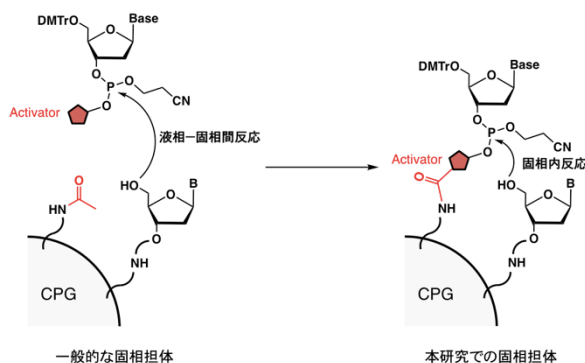


図 2

DNA 凝縮剤のカチオンクラスター長が DNA 凝縮および *in vitro* 転写・翻訳に及ぼす影響

○根木 滋¹・山根李奈¹・薮田 恵¹・神谷亜門¹・羽森真美¹・中川由佳²

(¹同志社女子大学・薬、²兵庫県立大)

Effect of cation cluster length on DNA condensation and *in vitro* transcription/translation (¹Doshisha Women's University, ²University of Hyogo) NEGI, Shigeru¹; YAMANE Momona¹; YABUTA Megumi¹; KAMIYA Amon¹; HAMORI Mami¹; NAKAGAWA Yuka²

ゲノム DNA は非常に長く負に帯電した生体高分子であり、細胞核やバクテリオファージのカプシドのような微小空間内に凝縮して収納されている。この過程にはヒストタンパク質やポリアミンが関与している。また、ゲノム DNA は、凝縮・脱凝縮の大きなコンフォメーション変化を起こすことで、転写・翻訳に影響を与え、遺伝情報の伝達、細胞分裂や分化など、生体内でさまざまな生命現象の役割を担っている。このような背景を受けて、DNA の凝集過程のメカニズムに関する研究はこれまでに多くの研究者によってなされてきている。

そこで我々は、種々の鎖長を持つオリゴアルギニン Rn (n=4,8,16) を合成し、それらとウシ胸腺由来 DNA (Calf Thymus DNA : CT DNA) との相互作用について様々な物理化学的手法 (等温滴定型熱量測定 (Isothermal Titration Calorimetry: ITC), 動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS), ゼータ電位, 原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope: AFM)) を用いて検討を行った。さらに、T7 プラスミド DNA を用いて、Rn / T7 プラスミド DNA 複合体が *in vitro* 転写・翻訳活性へ及ぼす影響についても検討を行った。

ITC 測定では R4 において、一定発熱が生じた後、そのまま反応が終結し、発熱反応が見られなくなるという結果が得られた。一方 R8 および R16 では、連続した一定発熱後に、中和点付近で急激な発熱ピーク (maximum heat) が生じ、その後反応が終結し発熱が認められなかった。このことから、R8 および R16 では相状態が変化する 2 つの状態があることが考えられる。さらに、反応途中の段階を数点ピックアップし、DLS、AFM、ゼータ電位でさらに複合体の形態について検討した。DLS 測定では、R4 は最初の段階から大きな粒子径をもち、さらに滴下回数の増加に伴い粒子径が増大した。一方、R8、R16 では R4 と比較すると非常に小さな粒子径が形成され、maximum heat の段階で粒子径が増大した。また、PdI 値では、全ての Rn においてどの段階でも比較的均一な粒子径が形成された。特に R16 では、滴下回数の増加とともに均一性も増大した。AFM 観察では、R4 では不定形で大きな凝集塊が、R8 および R16 では小さな球形粒子や粒子同士が凝集している像が観察された。ゼータ電位測定では、R4 は中和点まではほぼ 0 に近い値を示した。一方 R8 および R16 では、最大発熱点まではゼータ電位は正の値となり、R8 と R16 を比較すると R16 の方が約 +10 mV 高い値を示した。また、いずれの鎖長でも最終点においては DNA が過剰に入っていることからマイナスの値を示した。さらに、DNA の凝集状態と *in vitro* 転写・翻訳との関係性をルシフェラーゼアッセイより評価した。その結果、R4 は転写翻訳活性が 4 等量まではやや上昇もしくは変化が見られなかった。一方、R8 では DNA に対する R8 の割合が増加するに伴い活性が低下した。さらに、R16 では DNA に対し少量でも急激に転写翻訳活性が低下し、DNA よりも R16 の割合が多くなると活性が完全に転写翻訳が阻害された。

以上の結果より、オリゴアルギニンの総カチオン数を合わせた状態にも関わらず、カチオンクラスターの鎖長が異なることで、DNA 凝集過程に大きな違いがあることが分かり、CTDNA との凝集体形成がオリゴアルギニンの鎖長に大きく依存することが明らかとなった。さらに、R8、R16 では同じような複合体形成をとっていても、カチオンクラスターの鎖長や表面電荷が異なることで、転写翻訳機能にまで影響を与えるという興味深い結果が得られた。

超高速光架橋反応を利用したメチルシトシンからチミンへの光化学的塩基編集

○篠崎一世・万李成・中村重孝・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Photochemical 5-methylcytosine to thymidine editing using ultrafast DNA photo-cross-linking(School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and technology)SHINOZAKI Issei; WAN Licheng; Nakamura Shigetaka; Fujimoto, Kenzo

遺伝子は、生物の設計図であり、タンパク質の形成に必要な情報を有している。この遺伝子に変異が生じることにより遺伝子疾患を引き起こす。遺伝子変異の一塩基置換はゲノム全体で 1000 万個以上あることが知られており、中にはアルツハイマー病や心臓疾患などに関連が指摘されているものもある。この様に一塩基置換に伴う疾患は生命活動に重大な影響を及ぼす。近年、化学的塩基編集法¹、人工 DNA 切断酵素である、TALEN や CRISPR/Cas9 を用いた方法²やシトシンデアミナーゼ³を用いた核酸塩基編集は、遺伝子疾患の治療法として注目を集めている。

我々は、光により架橋・開裂可能な 3-Cyanovinylcarbazole(CNVK)を用いた、シトシンからウラシルへのピンポイント光核酸塩基編集法を開発している⁴。また、標的シトシン周辺環境を変化させることにより、生理的条件下で脱アミノ化効率を誘起できることが報告されている⁵。これまでの光核酸塩基編集法では、RNA 鎖中のシトシンをウラシルへと変換してきた。一方、DNA 鎖中にはシトシン誘導体であるメチルシトシンが存在しており、脱アミノ化によりチミンへと変換される。本研究では、メチルシトシンからチミンへの脱アミノ化反応を光核酸塩基編集法により変換可能か検証した。また、メチルシトシンとシトシンの脱アミノ化反応に僅かな違いがあることから、シトシン 5 位の置換基が脱アミノ化効率に影響を与えているかシトシン誘導体を用いて評価した。

DNA 鎖中のメチルシトシンからチミンへの光核酸塩基編集の結果、90℃、3 時間で 80%程度の脱アミノ化反応の進行を確認した。また、シトシン誘導体の脱アミノ化反応を検証した結果、シトシン 5 位の置換基が脱アミノ化反応に影響を与えており、親水性が高いほど脱アミノ化効率が高いことを見出したので、詳細を報告する。

Reference

- 1) A. Chhibber, et. al., *Anal. Biochem.*, **2008**, 377, 46.
- 2) L. Cong, A. Ran et al, *Science.*, **2013**, 339, 819.
- 3) P. Pham, R. Bransteitter, M. F. Goodman, *Nature.*, **2003**, 424, 103.
- 4) S. Sethi, S. Nakamura, K. Fujimoto, *Molecules.*, **2018**, 23, 828.
- 5) S. Sethi, N. Honda, L. Wan, S. Nakamura, K. Fujimoto, *ChemBioChem.*, **2018**, 19, 2257

超高速 DNA 光架橋を用いたリポソーム凝集の光制御

○ズミラ ハリリ¹・市川優勝¹・中村重孝¹・藤本健造¹ (¹ 北陸先端大先端科学)

Regulation of liposome aggregation using ultrafast DNA photocrosslinking (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology¹) ZUMILA, Halili¹; Ichikawa, Masakatsu¹; Nakamura, Shigetaka¹; Fujimoto, Kenzo¹

リポソームは細胞膜のモデル系¹として研究が進んでいる他、ドラッグデリバリーのキャリア²としても注目されている。リポソーム表面には酵素や核酸など様々な生体分子を固定することが可能である。ポリエチレングリコールを表面に修飾することにより、血中滞留性が向上することも報告されている。これらリポソームの凝集・分散を制御することができれば、ドラッグデリバリーとして使用した際の局所的な薬効の向上や副作用の低減などが期待できる。DNA を表面に修飾し、二本鎖形成に伴うリポソームの凝集に関する報告³がいくつかなされているが、凝集を制御することはできていない。

我々はこれまで光応答性人工核酸を用いた超高速 DNA 光架橋反応⁴を報告しており、3-cyanovinylcarbazole nucleoside(^{CNV}K)を含む DNA は数秒の光照射により相補鎖中のピリミジン塩基と光架橋することができる。また、細胞内アンチセンス効果の光制御やリポソーム表面での光誘導型 DNA ナノ構造形成に伴うリポソームの構造変化などを報告している。この超高速 DNA 光架橋反応は光照射のタイミングや照射エネルギーにより反応をリモートで制御できるという利点がある。そこで、DNA 修飾したリポソームに ^{CNV}K を含むリンカーDNA を添加し、光照射を行った。リポソームにはそれぞれ 5'-AAAAAAAAACCCAGGTTCTCT-3'を固定したリポソーム A と 5'-TCACAGATGCGTAAAAA AAAA-3'を固定したリポソーム B を準備し、それらを 5'-CA^{CNV}KCTGTGAAGAGAA^{CNV}KCT-3'で繋いだ。共焦点顕微鏡観察結果より、光照射によるリポソーム凝集を確認した。また、光照射のエネルギーによりリポソーム凝集を制御することに成功した。

- 1) Singer SJ, Nicolson GL, *Science*, **175**;720-31 (1972).
- 2) Bethany A, Okhil KN, Katherine ER, James BD, *Molecules*, **25**;5672 (2020).
- 3) Dave N, Liu J, *ACS Nano*, **5**;1304-12 (2011).
- 4) Fujimoto K, Yamada A, Yoshimura Y, Tsukaguchi T, Sakamoto T. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**;16161-7 (2013).

Prototype Screening of HaloTag-based Chemigenetic Indicators

CHENG Dazhou¹; ZHU Wenchao¹; TERAJ Takuya¹; NASU Yusuke¹; CAMPBELL Robert Earl^{1,2} (Graduate School of Science, The University of Tokyo¹, Department of Chemistry, University of Alberta²)

Functional imaging using protein-based fluorescent indicators is now a cornerstone of biology, allowing noninvasive measurement of cellular function by measuring the concentration related to the change in fluorescence¹. Recently, hybrid **chemigenetic** indicators have emerged as a promising new design. In a chemigenetic indicator, the protein-based molecular recognition moiety is maintained, but a synthetic dye is used as a fluorophore to replace the protein fluorophore. In doing so, the fluorescence properties of the indicator can be greatly improved, while keeping the two main advantages of protein-based indicators - cell-specific expression and established molecular recognition motifs native to nature.

To date there are just two representative examples of this type of indicator, the HaloCaMP1 calcium ion (Ca^{2+}) indicator and the HASAP1 voltage indicator². As of yet, this approach has not been shown to be broadly applicable to a wide range of analytes.

Furthermore, optimization and improvement of the existing first generation chemigenetic indicators remain largely unexplored². Here, we explore the versatility of a chemigenetic indicator design based on the self-labeling HaloTag protein, a fluorogenic

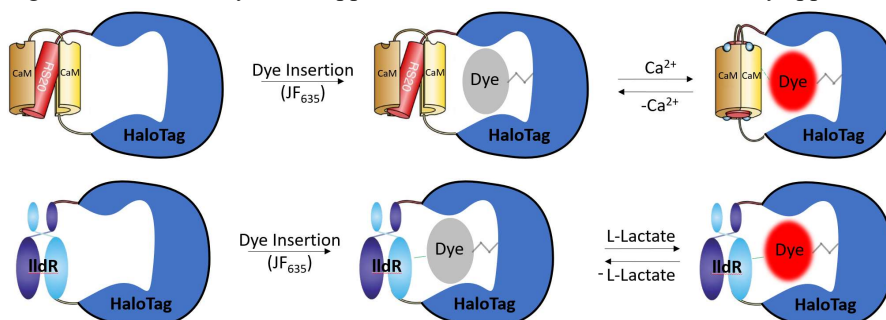


Fig. 1. Schematic illustration of our strategy for chemigenetic indicator development. A sensing domain protein is inserted into HaloTag such that after binding of JF₆₃₅-HTL, conformational change in the sensor protein domain alters fluorescence signal of the conjugated fluorophore.

rhodamine derivative dye³, and a protein-based molecular recognition moiety. In principle, this design strategy should enable the versatile design of different indicators by simply changing the sensing domain of the protein framework (Fig. 1). So far, we have designed two kinds of chemigenetic indicators based on this framework: a Ca^{2+} indicator and an L-lactate indicator.

In this design, we inserted the sensing domain (calmodulin-RS20 for Ca^{2+} indicator, and IldR for lactate indicator) onto different sites on the loop of the HaloTag protein from position 143 to 178, then fused the same synthetic fluorophore (JF₆₃₅-HTL, with chloroalkane linker³) onto the protein framework to test the efficacy of fluorescence change under the presence of Ca^{2+} and L-lactate, respectively. In total, 32 different insertion sites for each indicator design were tested. We found that inserting the sensing domain onto the loop around position 165-166 of HaloTag showed the highest fluorescence response for Ca^{2+} indicator (HaloCI) and L-lactate Indicator (HaloLI). Both showed similar λ_{ex} (~658 nm) when labeled with JF₆₃₅-HTL. Both HaloCI and HaloLI showed fluorescence intensity change in the presence of Ca^{2+} and L-lactate respectively, while HaloCI showed higher sensitivity and fluorescence change in the presence of Ca^{2+} (-94% for 39 μM of Ca^{2+}).

In summary, our results show the versatility of our designed framework, while further exploitation for indicators targeting different molecules is to be done, as well as optimizations on each indicator based on the framework.

1) Dana, H. *et al*, *Elife*, **5**, e12727 (2016)

2) Deo C, *et al*, *Nature Chemical Biology*, **17**, 718–723 (2021)

3) Grimm, J., Muthusamy, A., Liang, Y. *et al*, *Nat Methods*, **14**, 987–994 (2017)

感染症マーカーとしての α -アミラーゼを検出する ^{19}F MRI プローブの開発

○大寺雄也¹⁾、杉原文徳^{2、3)}、蓑島維文¹⁾、菊地和也^{1、2、4)} (¹⁾ 阪大院工、²⁾ 阪大 IFReC、³⁾ 阪大微研、⁴⁾ 阪大 QIQB)

Activatable ^{19}F MRI probes for in vivo Detection of α -Amylase as Infectious Disease Marker (Graduate School of Engineering¹, Immunology Frontier Research Center², Research Institute for Microbial Diseases³, Center for Quantum Information and Quantum Biology⁴, Osaka University) OTERA Yuya¹; SUGIHARA Fuminori^{2,3}; MINOSHIMA Masafumi¹; KIKUCHI Kazuya^{1,2,4}

病原性のバクテリアは様々な感染症の原因となっており、その治療や診断のために病原性バクテリアを生体内で検出する手法が求められている。我々は病原性バクテリアが持つ感染症マーカーとして α -アミラーゼに着目した。いくつかの病原性バクテリアは α -アミラーゼを分泌するため、その感染部位周辺において α -アミラーゼのレベルが増大することが報告されている^[1]。このことから、本研究では生体内で α -アミラーゼ活性を検出するプローブの開発を目的とした。生体内で酵素活性を検出する方法として核磁気共鳴画像法である MRI は有用なツールである。中でも、 ^{19}F MRI は生体内にほとんど存在しない ^{19}F を観測核としているため、 ^{19}F MRI 造影剤由来のシグナルはバックグラウンドシグナルに妨害されることなく観測することができる。我々はこれまでに常磁性緩和促進効果 (PRE 効果) を利用して酵素活性を検出する ^{19}F MRI プローブを開発してきた^[2]。PRE 効果とは、常磁性種が持つ不対電子スピンの影響で、その近傍に存在する観測核の横緩和時間 T_2 が著しく減少する現象のことである。 T_2 は、MRI シグナル強度と相関があるパラメーターであるため、 T_2 を制御することで MRI シグナルの OFF/ON のスイッチングをすることができる。

本研究では、これまでに開発してきた ^{19}F MRI プローブの原理に基づいて、 α -アミラーゼ活性を検出する ^{19}F MRI プローブをデザインした (図 1)。このプローブは α -アミラーゼの基質である糖鎖を隔てて、常磁性種である Gd^{3+} の錯体と観測核種の ^{19}F を同一分子内に修飾した構造をしている。そのため、 α -アミラーゼ非存在下では PRE 効果により ^{19}F MRI シグナルは OFF になっているが、 α -アミラーゼ存在下では糖鎖が切断されることで、PRE 効果が解消され、 ^{19}F MRI シグナルが ON になる。このシグナル増大型 ^{19}F MRI プローブを開発し、 α -アミラーゼ活性の ^{19}F MR イメージングに成功したので本発表で報告する。

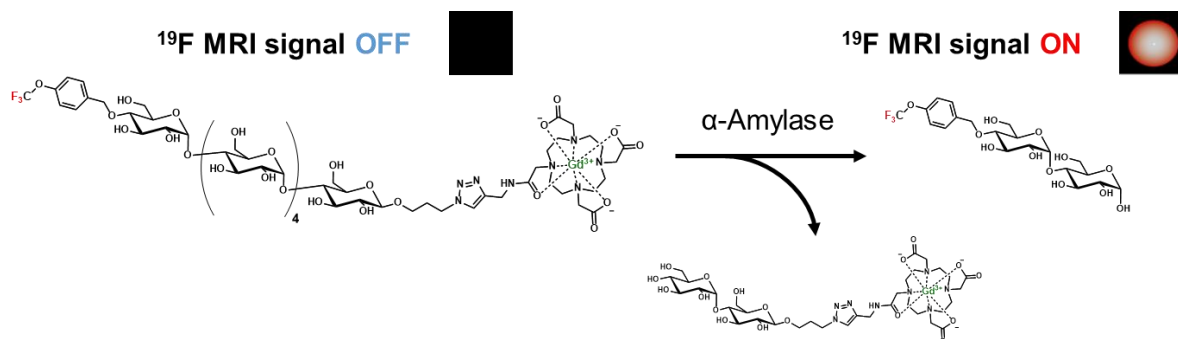


図 1. PRE 効果を利用した α -アミラーゼ活性検出 ^{19}F MRI プローブ

[1] E. Azzopardi, *et. al. Surgery* **2016**, 160, 26-37.

[2] S. Mizukami, *et. al. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 794–795.

微小液滴への組換え体大腸菌 1 細胞の封入によるタンパク質酵素スクリーニング系の構築

○安部雄大・井川善也・松村茂祥（富山大院理工）

A Screening System for Protein Enzymes by Encapsulating a Single Cell Recombinant *E. coli* into a Microdroplet (Graduate School of Science and Engineering, Toyama University) ABE, Kazuhiro; IKAWA, Yoshiya; MATSUMURA, Shigeyoshi

タンパク質酵素は一般に自由度の大きいポリマーからなる複合体であることから、その触媒機能を論理的に改変・改良することは大きな労力を必要とする。そのため、生体高分子を人為的に「進化」させる進化分子工学は、タンパク質酵素の機能改変のための強力な方法論である。近年、「液滴マイクロ流体システム」を用いた進化学が発展しつつある。液滴マイクロ流体システムとは、ピコリットル (10^{-12} L) サイズの微小な液滴内にさまざまな物質を封入し（図 1）、またその液滴を高速で解析・分取（図 2）できる装置である。この装置を用いて、1 つの液滴内に 1 個の細胞を区画化し、その細胞が産生するタンパク質酵素の活性を解析・分取できれば、目的の活性をもつ酵素の遺伝子を有する細胞を、多数の細胞の中から選別することができる。すなわち、タンパク質酵素の遺伝子にランダムな変異を導入して細胞のスクリーニングを繰り返すことで、酵素活性の改変・向上が可能になる。ただし、多数の液滴に細胞を偏りなく封入し、その液滴内で酵素活性を解析するには、細胞を均一に分散させる菌懸濁液の組成、液滴間を基質・生成物が移動しない水相・油相の組成など、さまざまな条件の検討が必要である。

本研究では、モデル実験として大腸菌 (JM109 株) に β -ガラクトシダーゼの遺伝子をもつプラスミド DNA (pUC18) を導入した大腸菌懸濁液を用いて、各液滴内での酵素活性の測定を目指し、条件検討を行った。酵素反応に伴い蛍光生成物を生じる基質を用いることで、液滴内の酵素活性を蛍光強度で測定することができるよう、系をデザインした。基質に Fluorescein di(β -D-galactopyranoside) (FDG) を用いることで、液滴間の生成物の移動を抑制でき、個々の液滴内での酵素活性を個別に検出することに成功した。

さらに、大腸菌が偏りなく均一に封入されているかを確認するため、複数の異なる菌体密度条件で大腸菌の封入実験を行い、細胞を含有する液滴の割合（占有率）がどのように変化するかを解析した。ポアソン分布から予想される占有率に極めて近い実測値が得られたことから、細胞を密度の偏りなく液滴に封入できたと考えられる。また、液滴の蛍光強度が酵素反応時間に比例して増大することも確認できた。さらに、大腸菌を培地とともに液滴に封入・保温して培養し、液滴内でのタンパク質発現量を増大させることにも成功した。

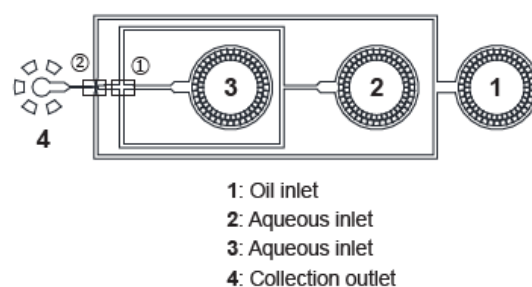


図 1. 微小液滴作製デバイスの概略図

1 のインレットからオイル、2 と 3 のインレットから反応試薬を送液し、4 のアウトレットから液滴を回収する。

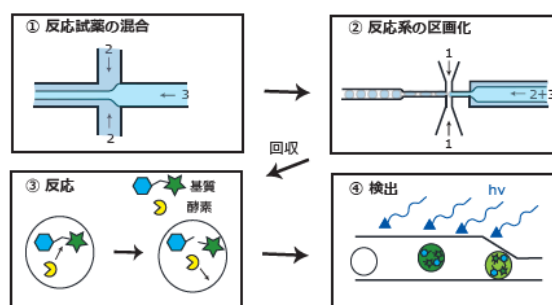


図 2. 酵素活性検出までの概略図

①2 と 3 のインレットから送液した反応試薬の混合、
②混合液をオイルで区画化、③液滴をインキュベーション、④励起光を当て各液滴の蛍光強度測定。

高コントラストながん幹細胞イメージングを指向した ALDH1A1 応答性 turn-on 型蛍光プローブの開発

○鈴木叶瑛・麻植雅裕・三木康嗣・大江浩一（京大院工）

ALDH1A1-Responsive Turn-on Fluorescent Probe for High-Contrast Cancer Stem Cell Imaging (Graduate School of Engineering, Kyoto University) SUZUKI, Kanae; OE, Masahiro; MIKI, Koji; OHE, Kouichi

がん幹細胞（Cancer Stem Cell: CSC）は、がんの転移、増殖、治療抵抗性に関与することが知られており¹⁾、CSC を選択的に可視化する蛍光プローブは、CSC を標的とする治療に有効に働くと考えられる。当研究室ではこれまでに、CSC を標的とした近赤外蛍光イメージングプローブ **CyA4** を開発した（Figure 1a）。**CyA4** は、CSC のバイオマーカーとして知られるアルデヒド脱水素酵素（aldehyde dehydrogenase 1A1: ALDH1A1）に応答し発光するため、腫瘍中の CSC を可視化できる。しかし、**CyA4** は ALDH1A1 との反応前において、蛍光発光する開環体をわずかに含むことにより、完全に消光せず、CSC と通常のがん細胞（Normal Cancer Cell: NCC）との間のコントラストが低下する点を改善する必要があった。

本研究では、高コントラストな CSC イメージングを達成するため、新たに2つのプローブ **β -Me-CyA4** と **o -Me-CyA4** を合成した（Figure 1b, c）。これらは、それぞれ1,3-チアジナン環上とベンゼン環上にメチル基を有する。メチル基の立体的な効果により、酵素反応前における開環体（蛍光 ON）と閉環体（蛍光 OFF）との平衡反応を閉環体側に偏らせ、バックグラウンド発光を抑制することを狙った分子設計である。 **o -Me-CyA4** に ALDH1A1 を作用させたところ、反応前後での蛍光強度比は 2.05 であった。一方、 **β -Me-CyA4** における蛍光強度比は 10.1 であり、これは **CyA4** の値を約3倍上回る値であった（Figure 2a）。さらに膵臓がん細胞（SUIT-2）を用いた場合の CSC と NCC との間の蛍光強度比は、**CyA4** が 3.7 であったのに対し、 **β -Me-CyA4** では 10.3 であった（Figure 2b）。このことから **β -Me-CyA4** は生体内においてもバックグラウンド発光を抑制し、**CyA4** より高コントラストに CSC を可視化できると期待される。

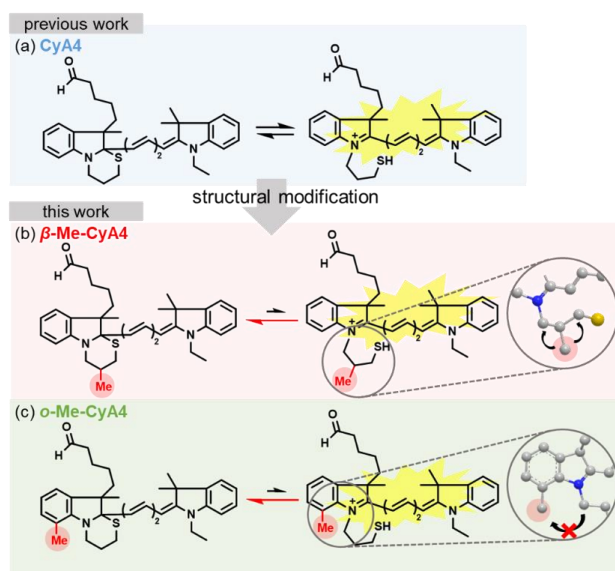


Figure 1. Equilibrium of (a) **CyA4**, (b) **β -Me-CyA4**, and (c) **o -Me-CyA4**.

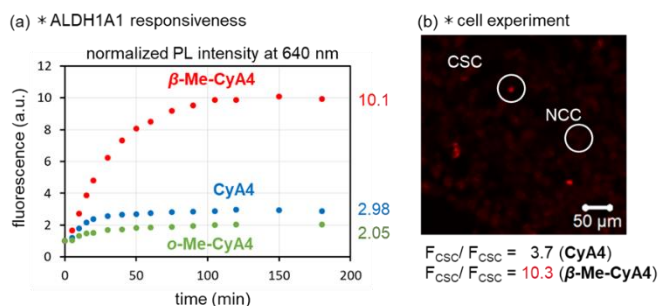


Figure 2. (a) Normalized fluorescence intensity of probes at 640 nm after treatment with ALDH1A1. (b) Representative confocal image of SUIT-2 cells incubated with 1.0 μ M **β -Me-CyA4** ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{det}} = 633 \text{ nm}/647\text{--}759 \text{ nm}$).

- 1) a) B. Beck, C. Blanpain, *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 727–738; b) D. Bonnet, J. E. Dick, *Nat. Med.* **1997**, *3*, 730–737.

糖鎖高分子ブラシ界面を用いたサイトカインバイオセンシング

○寺田侑平^{1,2}・高松漂太³・齋藤真人^{1,2}・民谷栄一^{1,4} (¹産総研-先端フォトバイオ、²阪大院工、³阪大院医、⁴阪大産研)

Cytokine Biosensing using Glycopolymer-brush Interface (AIST PhotoBIO-OIL¹, Graduate School of Engineering, Osaka University², Graduate School of Engineering, Osaka University³, ISIR, Osaka University⁴)
 TERADA, Yuhei^{1,2}; TAKAMATSU, Hyota³; SAITO, Masato^{1,2}; TAMIYA, Eiichi^{1,4}

表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサーは、金属の表面近傍における生体分子間相互作用によって生じる屈折率変化を、ラベルフリーかつリアルタイムで測定できる魅力的なデバイスである。特に、金属ナノ構造を用いた局在型表面プラズモン共鳴(Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)を用いたバイオセンサーは光学系がシンプルであることから、臨床現場即時診断の応用に向けて有用な手法として注目されている。我々の研究グループでは、ナノインプリントリソグラフィおよび金のスパッタによって、金ナノピラー構造を有し LSPR を発揮する、大量生産可能かつシンプルな測定系での検出が可能なセンサーチップを開発した(M. Saito et al., *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5494-5500)。これらをマイクロ流路デバイスと組み合わせることで、単一細胞の分泌物解析に向けた応用が期待されている。しかしながら、水中における検出感度に未だ課題があり、さらに抗体の表面修飾に多段階の固定操作およびブロッキングを必要とするなどといった問題がある。また LSPR バイオセンサーでは金属表面に固定する分子認識界面の設計が感度および選択的検出に重要である。そこで、分子認識素子として糖鎖高分子という材料に着目した。糖鎖高分子は高分子の側鎖に糖鎖を提示した人工合成高分子で、糖脂質および糖タンパク質のように糖鎖が密集した集合体であり、多点的な相互作用によりタンパク質と特異的かつ強く結合する機能を有する。さらに近年の高分子合成技術の発展に伴って簡便な手法で様々な設計の糖鎖高分子が合成可能になり、ナノメートルオーダーでの精密な設計制御を行うことができる。本研究では可逆的付加開裂連鎖移動(Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer: RAFT)重合という合成方法を用いて、長さの制御された糖鎖高分子を合成し、金ナノピラーチップを用いた LSPR バイオセンサーに応用した。RAFT 重合で合成された糖鎖高分子は還元操作によってチオール基を末端に提示させることができ、金-チオール結合で金表面に直接固定することで糖鎖高分子ブラシ界面を形成させることができた。また、長さの異なる糖鎖高分子[GP20、GP100、GP200(数字は量体数を示す)]をそれぞれ固定した金ナノピラー上に、細胞分泌タンパク質であるサイトカインを加えた。その際、サイトカイン吸着に伴い生じる金表面近傍の屈折率変化を LSPR 吸収スペクトルのピークシフトによって検出した(図 1)。結果、短い糖鎖高分子を用いることで得られるピークシフト量が増加する、即ち検出感度の増加につながるということが明らかになり、糖鎖高分子ブラシ界面の有用性が示唆された。

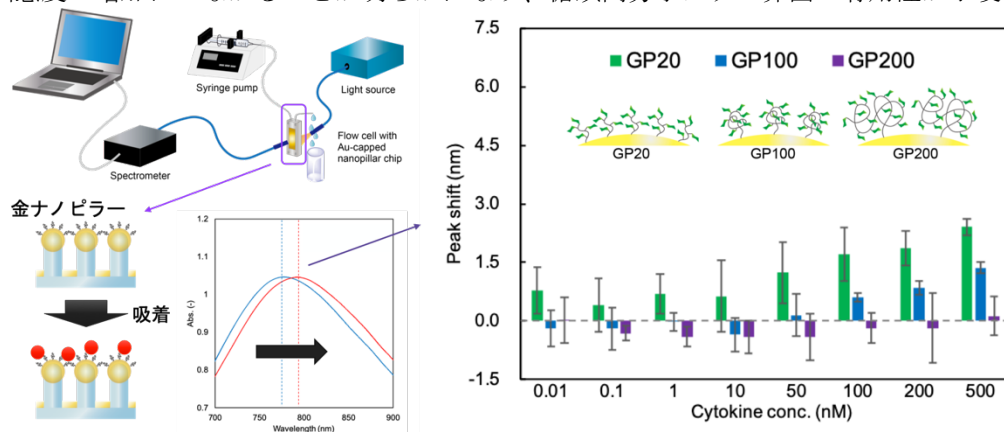


図 1. 糖鎖高分子固定化金ナノピラーを用いたサイトカインの LSPR バイオセンシング

光レドックス触媒を内部に有する水溶性ナノ粒子を用いた 光クリック反応の開発

○西岡賢・中村光伸・高田忠雄（兵庫県立大院工）

Photo-click reaction by water-soluble single-chain nanoparticles containing photoredox catalysis (Graduate School of Engineering, University of Hyogo) NISHIOKA, Ken; NAKAMURA, Mitsunobu; TAKADA, Tadao

銅触媒を用いたアジド-アルキン環化付加反応はクリック反応と呼ばれ、基質選択性と反応性が高く、生体直交型反応として生体系における標的分子の標識や活性化法として広く研究されている(Fig.1a)。また、反応の時空間制御を可能とする光をトリガーとした新規クリック反応の開発とその生体反応への応用に関する研究が広く行われている¹⁾。本研究では、光レドックス触媒を内部に有する水溶性ナノ粒子を作製し²⁾、水溶液中における光クリック反応の開発を行った(Fig.1b)。

可視光レドックス触媒として働くペリレンジイミド(PDI)と水溶性の PEG を側鎖に持つポリマーを合成し、疎水性 PDI の自己会合によって PDI をコアにもつ水溶性ナノ粒子(P-NP)を作製した(Fig.2a)。脱酸素条件下、P-NP 水溶液に電子供与犠牲剤を加え 480 nm の光を照射すると、PDI の一電子還元体(PDI^{•-})が生じた(Fig.2b)。ここに Cu(II)を加えると PDI^{•-}は消失し、Cu(I)を与えることが分かった。次に P-NP を触媒とした CuAAC 反応を行い、¹H NMR と HPLC を用いて反応解析を行った(Fig.2c)。アジドとアルキンの存在下、480 nm の可視光を照射し、その後 HPLC を用いて反応の進行を追跡した。その結果、光を照射したときに目的とする生成物が良好な収率で得られた(Fig.2d)。生体共役反応への応用を検討するため、エチニル基を 5 位に有するウリジンを基質として反応を行ったところ、同様に目的の付加生成物が観測された。以上のことから、P-NP が光クリック反応を誘起し、生体共役反応の触媒として働くことが示された。

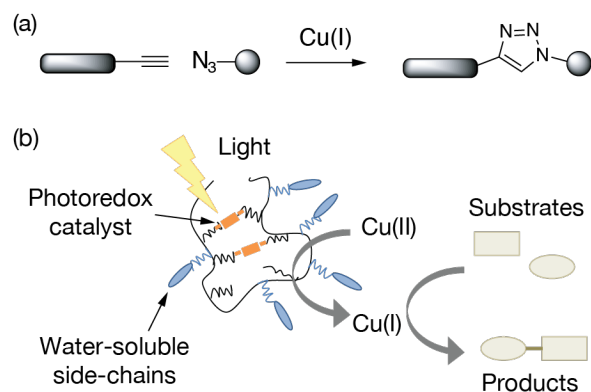


Fig 1. (a) Copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) "click reaction". (b) Water-soluble single-chain polymeric nanoparticles (SCNPs) with photoredox molecules catalyzing reduction of Cu(II) and the following click reaction.

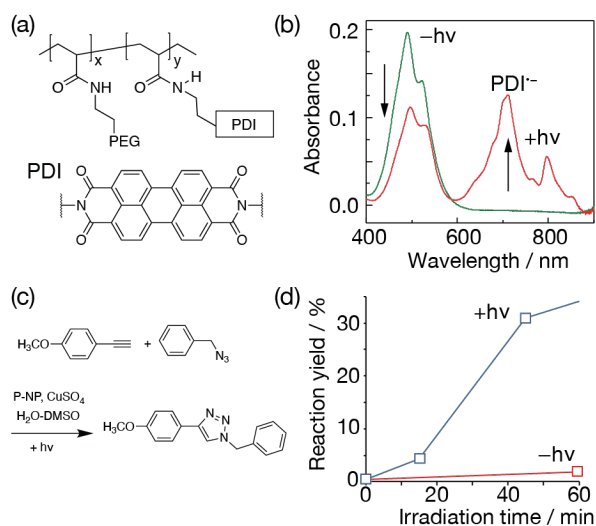


Fig 2. (a) Chemical structure of P-NP. (b) Photoreduction of P-NP. (c) Reaction scheme of photo-click reaction. (d) Reaction yield against the irradiation time.

- 1) Fairbanks, B. D.; Macdougall, L. J.; Mavila, S.; Sinha, J.; Kirkpatrick, B. E.; Anseth, K. S.; Bowman, C. N. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 6915.
- 2) Gonzalez-Burgos, M.; Latorre-Sanchez, A.; Pomposo, J. A. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6122.

液-液相分離環境下の超分子構造体の相選択性と酵素反応制御

○大林洋貴¹・若林里衣¹・後藤雅宏^{1,2}・神谷典穂^{1,2} (¹九大院工、²九大未来化セ)

Phase selectivity of hierarchical supramolecular polymers and control of enzymatic activity under liquid-liquid phase separation environment (Graduate School of Engineering, Kyusyu University¹, Center for Future Chemistry, Kyushu University²) O_BAYASHI, Hiroki¹; WAKABAYASHI, Rie¹; GOTO, Masahiro^{1,2}; KAMIYA, Noriho^{1,2}

液-液相分離 (liquid-liquid phase separation, LLPS) を通して形成される液滴 (ドロップレット) は、細胞内の複雑な環境において、翻訳や代謝等の様々な反応を制御する区画化された場として重要な役割を果たしている [1]。また、アクチンに代表される細胞内の生体超分子構造体が、集合状態に応じたドロップレット選択性を有することが報告されている [2]。我々はこの現象が生体超分子に限定されず人工超分子にも現れるのではないかと考え、両親媒性ペプチド (PA) からなる超分子構造体のドロップレット選択性を調査した。また、PA 超分子構造体がタンパク質を非特異的に物理的に吸着する性質 [3] を利用し、ドロップレット中の PA 超分子構造体への酵素集積化と連続酵素反応の制御を試みた。

超分子構造体として、相補的な水素結合ユニットであるシアヌル酸 (Cya) とメラミン (Mel) を PA と蛍光分子ニトロベンゾフラザン (NBD) とにそれぞれ導入した Cya-PA と Mel-NBD からなる共集合体 (Cya-PA/Mel-NBD) を利用した [4]。これは、天然の超分子構造体と類似した階層性を有する点、NBD 由来の蛍光によって直接的に構造体の観察が可能である点で有用である。Cya と PA とをつなぐ炭化水素リンカー長が長い Cya-PA-L と短い Cya-PA-S とを構築し、それぞれの集合挙動を評価した。また、ポリエチレングリコール (PEG) とデキストラン (DEX) からなる人工的な LLPS 環境下におけるドロップレット選択性を評価した。結果として、Cya-PA-L/Mel-NBD は Cya-PA-S/Mel-NBD と比較して大きく発達した共集合体を形成し、DEX-rich ドロップレットへの顕著な局在性を示した。また、この構造体はタンパク質の局在性にも影響を与え、元々 PEG-rich 連続相、DEX-rich ドロップレット相にそれぞれ局在する二種類の酵素がいずれも DEX-rich ドロップレット相に局在を変化させることが示され、その結果、連続酵素反応を促進することが示唆された。

[1] M. K. Rosen *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 285–298 (2017). [2] K. Yoshikawa *et al.*, *ChembioChem*, **19**, 1370–1374 (2018).

[3] S. Roy *et al.*, *Biomacromolecules*, **21**, 4180–4193 (2020). [4] R. Wakabayashi *et al.*, *Chem. Commun.*, **55**, 6997–7000 (2019).

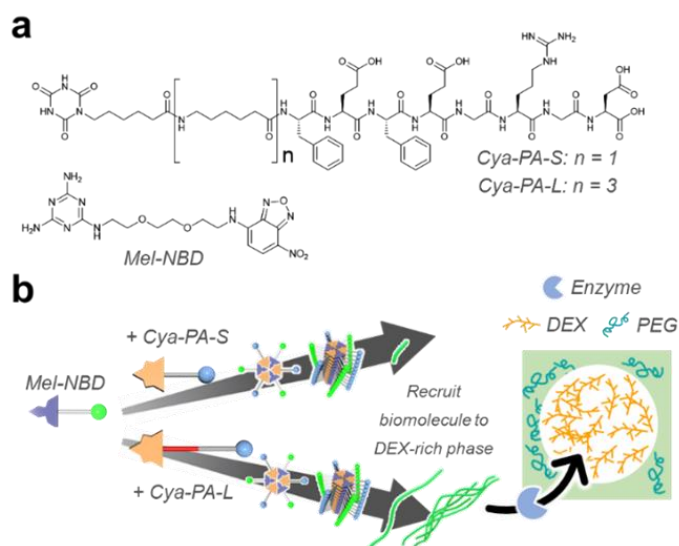


Fig. 1 (a) Molecular Structure (b) Schematic illustration.

両親媒性 4-アミノキノリン誘導体の pH および塩濃度依存的な自己集合挙動の評価

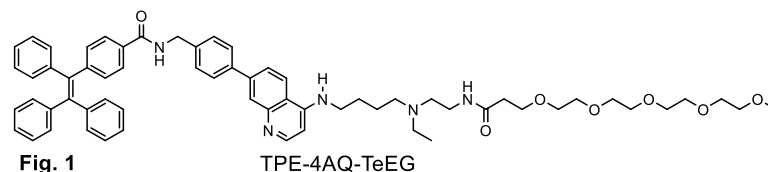
○程 方舟¹・久松洋介²・山本勝宏³・高瀬弘嗣⁴・梅澤直樹²・樋口恒彦²

(¹名古屋市大薬、²名古屋市大院薬、³名古屋工大工、⁴名古屋市大院医)

Evaluation of pH- and Salt Concentration-Dependent Self-Assembly Behavior of an Amphiphilic 4-Aminoquinoline Derivative (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University¹, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University², Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology³, Graduate School of Medical Sciences, Nagoya City University⁴) CHENG, Fangzhou¹; HISAMATSU, Yosuke²; YAMAMOTO, Katsuhiko³; TAKASE, Hiroshi⁴; UMEZAWA, Naoki²; HIGUCHI, Tsunehiko²

非共有結合性相互作用を利用して分子が自発的に集合すると、秩序のある分子集合体が得られる場合がある。例えば、適切に設計された両親媒性分子を用いれば水中で多彩な分子集合体を構築可能であり、それらは薬物送達キャリアや組織工学材料など超分子マテリアルとして応用が期待できる¹⁾。

本研究では、刺激応答性分子集合体を水中で構築することを目的とし、新たなビルディングブロックの設計、合成に着手した。当研究室ではこれまでに、4-アミノキノリン部位のヘム結合親和性に着目した人工ヘムレセプターの開発に取り組んできた²⁾。今回、4-アミノキノリン部位の pH 応答性に着目し、両親媒性 4-アミノキノリン誘導体 TPE-4AQ-TeEG の設計、合成および水中での自己集合挙動について検討した (Fig. 1)。また、自己集合を蛍光強度変化として評価するために、疎水性部分に凝集誘起発光性を有するテトラフェニルエチレン (TPE) を採用した。



合成した TPE-4AQ-TeEG は、DMSO 中では会合しないため凝集誘起発光は認められなかった。一方、水を 80%以上含む緩衝液中では、TPE 由来の 474 nm 付近の蛍光強度が顕著に増大したことから、集合体を形成することが示唆された。次に、TPE-4AQ-TeEG (10 μM) の pH 依存的な自己集合挙動について検討した (Fig. 2)。その結果、pH 5.5 では TPE-4AQ-TeEG の蛍光強度は非常に低く、中性やアルカリ性になるにつれ蛍光強度が大きく増大した。これは弱酸性条件では第三級アミン部位とキノリン環の窒素原子のプロトン化により自己集合が抑制され、中性からアルカリ性では脱プロトン化によって自己集合が促進されたためと考えられた。続いて、TPE-4AQ-TeEG の自己集合に対する塩濃度の影響を調べた。その結果、0.10 M NaCl 存在下では、pH 5.5 においても TPE-4AQ-TeEG は発光し、その蛍光強度は pH 7.4 よりも pH 5.5 の方が大きかった。TPE-4AQ-TeEG は pH 応答性に加えて塩濃度に応答した自己集合挙動を示すことが分かった。本発表では、これらの結果に加え、TPE-4AQ-TeEG の自己集合によって形成された分子集合体の透過型電子顕微鏡観察および小角 X 線散乱測定の結果についても併せて報告する。

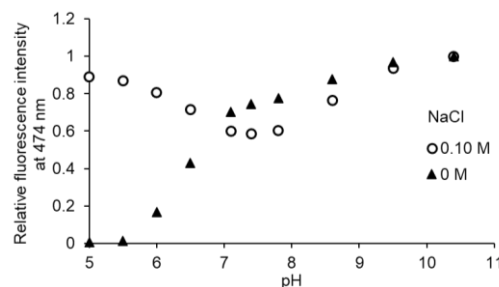


Fig. 2 pH-Dependent change in fluorescence intensity of TPE-4AQ-TeEG (10 μM) in 10 mM buffer (0.5% DMSO) containing 0 M or 0.10 M NaCl. λ_{ex} = 330 nm, 25 °C.

1) E. Krieg, M. M. C. Bastings, P. Besenius, B. Rybtchinski, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 2414-2477.

2) a) Y. Hisamatsu, N. Umezawa, H. Yagi, K. Kato, T. Higuchi, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 7455-7467. b) Y. Hisamatsu, K. Otani, H. Takase, N. Umezawa, T. Higuchi, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 6489-6499.

銅酵素活性中心を模倣した配位活性四面体型 Cu(II)錯体の酸化機能

○楊 瀾・森本 祐麻・杉本 秀樹・伊東 忍（阪大院工）

Oxidation Ability of Tetrahedral Cu(II) Complexes Having Labile Coordination Site Relevant to Biological Copper Reaction Centers (Graduate School of Engineering, Osaka University) YANG, Lan; MORIMOTO, Yuma; SUGIMOTO, Hideki; ITOH, Shinobu

On the basis of the generally accessible I/II redox couple and bioavailability, copper containing enzymes play a wide variety of roles in biological systems. In order to get insights into the chemical properties of mononuclear copper reaction centers with a tetrahedral geometry in dopamine β -monooxygenases (D β M), peptidylglycine α -hydroxylating monooxygenase (PHM), and blue copper proteins,¹ model complexes having tetrahedral geometry are in great importance. In this study, we prepared a series of Cu(II) complexes with different external ligand $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{TMG}_3\text{tach})(\text{X})]^+$ ($\text{X} = \text{F}^-$, Cl^- , Br^- , AcO^-) by using a tridentate ligand TMG_3tach consisting with three TMG (tetramethylguanidine) donor groups and a rigid *cis*, *cis*-1, 3, 5-triaminocyclohexane (tach) framework.² In contrast to the biomimetic mononuclear tetrahedral Cu(II) complexes supported by well-known Tp (hydrotrispyrazolylborate) ligands which easily changed from tetrahedral geometry to square-pyramidal geometry upon addition of a slight amount of a coordinating solvent such as DMSO and DMF,³ Cu(II) complexes supported by TMG_3tach undergo ligand exchange reaction with maintaining the tetrahedral geometry.²

In this study, we examined the reactivity of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{TMG}_3\text{tach})(\text{X})]^+$ to find that the oxidation ability is largely influenced by the labile site ligands X. Mechanistic studies on the oxidation reaction were performed using substrates having weak C–H bond (1,4-cyclohexadiene) and O–H bond (phenol) to get insights into importance of the tetrahedral geometry and the labile ligands X.

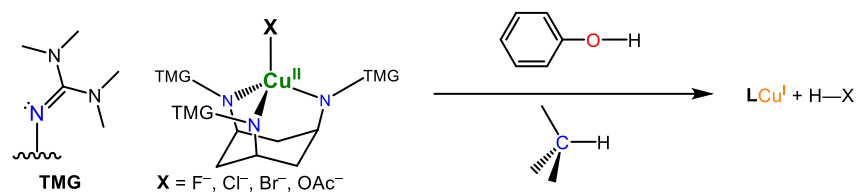


Figure 1. Oxidation reactions of $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{TMG}_3\text{tach})(\text{X})]^+$ ($\text{X} = \text{F}^-, \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{AcO}^-$)

[Reference]

- 1) E. I. Solomon, *et al.*, *Chem. Rev.* **2014**, 114 (7), 3659–3853.
- 2) S. Itoh, *et al.*, *Inorg. Chem.*, **2017**, 56, 9634–9645.
- 3) N. Kitajima, *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3210.

抗炎症性脂肪酸代謝物 17,18-EpETE の生体安定性向上を志向した類縁体合成

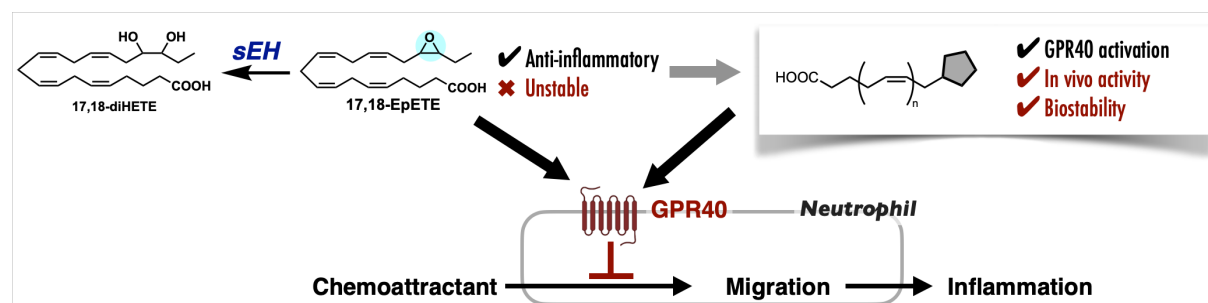
○秋田真悠子¹・齋藤雄太郎¹・雑賀あずさ²・長竹貴広²・上水明治³・青木淳賢³・國澤純^{2,4}・山東信介¹ (1 東大院工、2 国立医薬基盤・健康・栄養研究所、3 東大院薬・4 阪大院薬)

Synthesis of anti-inflammatory fatty acid metabolite 17,18-EpETE analogues with improved biostability
(Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition², Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo³, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University⁴) AKITA, Mayuko¹; SAITO, Yutaro¹; SAIKA, Azusa²; NAGATAKE, Takahiro²; UWAMIZU, Akiharu³; AOKI, Junken³; KUNISAWA, Jun^{2,4}; SANDO, Shinsuke¹

炎症は生命維持に欠かせない重要な生体防御機構であるが、多くの疾患に関与していることが知られている。炎症は、炎症性および炎症抑制性の脂質メディエーターの働きにより制御されているが、これらの働きが適切でなくなると、機能不全や疾患が引き起こされる。そのため、脂質メディエーターの働きを介して炎症を適切に制御することが健康維持において重要である。炎症制御には、炎症性メディエーターの機能抑制か、炎症抑制性メディエーターの機能増幅が考えられる。現在用いられている抗炎症薬の多くは、炎症性メディエーター生成酵素の阻害剤であり、免疫不全などの副作用が問題となっている。そこで、炎症抑制性メディエーターに着目した創薬が注目されている。

炎症抑制性メディエーターの一つである 17,18-Epoxyeicosatetraenoic acid (17,18-EpETE) は、抗炎症・抗アレルギー作用を有し、接触皮膚炎や腸管アレルギーに対する抑制効果が実証されている^{1,2)}。接触皮膚炎における抗炎症効果については、17,18-EpETE が好中球表面の G タンパク質共役受容体である GPR40/FFAR1 を活性化し、好中球の遊走を阻害する作用機序が示されている。一方で、17,18-EpETE は、生体内で可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) により容易にジオール体である 17,18-diHETE へと変換される。17,18-diHETE は GPR40 活性化能および抗炎症活性を持たないことから、17,18-EpETE そのものを医薬として応用するのは困難である。

そこで本研究では 17,18-EpETE の生体安定性の向上を志向し、エポキシド部位や鎖長をより安定と考えられる構造に改変した化合物の設計・合成を行った。GPR40 活性化能を TGF- α 切断アッセイ³⁾により評価し、17,18-EpETE と同程度の GPR40 活性化能を有する化合物を見出した。さらに、細胞実験およびマウスモデルを用いた動物実験において、見出した化合物が 17,18-EpETE と同様の抗炎症作用を有することを確認した。本発表では、候補化合物群の合成および評価について報告する。



参考文献

- 1) T. Nagatake *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2018**, *142*, 470–484.
- 2) J. Kunisawa *et al.*, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9750.
- 3) A. Inoue *et al.*, *Cell* **2019**, *177*, 1933–1947.

GM3糖鎖およびGg3糖鎖で修飾したナタデココの合成と 糖鎖間相互作用によって引き起こされる会合の評価

○飛渡瑞希¹・長谷川輝明² (¹東洋大院生命、²東洋生命)

Synthesis of nata de coco carrying GM3- and Gg3-trisaccharides and their associations induced by carbohydrate-carbohydrate interactions (Graduate School of Life Sciences, Toyo University¹, Faculty of Life Sciences, Toyo University²) TOBITO, Mizuki¹; HASEGAWA, Teruaki²

隣り合う細胞表面のスフィンゴ糖脂質 (GSLs) が糖鎖間相互作用 (CCIs) することで、各種の細胞接着が誘導されている。しかしそのメカニズムや糖鎖選択性、イオン選択性などはあまり解明されていない。CCIs のメカニズム解析を目指した先行研究には、糖鎖高分子や糖修飾ナノ粒子などを用いたモデル系が存在するが、これらの先行研究において CCIs による接着・会合を評価するためには、表面プラズモン共鳴装置 (SPR) や透過型電子顕微鏡 (TEM) などの高価かつ専門知識を要する測定機器の使用が必須であった。一方で CCIs による会合を目視にて評価できれば、高価な装置を使用することなく CCIs が解析でき、この分野の研究の進展に大きく寄与できると考えられる。このような考えのもと、本研究ではバクテリアセルロースから構成された可視サイズの水ゲルであるナタデココ (NDC) を用いた CCIs の評価・検出方法の確立を目指して研究を行っている。¹⁾ 本研究ではこの手法を用い、ガン転移に深く関与している GM3-Gg3 間相互作用のメカニズム解明を目指して研究を行った。

市販の NDC を過ヨウ素酸化することで NDC にアルデヒド基を導入したのち、ジメチルスルホキシド中にてプロパルギルアミンを用いた還元アミノ化を行い、NDC に末端アルキンを導入した。その後、別途合成しておいたアジド化糖 (GM3N₃ および Gg3N₃) をクリック反応にて NDC に導入し、GM3 修飾 NDC (NDC-GM3) および Gg3 修飾 NDC (NDC-Gg3) を合成した (Fig. 1)。ここでの GM3 および Gg3 とはそれぞれの糖脂質の糖鎖部位を表す。

次に NDC-GM3 同士、NDC-Gg3 同士の会合 (homo-CCIs) を Ca²⁺ または Na⁺ を含む水溶液中にて評価した。NDC-GM3 と NDC-Gg3 のどちらに関しても Ca²⁺ の方が Na⁺ よりも強く会合を誘導した。また、NDC-GM3 と NDC-Gg3 での異種 NDC 間の会合 (hetero-CCIs) を Ca²⁺ または Na⁺ を含む水溶液中にて評価した。この場合もやはり、Ca²⁺ の方が Na⁺ よりも強く会合を誘導した。

以上により、糖修飾 NDC を利用することで、可視スケールでの CCIs の評価・検出が可能であることが分かった。また、GM3-GM3 相互作用と GM3-Gg3 相互作用のどちらも Ca²⁺ 要求性ではあったが、後者の方が Ca²⁺ によってより強く誘導されることも明らかとなった。これはガン細胞同士の GM3-GM3 相互作用よりも、がん細胞と血管内皮細胞の GM3-Gg3 相互作用の方が強いことを示しており、これにより容易にガン転移が引き起こされていることが明らかになった。

1) K. Yoshida, M. Kaino, M. Sekiguchi, N. Chigira, Y. Amano, M. Inokuchi, Q. Li, T. Hasegawa, *Carbohydr. Polym.*, **223**, 1-8 (2019).

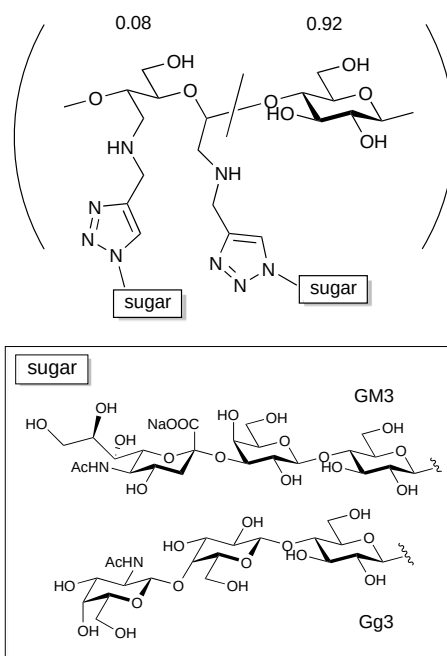


Fig 1. Structures of NDC-GM3 and NDC-Gg3.

キャピラリー電気泳動法を用いたリポソーム界面における物質透過現象のモーメント解析

○稲葉隼汰・宮部寛志（立教大院理）

Moment Analysis of Solute Permeation at the Interface of Liposomes by Capillary Electrophoresis (Graduate School of Science, Rikkyo University) INABA, Shunta; MIYABE, Kanji

【緒言】薬物の過剰投与や副作用を抑制し、より安全かつ効率的に薬物投与を行なうため、ドラッグデリバリーシステム（DDS）が利用されている。リポソームを薬物キャリアとして使用するDDSは、例えばがん治療の分野における新たな薬物治療システムとして注目を集めている。リポソームの徐放機構を解明してより優れた薬物キャリアを開発するためには、リポソーム界面における物質移動現象をより詳しく究明する必要がある。そこで本研究ではキャピラリー電気泳動（CE）法を用いるモーメント解析法により、リポソーム界面における物質透過現象を速度論的に解析した。

【実験】本研究ではリポソームを擬似固定相として利用するリポソーム動電クロマトグラフィー（LEKC）を用いた。LEKCでは泳動液中のリポソームと泳動液との間における溶質の移動現象が無数に繰り返されるため、リポソーム界面における物質透過現象に関する情報を積算して増幅・検出することができる。リポソームは1-パルミトイル-2-オレイル-*sn*-グリセロ-3-フォスファチジルコリン（POPC）とフォスファチジルセリン（PS）を混合して調製し、両者の組成がPOPC/PS（80/20, 60/40 mol%）になるように2種類のリポソームを調製した。泳動液中のリン脂質濃度を2～10 mMの範囲で変化させた。注入試料にはモデル物質としてコルチゾン、また電気浸透流マーカータにはジメチルスルホキシド（DMSO）を用いた。LEKCによる実測溶出ピークの形状的特徴を解析し、リポソームへのコルチゾンの分配平衡定数（ K_p ）および界面透過速度定数（ k_{in} : バルク相からリポソーム内部への透過、 k_{out} : リポソーム内部からバルク相への透過）を求めた。なお、リポソーム界面における溶質の透過速度式は次のように仮定した[1]。

$$\frac{\partial C_X}{\partial t} = \frac{3}{R_p} k_{in} C_S - \frac{3}{R_p} k_{out} C_X \quad (1)$$

ここで C_X 、 C_S はリポソーム内およびバルク相内の溶質濃度、 R_p はリポソームの半径である。

【結果・考察】Fig. 1にPOPC/PS（60/40 mol%）リポソームを擬似固定相とする際のエレクトロフェログラムを示す。DMSOとコルチゾンの溶出時間の差は脂質濃度の増加とともに増大しており、コルチゾンのリポソームへの分配およびリポソーム界面における透過現象が観測されていると考えられる。POPC/PS（80/20 mol%）リポソームを擬似固定相とする場合にも同様の結果が確認された。実測溶出ピークの溶出時間および分散を解析して K_p 、 k_{in} と k_{out} 値を求め、リポソーム界面における物質透過現象を速度論的に解析する上でモーメント解析法が有用であることを実証した。

【参考文献】

1) Miyabe, K.; Senoo, S.; Okayasu, N., *Electrophoresis*, **2019**, *40*, 2962-2970.

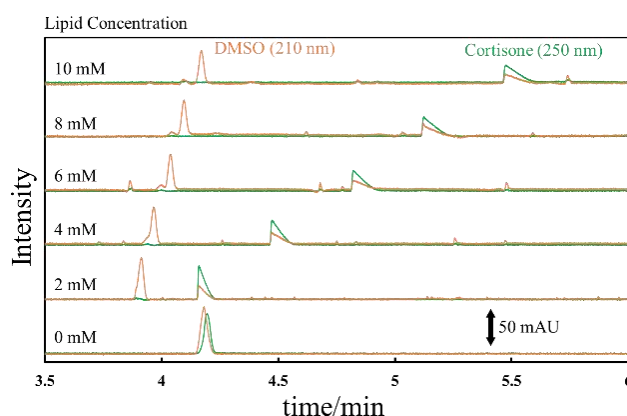


Fig.1 POPC/PS（60/40 mol%）リポソームを擬似固定相とする際のエレクトロフェログラム

メソポーラスシリカナノ粒子用いたがんペプチドワクチンに関する研究

○上野朋哉・後藤浩一・松本陽子（崇城大院工）

Study on Cancer Peptide Vaccine Using Mesoporous Silica Nanoparticles (Graduate School of Engineering, Sojo University) UENO, Tomoya; GOTO, Koichi; MATSUMOTO, Yoko

現代のがん治療において、免疫機能を人為的に高めて治療に用いるがん免疫療法が盛んに研究されている。しかしながら、がん免疫療法の一つであるペプチドワクチン療法においては、がんの抗原ペプチドをそのまま投与しても、生体内で拡散・分解してしまう為、安定かつ十分な免疫応答を期待することは難しい。一方、メソポーラスシリカナノ粒子(Mesoporous Silica Nanoparticle、MSN)は数十～数百 nm の多孔質シリカであり、ナノメディシン分野において DDS の新しい素材として注目されている。本研究では、MSN を用いた新しいがんワクチンの開発を目的とし、抗原ペプチドを MSN に封入したワクチンのがん細胞に対する免疫誘導効果を検討した。

まず、蛍光剤 FITC で標識した MSN を調製し、マウス樹状細胞 (DC2.4 細胞¹⁾) による MSN の蓄積及び取り込みについて *in vitro* で検討した。フローサイトメトリーにより測定した結果、MSN は、培養時間 24 h 後、濃度依存的に DC2.4 細胞に蓄積することが明らかになった。また、DC2.4 細胞による FITC 標識 MSN の取り込みについて、共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、MSN は DC2.4 細胞の細胞質に取り込まれることが示され(Fig.1)、抗原提示細胞に抗原物質を運ぶキャリアーとしての有用性が示唆された。

次に、ニワトリ卵白アルブミン(OVA)をがん抗原のモデルとする *in vivo* 実験を行った。ワクチンサンプルを皮下投与したマウスに OVA を発現するマウスリンパ腫細胞(E.G7-OVA 細胞)を腹腔内移植し、がん細胞に対する免疫誘導効果について検討した。Fig. 2 に示したように、Control 群、抗原ペプチドとオリゴヌクレオチドを投与した KHN 群、抗原ペプチドとオリゴヌクレオチドを MSN に封入して投与した KHN/MSN 群で比較した結果、Control 群の平均生存日数 32.7 日に対して、KHN/MSN 投与群の平均生存日数は 41.3 日となり、生存日数の増大が観測された。また、ワクチンサンプルの投与回数について検討したところ、1 回投与に比べて、3 回投与を行ったグループで高い延命効果が得られ、MSN ワクチンによる免疫誘導効果が示唆された。

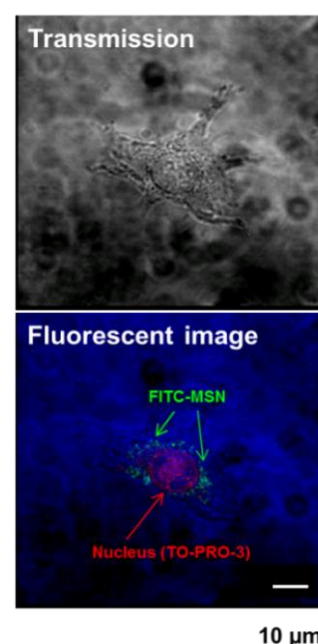


Fig 1. Fluorescent microscopic observation of DC2.4 cells after the incubation with FITC-MSN.

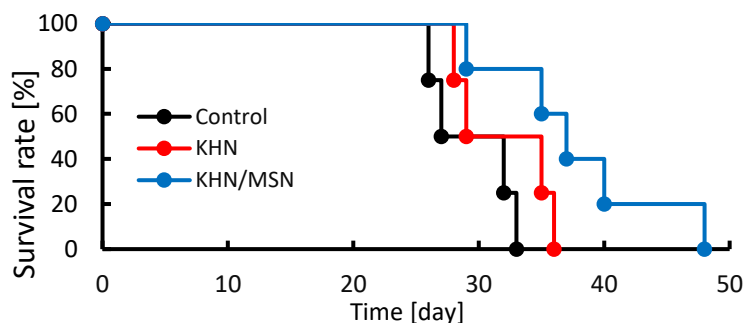


Fig 2. Survival curve of MSN-vaccinated mice after the transplantation of E.G7-OVA cells.

1) Z. Shen, G. Reznikoff, G. Dranoff, K. L. Rock, *J. Immunol.*, **158**, 2723 (1997).

核医学治療法を目指した At-211 標識機能化金ナノ粒子創製と評価

○黄 栩昊¹・樺山 一哉^{1,2,4}・角永 悠一郎^{2,4}・下山 敦史^{1,2,4}・大江 一弘^{3,4}・豊嶋 厚史^{2,4}・篠原 厚^{2,5}・深瀬 浩一^{1,2,4} (¹ 阪大院理、² 阪大 IRS、³ 阪大院医、⁴ 阪大院理 PRC、⁵ 大阪青山大)

Synthesis and evaluation of At-211 labeled functional gold nanoparticles for radionuclide therapy

(Graduate School of Science, Osaka University¹, Institute for Radiation Sciences, Osaka University², Graduate School of Medicine, Osaka University³, Project Research Center for Fundamental Sciences, Graduate School of Science, Osaka University⁴, Osaka Aoyama University⁵) HUANG, Xuhao¹; KABAYAMA, Kazuya^{1,2,4}; KADONAGA, Yuichiro^{2,4}; SHIMOYAMA, Atsushi^{1,2,4}; Ooe, Kazuhiro^{3,4}; TOYOSHIMA, Atsushi^{2,4}; SHINOHARA, Atsushi^{2,5}; FUKASE Koichi^{1,2,4}

【目的】核医学治療は、放射線放出核種を投与・体内のがん細胞に集積させ、がんを殺傷する治療法である。 α 線は、高いがん殺傷効果を持つ。一方、飛程がヒト細胞数個分と短いため、周囲の正常細胞や臓器への侵襲が少ない。本研究では、 α 線放出核種を用いた α 線核医学治療に取り組む。 α 線放出核種として、ハロゲン核種であるアスタチン-211 (^{211}At)を用いる。 ^{211}At は、半減期が7.2時間と短く、比較的早く体内から放射線が消失する。そのため、通院による治療が可能であり、がん患者の生活の質(QOL)の向上が期待できる。本研究では、 ^{211}At が金と速やかに反応して安定な共有結合を形成することに着目し、金ナノ粒子 (AuNP)を運搬体に用いる新手法を開発することを目的とする。

【方法】 ^{211}At 標識 AuNP (^{211}At -AuNPs)の細胞内在化能の向上を狙い、表面修飾分子の検討を行った。AuNPに対し、高分子ポリ(エチレングリコール)メチルエーテルチオール (mPEG-SH)、チオール化ポリエチレンイミン (PEI-SH)あるいはペプチド (環状 RGD)を加え、室温下、2時間振とうして表面修飾した後、限外ろ過して機能化 AuNPs を得た。続いて透過電子顕微鏡と動的光散乱法により、機能化 AuNPs のサイズと形を評価した。また、共焦点顕微鏡を用いてがん細胞内在化の評価も行った。続いて、合成した種々の機能化 AuNPs に対し、室温下、5分間振とうし、 ^{211}At 標識化を行い、 ^{211}At -AuNPs を得た。標識化に用いた ^{211}At は、ビスマス-209 (^{209}Bi)に α ビームを照射後、乾式蒸留して精製したものをを用いた。標識化後は、WST-8 を用いて生細胞数を測定することで、細胞殺傷能を評価した。

【結果】合成した種々の機能化 AuNP の ^{211}At 標識化は、水溶液中、混合・振とうのみで定量的に進行した。mPEG 修飾 AuNP は、細胞内在化がほとんど見られず、 ^{211}At 標識 mPEG 修飾 AuNP は細胞殺傷能がほとんど見られなかった。一方で、PEI あるいは環状 RGD 修飾 AuNP では、顕著な細胞内在化の促進が確認できたとともに、顕著な細胞殺傷能の亢進が見られた。以上の結果から、 ^{211}At -AuNPs の細胞内移行が細胞殺傷に重要であることが示唆された (Fig.1)。 ^{211}At -AuNPs に内在化能を付与した表面修飾を行うことで、細胞核に対して至近距離からより多くの α 線を照射できるため、殺傷効果が高まったと考えられる。

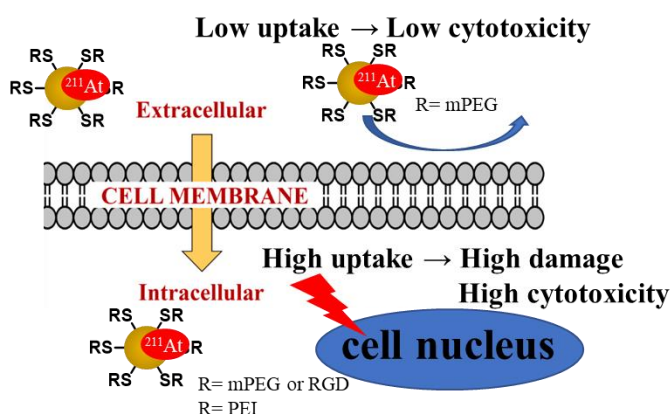


Fig.1 Schematic research concept