

ポスター発表(2日目)

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

奇数 (2P-001~2P-047)

[2P-001] GLUT4の動態制御機構の解明を目的としたPYPタグビオチン化プローブの開発

*寺下 功一郎¹、堀 雄一郎^{1,2}、菊地 和也^{1,2} (1. 大阪大学工学研究科応用化学専攻、2. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

[2P-003] スクアレン合成酵素に類似した新規カルバゾールプレニル基転移酵素の結晶構造と反応メカニズム

*末宗 周憲¹、永田 隆平^{2,3}、小林 正弥²、品田 哲郎⁴、西山 真^{5,6}、葛山 智久^{2,6}、佐藤 裕介¹、日野 智也¹、永野 真吾¹ (1. 鳥取大学大学院工学研究科化学・生物応用工学専攻、2. 大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻、3. 日本学術振興会特別研究員PD、4. 大阪市立大学大学院理学研究科物質分子系専攻、5. 東京大学生物生産工学研究センター、6. 東京大学微生物科学イノベーション連携研究機構)

[2P-005] 人工低分子リガンドHPPUと特異的に結合する 人工抗体Monobodyの複合体の結晶化に向けた精製条件の検討

*遠藤 鴻志郎¹、都築 成晃²、佐藤 裕介¹、村上 裕^{2,3}、永野 真吾¹、日野 智也¹ (1. 鳥取大学大学院 持続性社会創生科学研究科、2. 名古屋大学大学院 工学研究科、3. 名古屋大学 ナノライフシステム研究所)

[2P-007] 紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* のLH2タンパク質に結合するB800バクテリオクロフィルaの選択的酸化

*平尾 遥奈¹、木村 行宏²、大友 征宇³、佐賀 佳央¹ (1. 近畿大学大学院総合理工学研究科、2. 神戸大学大学院農学研究科、3. 茨城大学理学部)

[2P-009] 酸化酵素laccaseを用いた高効率チロシン残基特異的修飾

*中根 啓太¹、宮野 翔伍¹、友重 秀介¹、石川 稔¹、佐藤 伸一^{1,2} (1. 東北大学大学院生命科学研究科、2. 東北大学学際科学フロンティア研究所)

[2P-011] RNase S 修飾人工ウイルスキャプシドの構築と抗がん活性評価

*梁 応冰¹、太田 純平¹、古川 寛人¹、坂本 健太郎¹、稲葉 央¹、松浦 和則¹ (1. 鳥取大学大学院工学研究科)

[2P-013] 中性子回折を用いた精密構造解析による抗リウマチ薬とマクロファージ遊走阻止因子との相互作用解析

*江澤 理徳¹、石田 卓也²、山田 貢²、玉田 太郎³、尾高 雅文¹、涌井 秀樹¹、松村 洋寿¹ (1. 秋田大学大学院理工学研究科、2. 宇宙航空研究開発機構きぼう利用センター、3. 量子科学技術研究開発機構量子生命科学研究科)

[2P-015] 架橋酵素による高分子水溶液中での特異なタンパク質集合化挙動

*佐藤 峻¹、南畑 孝介¹、若林 里衣¹、後藤 雅宏¹、神谷 典穂^{1,2} (1. 九州大学大学院工学研究院、2. 九州大学未来化学創造センター)

[2P-017] 細胞種選択的な膜透過性を持つ、細胞膜透過PG-surfactantの開発

*山田 桃果¹、水野 稔久¹ (1. 名古屋工業大学大学院工学研究科)

[2P-019] 水/イオン液体二相系を用いたシトクロムP450BM3の基質誤認識による非天然基質の水酸化

*須貝 友紀¹、有安 真也¹、横山 侑弥¹、唐澤 昌之¹、愛場 雄一郎¹、荘司 長三¹ (1. 名古屋大学大学院理学研究科)

[2P-021] 結合速度論に着目したヒスタミン受容体の化学遺伝学的制御

*柏 俊太郎¹、堂浦 智裕¹、清中 茂樹¹ (1. 名古屋大学 工学研究科)

[2P-023] π - π 相互作用を利用したアデノシンA_{2A}受容体のケモジェネティック制御

*松岡 佑真¹、杓野 拓光¹、堂浦 智裕¹、清中 茂樹¹ (1. 名古屋大学)

[2P-025] 高効率ペプチドライゲーションのための新規セレノエステル合成法の開発

*橋本 雅也¹、林 剛介¹、村上 裕¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科)

[2P-027] パラジウム錯体を利用したコロナウイルス結合人工抗体の効率的全合成

*小澤 英知¹、林 剛介¹、村上 裕¹ (1. 名古屋大学工学研究科)

[2P-029] 標的シトシンの周辺塩基が可逆的RNA光架橋反応を用いたRNA編集に与える影響

*川添 秀¹、石野 佳奈子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 先端科学技術研究科)

[2P-031] コレラ菌由来色素分解ペルオキシダーゼによるヘムを分解しない脱鉄機構

*梅津 彩加¹、佐々木 美穂¹、石森 浩一郎^{1,2}、内田 毅^{1,2} (1. 北海道大学大学院総合化学院、2. 北海道大学大学院理学研究院)

[2P-033] 細胞膜透過におけるフォールディング構造が形成する二次元カチオンクラスターの重要性

*羽森 真美¹、北田 千江梨¹、呉原 美空¹、久木 望¹、芝田 信人¹、根木 滋¹ (1. 同志社女子大学薬学部)

[2P-035] チロシナーゼを用いた迅速かつ効率的な生細胞での近傍ラベリング

*松田 侑奈¹ (1. 京都大学工学研究科)

[2P-037] カルボニル基含有コラーゲンモデルペプチドの三重鎖構造の安定性

*竹村 直記¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)

[2P-039] チタン-細胞間接着強化を指向したコラーゲンモデルペプチドの合成

*田中 駿¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)

[2P-041] AFMを用いたファイバータンパク質AtaAの力学特性解析法の確立

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

[2P-043] 有機光増感色素とタンパク質から構成される光レドックス人工酵素の開発

*内田 裕貴¹、大洞 光司¹、林 高史¹ (1. 阪大院工)

[2P-045] DNAコンジュゲートの光二量化を利用した二本鎖DNAの特異的認識

*西村 健人¹、北村 裕介¹、勝田 陽介¹、井原 敏博¹ (1. 熊本大院先端)

[2P-047] がん選択的な核酸集合体構築による細胞死誘導

*大住 拓輝¹、森廣 邦彦¹、岡本 晃充^{1,2} (1. 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻、2. 東京大学先端科学技術研究センター)

GLUT4 の動態制御機構の解明を目的とした PYP タグビオチン化プローブの開発

○寺下功一郎¹・堀雄一郎^{1,2}・菊地和也^{1,2} (¹大阪大学大学院工学研究科、²大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

Development of biotinylated PYP-tag probes to elucidate mechanism of GLUT4 translocation (Graduate School of Engineering, Osaka University¹, Immunology Frontier Research Center, Osaka University²)
TERASHITA, Koichiro¹; HORI, Yuichiro^{1,2}; KIKUCHI Kazuya^{1,2}

グルコース輸送体の一種である GLUT4 は、筋肉組織や脂肪組織に発現し、血中グルコースを細胞内に取り込むことで血糖値を下げる重要な役割を果たしている。GLUT4 は、インスリン非存在下では細胞内の貯蔵小胞(GLUT4 storage vesicle, GSV)もしくはエンドソームに存在し、インスリン存在下では細胞膜上へ移行し、グルコースを取り込む。この細胞内局在の変化により、GLUT4 はグルコースの細胞内取り込みを制御していることが知られている。一方、インスリン抵抗性の 2 型糖尿病患者では、GLUT4 の細胞膜への移行が何らかの原因により阻害され、グルコースを細胞内に効率的に取り込むことができない。このため GLUT4 の細胞内動態制御機構を解明することは、糖尿病の発症機構の解明や治療法の開発においてきわめて重要な課題といえる。

近年、GLUT4 の Asn57 に付加される糖鎖が、GLUT4 の細胞内動態に対してどのような役割を果たしているかに注目が集まっていた。その役割を調べるために演者らのグループは、PYP タグラベル化技術に応用し、GLUT4 の生細胞イメージングを行った。PYP は紅色硫黄細菌由来の小タンパク質(14 kDa)であり、桂皮酸誘導体やクマリン誘導体と共有結合することが知られている。GLUT4 の細胞膜外ループに PYP タグを融合し、インスリンで細胞膜上へ移行させたのちにプローブを添加することで、細胞膜移行した GLUT4 を選択的に検出し、移行した軌跡を調べた。その結果、GLUT4 の糖鎖は、GLUT4 を細胞膜上に引き留める役割を果たしていることを明らかにした¹⁾。一方、糖鎖が GLUT4 を細胞膜上へ引き留める機構に関しては、未だ明らかになっていない。

この機構を解明するうえで、GLUT4 の糖鎖が何らかのタンパク質と細胞膜上で相互作用し、その動態を制御していると考えた。そこで本研究では、GLUT4 の糖鎖と相互作用するタンパク質を同定する技術の開発を目的とした。演者らは、PYP タグラベル化技術により細胞膜上の GLUT4 をビオチン化するプローブ PCAF-Biotin を開発した。本講演では、試験管及び生細胞における PYP タグ融合タンパク質の PCAF-Biotin によるラベル化反応及びイメージング実験の詳細を報告するとともに、このプローブを用いた GLUT4 の相互作用タンパク質の同定戦略について議論したい。

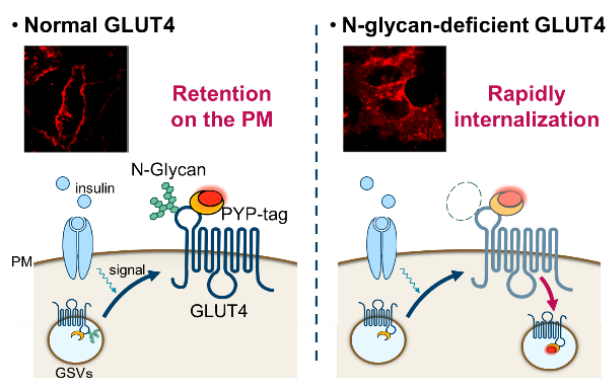


Fig 1. A role of GLUT4-N-Glycan¹⁾

1) S. Hirayama, Y. Hori, Z. Benedek, T. Suzuki and K. Kikuchi, *Nat. Chem. Biol.*, **2016**, *12*, 853.

スクアレン合成酵素に類似した新規カルバゾールプレニル基転移酵素の結晶構造と反応メカニズム

○末宗周憲¹・永田隆平^{2,3}・小林 正弥²・品田 哲郎⁴・西山 真^{5,6}・葛山 智久^{2,6}・佐藤裕介¹・日野 智也¹・永野 真吾¹ (¹鳥取大院工、²東大・農生科、³日本学術振興会特別研究員 PD、⁴大阪市大・理、⁵東大・生物工学セ、⁶東大 CRIIM)

Structural study of a novel carbazole prenyltransferase that resembles squalene synthase (Grad. Sch. of Eng., Tottori Univ.¹, GSALS, UTokyo², JSPS Research Fellow PD³, Faculty of Science, Osaka City Univ.⁴, BRC, UTokyo⁵, CRIIM, UTokyo⁶) SUEMUNE, Hironori¹; RYUHEI, Nagata^{2,3}; MASAYA Kobayashi²; TETSURO Shinada⁴; MAKOTO Nishiyama^{5,6}; TOMOHISA Kuzuyama^{2,6}; YUSUKE Sato¹; TOMOYA Hino¹; SHINGO Nagano¹

最近、葛山らは放線菌が生産する強力な神経保護物質であるカルキノスタチン A の生合成経路を解明し、この生合成においてスクアレン合成酵素 (SQS) にアミノ酸配列が類似した CqsB4 がカルバゾール骨格をプレニル化することを見出した。SQS による芳香族プレニル化反応の報告例はこれまでになく、CqsB4 の構造機能相関に興味をもたれる。また、アミノ酸配列に基づく分子進化系統樹解析からも本酵素は芳香族プレニル基転移酵素であるにも関わらず SQS と同じグループに位置することが明らかとなっている。このため、CqsB4 は酵素の分子進化の履歴をたどる上で重要なターゲットであり、その基質結合様式や反応メカニズムを明らかにすることで、新奇化合物創出への知見や、芳香族プレニル基転移酵素の多様性や進化に対する知見が得られると期待される。そこで我々は X 線結晶構造解析を主な手法とし、新規カルバゾールプレニル基転移酵素の反応メカニズムの解明を目指した。

CqsB4 には約 70% の相同性を示すホモログである LvqB4 が存在する。当研究室ではこれら二つの酵素 CqsB4 では基質非結合型、LvqB4 ではプレニルドナー、プレニルアクセプターおよび補因子の Mg^{2+} が結合した基質結合型の結晶構造をそれぞれ 2.0 Å、1.7 Å で決定した。これらの酵素の全体構造は一般的な芳香族プレニル基転移酵素に見られるバレル構造ではなく、SQS と類似したヘリックスバンドル構造であった。CqsB4 においては意外なことに、アフィニティ精製用に付加した His-tag を切除するためのプロテアーゼ認識領域が非対称単位に存在する隣接分子の活性部位に入り込んだ構造であった (Fig. 1)。LvqB4 (Fig. 2) の基質結合型の構造では、プレニルドナーのニリン酸部位は金属イオンに配位しており、SQS に類似した結合様式が見られた。またプレニルアクセプターの直上にプレニルドナーが位置していることから、芳香族プレニル基転移酵素に類似したメカニズムでプレニル化が行われると推定される。よって本酵素は芳香族プレニル基転移酵素および SQS のハイブリッド酵素であることが提案できる。本発表では詳細な結晶構造や変異体解析などについて報告する。

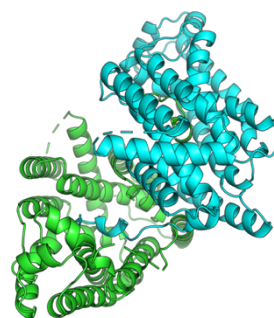


Fig 1. CqsB4 の全体構造

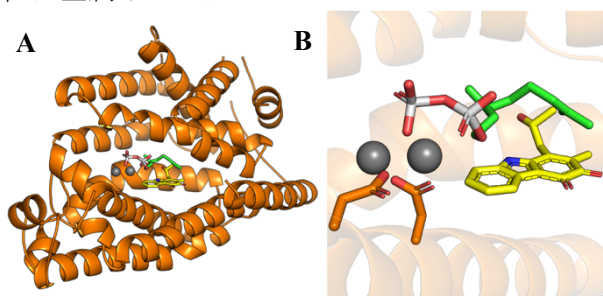


Fig 2. (A) LvqB4 の全体構造 (B) プレニルドナープレニルアクセプター結合様式

人工低分子リガンド HPPU と特異的に結合する

人工抗体 Monobody の複合体結晶化に向けた精製条件の検討

○遠藤鴻志郎¹・都築成晃²・佐藤裕介¹・村上裕^{2,3}・永野真吾¹・日野智也¹

(¹鳥取大院持続性社会, ²名古屋大院工, ³名大ナノライフ)

Purification of monomeric form of Monobody that specifically binds to the artificial small molecule ligand HPPU (Grad. Schl. Sus. Sci., Tottori University¹, Grad. Schl. Eng., Nagoya University², Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University³) ENDO Koshiro¹; TSUZUKI Naruaki²; SATO Yusuke¹; MURAKAMI Hiroshi^{2,3}; NAGANO Shingo¹; HINO Tomoya¹

低分子リガンドに特異的に結合するタンパク質はアフィニティ精製や生細胞内におけるタンパク質の選択的標識などの生化学的・分子生物学的な実験において非常に有用である。しかし、汎用的に用いられる低分子リガンドとそれに結合するタンパク質は双方が天然由来のものが多いため、生体内分子との意図しない結合により正確な結果が得られないことがある。このような生体内分子との干渉を回避するために、名古屋大学の村上裕教授らはフィブロネクチンⅢ型ドメインを鋳型とする約 90 アミノ酸からなる人工抗体骨格である Monobody を用い、人工低分子リガンドである 1-(4-ヒドロキシフェニル)-3-フェニルウレア (HPPU) に対して高い特異性、および様々な親和性を持つ複数種類の Monobody を創製することに成功した。これまでに、低分子量化合物を認識する Monobody についての報告はなく、一般的な抗体分子に比べて分子量の小さな Monobody (分子量: ~10 kDa) が特異的かつ強い親和性で低分子両化合物を認識する機構は不明である。そこで、我々は Monobody と HPPU の複合体を X 線結晶構造解析により高分解能で立体構造決定することで、Monobody による低分子量化合物認識の分子メカニズム解明を目指す。

得られた Monobody のうち、HPPU に対する親和性が最も高い Mb19f (Kd=7.93 nM) の結晶化に向けた精製試料の調製を試みた。大腸菌による大量発現ののちに、Ni 担体を用いたアフィニティ精製を行った結果、SDS-PAGE により Mb19f を高純度に精製できていることがわかった。次に精製試料をゲルろ過クロマトグラフィーにより分析したところ、Mb19f は 100 kDa を超える複数の会合状態で存在することがわかった (図 1. 青)。そこで、リガンド結合による会合状態の変化を調べるために、Mb19f : HPPU=1:4 のモル比で混合をした試料を同様に分析したところ、Mb19f のみに比べ多少オリゴマーが解消されていたが、依然として大部分がオリゴマー化しており多分散な状態であることが示唆された。一方で、界面活性剤であるドデシルマルトシドやデオキシコール酸 (DOC) を用いた Native PAGE では Mb19f がモノマーとして泳動されていたことから、これらの界面活性剤存在下でのゲルろ過分析を行った結果、DOC が Mb19f のモノマー化に大きく寄与していることがわかった。これらの実験結果から 1% DOC および Mb19f : HPPU =1:4 のモル比で試料を調製し、さらにゲルろ過バッファーに 0.5% DOC を加えることで、結晶化に適すると予測される Mb19f-HPPU 複合体のモノマーかつ単分散な試料を得ることに成功した。(図 1. 赤)

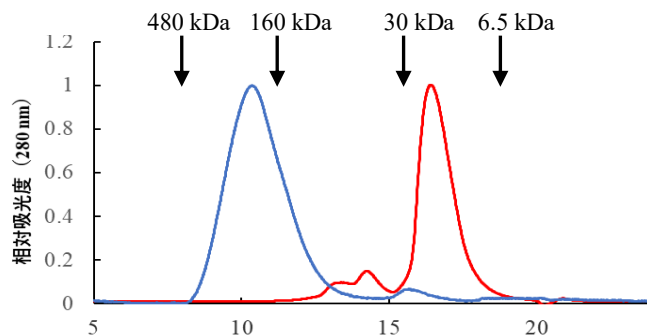


図 1. HPPU と DOC 添加による Mb19f の会合状態変化のゲルろ過分析 青: 添加前、赤: 添加後

紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* の LH2 タンパク質に結合する B800 バクテリオクロロフィル *a* の選択的酸化

○平尾遥奈¹・木村行宏²・大友征宇³・佐賀佳央¹

(¹近畿大院総合理工、²神戸大院農、茨城大理³)

Selective Oxidation of B800 Bacteriochlorophyll *a* in LH2 Protein from the Purple Photosynthetic Bacterium *Thermochromatium tepidum* (Graduate School of Science and Engineering, Kindai University¹, Graduate School of Agriculture, Kobe University², Faculty of Science, Ibaraki University³) HIRAO, Haruna¹; KIMURA, Yukihiko²; WANG-OTOMO, Zheng-Yu³; SAGA, Yoshitaka¹

紅色光合成細菌には、光捕集の役割を持つタンパク質として LH2 が存在する。LH2 タンパク質は BChl *a* (Fig.1) とカロテノイドが 2 種類のポリペプチドに保持され、環状に規則正しく配列した構造をとる。主要色素である BChl *a* は 2 種類の状態で存在しており、800 nm と 850 nm に Q_y 吸収帯を持つことから B800 BChl *a* と B850 BChl *a* と呼ばれている。紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* の LH2 タンパク質は B800 BChl *a* の Q_y 吸収帯には 2 種類のスペクトル成分が存在するが、そのメカニズムは未解明である。そこで本研究では、*Thermochromatium tepidum* の LH2 タンパク質に結合する B800 BChl *a* の結合状態に関する情報を得ることを目的とした。

定常光照射下で培養した *Tch.tepidum* を破碎し、クロマトフォアを得た。そのクロマトフォアから *N,N*-ジメチルドデシルアミン-*N*-オキシド (LDAO) を用いて LH2 タンパク質の可溶化を行った。その後、ショ糖密度勾配遠心分離と陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製を行い、LH2 タンパク質を得た。精製した LH2 タンパク質に 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) 溶液を加え、35 °C でインキュベーションを行った後に、陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製を行い酸化 LH2 を得た¹⁻³。

天然 LH2 は、B800 BChl *a* と B850 BChl *a* の Q_y 吸収帯を 800 nm 付近と 850 nm 付近に示した。B800 BChl *a* を酸化した LH2 の電子吸収スペクトルを測定すると、800 nm 付近の Q_y 吸収帯が消滅し 700 nm に新たに酸化色素の Q_y 吸収帯が得られた (Fig.2)。それに対して、B850 BChl *a* の Q_y 吸収帯は若干の短波長シフトにとどまった。このシフトは、DDQ を溶解させている溶媒の影響であると考えられる。また、酸化 LH2 に含まれている色素 (Fig.1) の HPLC 分析を行った。

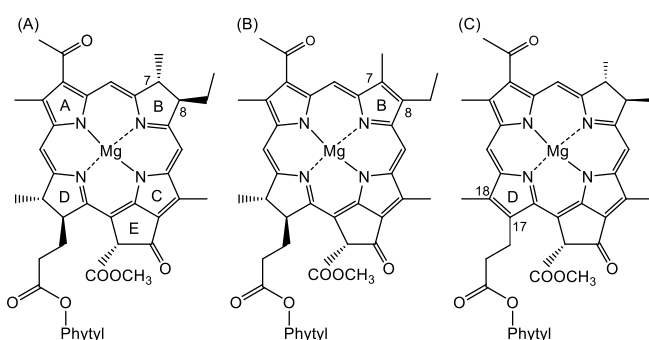


Fig.1: Molecular structures of BChl *a* (A), 3-acetyl-Chl *a* (B), and isomer of 3-acetyl-Chl *a* (C).

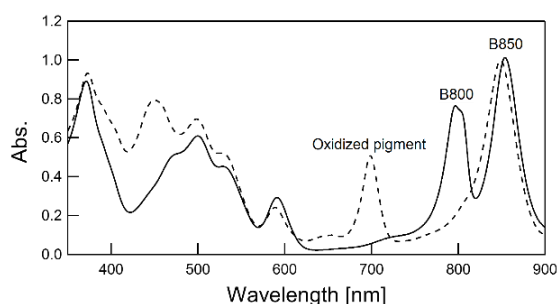


Fig.2: Electronic absorption spectra of native LH2 (solid curve) and oxidized LH2 (broken curve).

- 1) Y. Saga, S. Kawano, Y. Otsuka, M. Imanishi, Y. Kimura, S. Matsui, H. Asakawa, *Sci. Rep.* **9**, 3636 (2019).
- 2) Y. Saga, Y. Otsuka, D. Funakoshi, Y. Masaoka, Y. Kihara, T. Hidaka, H. Hatano, H. Asakawa, Y. Nagasawa, H. Tamiaki, *Sci. Rep.* **10**, 19383 (2020).
- 3) Y. Saga, Y. Otsuka, A. Tanaka, Y. Masaoka, T. Hidaka, Y. Nagasawa, *J. Phys. Chem. B* **125**, 6830 (2021).

酸化酵素 laccase を用いた高効率チロシン残基特異的修飾

○中根啓太¹・宮野翔伍¹・友重秀介¹・石川稔¹・佐藤伸一^{1,2}(¹ 東北大院生命、² 東北大学際研)

Highly efficient tyrosine-specific labeling using laccase (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University¹, Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University²) NAKANE, Keita¹; MIYANO, Shogo¹; TOMOSHIGE, Shusuke¹; ISHIKAWA, Minoru¹; SATO, Shinichi^{1,2}

天然のアミノ酸残基を標的とした化学修飾法は、ペプチド・タンパク質と修飾剤分子を共有結合により連結する技術である。ペプチド・タンパク質に対して機能性分子を連結することで新たな機能の付与が可能であり、アミノ酸残基の化学修飾技術は広く生命科学研究に使用されている。一方で、チロシン残基は、リン酸化によるシグナル伝達に関与することや、タンパク質間相互作用、RNA-タンパク質間相互作用界面に多く存在することが知られており、生命現象解明の観点から、チロシン残基選択的かつ効率的な化学修飾反応の開発が望まれている。そのような背景の中、我々はこれまでに、酵素や光触媒による一電子移動 (single electron-transfer, SET) を駆動力としたチロシン残基修飾反応を開発してきた^{1,2}。しかし、これまでの手法では過酸化水素による活性化を必要とする触媒や活性酸素種を生じる光触媒を用いるため、他のアミノ酸残基を酸化する恐れがあり、反応効率においても課題を有していた。

我々はまた、温和な反応条件による手法として、酸素分子を駆動力として、一電子酸化を触媒する酵素 laccase に注目し、チロシン残基修飾反応を開発した³。この手法は空気中の酸素分子を利用でき、弱酸性条件下で反応容器のふたを開けて振盪することにより、効率的かつ特異的にチロシン残基を修飾することが可能である。そこで、本研究では laccase 共存下、新たに修飾剤のスクリーニングを行い、1-methyl-4-aryl urazole (MAUra)⁴ が定量的にチロシン残基を修飾することを見出した (図 1)。また、本研究において laccase は修飾剤である MAUra を選択的に一電子酸化することで、チロシン残基を高効率かつ特異的に修飾することを明らかにした。本法は現在報告されているチロシン残基修飾反応の中で、最も高効率にチロシン残基を修飾することを明らかにした ($k=7.88 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)。さらに、本法を用いて機能性ペプチドおよびタンパク質の高効率かつチロシン残基特異的な機能化に成功した。本法を用いて修飾した炭酸脱水素酵素およびグルコースオキシダーゼの酵素活性を評価し、修飾反応後も機能が保持されることを明らかにした。

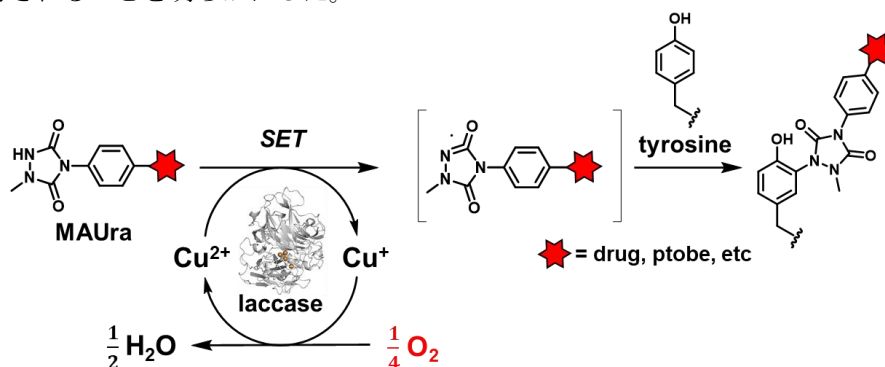


図 1. laccase による高効率チロシン残基修飾反応

【参考文献】 [1] Sato, S., Nakamura, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 8681. [2] Sato, S., Nakamura, K., Nakamura, H. *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 2633. [3] Sato, S., Nakane, K., Nakamura, H. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, 18, 3664. [4] Sato, S., Hatano, K., Tsushima, M., Nakamura, H. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 5871.

RNase S 修飾人工ウイルスキャプシドの構築と抗がん活性評価

鳥大院工〇梁応冰・太田純平・古川寛人・坂本健太郎・稲葉央・松浦和則

Construction of RNase S modified artificial virus capsid by reconstruction and evaluation of the anticancer activity (Graduate School of Engineering, Tottori University) LIANG, Yingbing; OTA, Junpei; FURUKAWA, Hiroto; SAKAMOTO, Kentaro; INABA, Hiroshi, MATSUURA, Kazunori

天然の球状ウイルスであるトマトブッシュスタンツウイルス(TBSV)は、タンパク質サブユニットが180個集合して33 nmのキャプシドを形成する。我々はこれまで、TBSVの24残基 β -Annulus peptide (INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS)の自己集合により、30-50 nm程度の人工ウイルスキャプシドの構築、ならびに、その表面への金ナノ粒子やタンパク質などの修飾を報告している¹⁻³⁾。本研究では、人工ウイルスキャプシドの外部表面に配向する β -Annulus peptideのC末端側にS-peptide配列を有するペプチドを合成した。それとS-proteinを再構成させることで酵素活性を有するRNase S修飾人工ウイルスキャプシドを構築し(Fig.1)、抗がん活性を評価した。

Native Chemical Ligationにより β -Annulus-SBnとCys-S-peptideを連結することで β -annulus-S-peptideを合成した。それにS-proteinを添加したところ、リン酸buffer (pH7.4)中で粒径約70 nmの球状集合体を形成することがDLS及びTEMにより確認され、RNase S修飾キャプシドの構築が示唆された(Fig.2A)。また、WST-assayによりHela細胞に対する細胞毒性を評価した結果、RNase S修飾キャプシド添加後のがん細胞は68%の細胞生存率であり、抗がん剤であるTaxol添加の場合(61%)と同程度の抗がん活性を有することが示唆された(Fig.2B)。

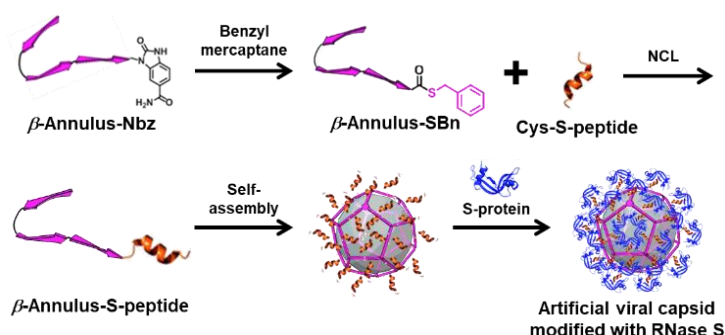


Fig. 1 Synthesis of β -annulus peptide with S-peptide sequence by native chemical ligation (NCL) and self-assembly of artificial viral capsid modified with ribonuclease S.

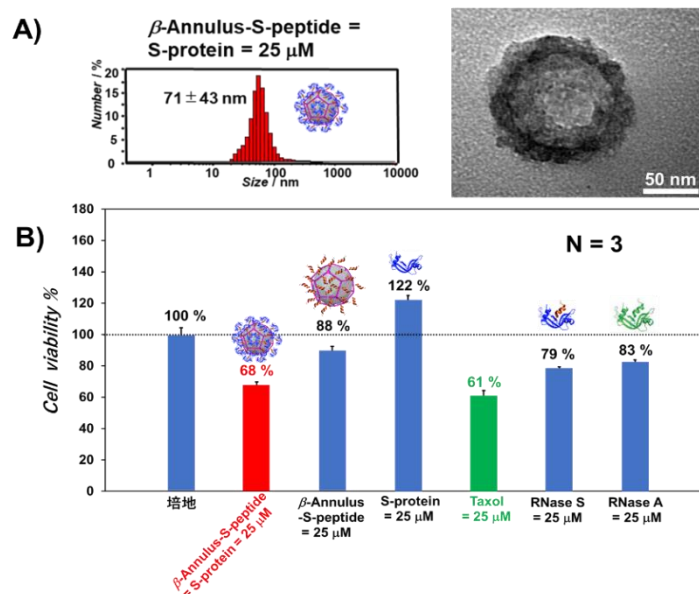


Fig. 2 A) DLS and TEM image of artificial viral capsid modified with RNase S at [β -annulus-S-peptide] = [S-protein] = 25 μ M in phosphate buffer (pH 7.4). **B)** Cytotoxicity assessment by WST assay.

- 1) K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **54**, 8944 (2018)
- 2) K. Matsuura, J. Ota, S. Fujita, Y. Shiomi, H. Inaba. *J. Org. Chem.*, **85**, 1668 (2020)
- 3) K. Matsuura, Y. Shiomi, T. Mizuta, H. Inaba. *Processes*, **8**, 1455 (2020)

中性子回折を用いた精密構造解析による抗リウマチ薬とマクロファージ遊走阻止因子との相互作用解析

○江澤理徳¹・石田卓也²・山田貢²・玉田太郎³・尾高雅文¹・涌井秀樹¹・

松村洋寿¹ (¹秋大院理工、²JAXA 宇宙航空研きぼう利用セ、³QST・量子生命研)

Interaction analysis of an anti-rheumatic drug with macrophage migration inhibitory factor by precise crystal structure determination using neutron diffraction (¹Graduate School of Engineering Science, Akita University, ²JEM Utilization Center, JAXA, ³Institute for Quantum Life Science, QST) EZAWA, Toshinori¹; ISHIDA, Takuya²; YAMADA, Mitsugu²; TAMADA, Taro³; ODAKA, Masafumi¹; WAKUI, Hideki¹; MATSUMURA, Hiroto¹

【目的】メトトレキサート(MTX)は、悪性腫瘍の治療を目的としたジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)の拮抗阻害剤として開発されたが、1980年代に自己免疫疾患治療の臨床的効果が確認され、現在、関節リウマチ(RA)治療の第一選択薬として広く利用されている。しかし、MTXのRAに対する臨床効果は、DHFRに対する阻害効果では説明することが難しく、MTX使用による重篤な肺疾患の副作用の発生機序についても未解明である。そこで、我々はMTXの免疫系における作用機序解明を目的として、MTXの新規標的タンパク質の探索を行い、マクロファージ遊走阻止因子(MIF)を同定した。これまでに、MTXとMIFの相互作用解析、MTX-MIF複合体のX線結晶構造解析に成功している。MIFは多機能性を示すサイトカインであり、RAをはじめとする多くの自己免疫疾患や癌等に関与していることから、創薬標的として注目されている。創薬において、より強い薬剤-標的タンパク質間の相互作用を設計するためには、標的分子の水素原子およびプロトンを含む詳細な構造情報は重要である。そこで本研究では、水素原子およびプロトンの位置情報が得られる中性子構造解析法を用いて、MIFの精密構造を決定した。さらに、代表的なMIF阻害剤ISO-1-MIF複合体またはMTX-MIF複合体のX線結晶構造とMIFの精密構造を比較することで、薬剤-MIF間の詳細な相互作用について議論する。

【実験方法】60 mg/mL MIF溶液とリザーバー溶液(0.49 M NaD₂PO₄、0.91 M K₂DPO₄)を用いて、sitting drop法により大型結晶を作成した。iBIX BL-03 (J-PARC)で、得られた結晶に対して室温で7.5日間中性子を照射し、中性子回折データを得た。また、Photon Factory BL-5A (KEK)で、同結晶に対して室温でX線を照射し、X線回折データを得た。これらの回折データを複合精密化し、MIFの構造を決定した。

【結果及び考察】得られたMIFの大型結晶を用いて、中性子およびX線回折実験を行ったところ、それぞれ分解能~1.8 Åおよび~1.6 Åの回折データが得られ精密化に成功した。MIF精密構造において、水分子(DOD)を介したPro1のアミンからMet101主鎖アミドまでの水素結合ネットワーク(network1)およびPro34のアミドを介したTyr95側鎖からTyr36主鎖アミドまでの水素結合ネットワーク(network2)が観測された。次に、阻害剤-MIF複合体のX線結晶構造とMIF精密構造を比較した。MTX-MIF複合体と重ね合わせると、MTXはDODとTyr95の間に位置していた(Fig. 1)。また、ISO-1-MIF複合体と重ね合わせると、ISO-1はDODと同じ位置に存在した。以上の結果は、阻害剤はnetwork1とnetwork2を仲介するように結合し、阻害剤結合によるMIF内の水素結合ネットワーク伸長が、阻害剤のMIFへの結合親和性に寄与することを示唆している。

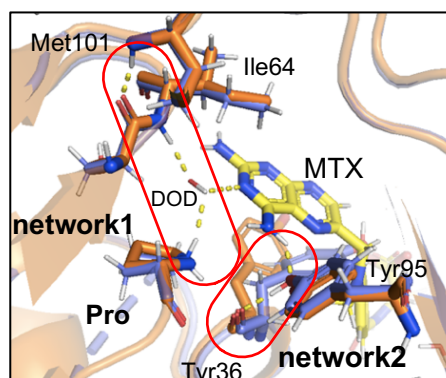


Fig. 1. Overlapped structure of MIF by neutron diffraction (orange) and MTX-MIF complex by X-ray diffraction (blue). The dotted line represents the predicted hydrogen bonding networks.

架橋酵素による高分子水溶液中での特異なタンパク質集合化挙動

○佐藤 峻¹・南畑 孝介¹・若林 里衣¹・後藤 雅宏¹・神谷 典穂^{1,2}(¹九州大学大学院工学研究院、²九州大学未来化学創造センター)

Unique protein assembly behavior by enzyme-catalyzed crosslinking reaction in molecular crowding solution

(¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University,²Division of Biotechnology, Center for Future Chemistry, Kyushu University)Sato, Ryo¹; Minamihata, Kosuke¹; Wakabayashi, Rie¹; Goto, Masahiro¹; Kamiya, Noriho^{1,2}

【緒言】

生体内外におけるタンパク質の集合化挙動の制御は、高度な機能発現の実現に向けた戦略の1つと考えられる。タンパク質集合化の手段として、共有結合形成反応を触媒する架橋酵素の基質特異性を利用することで、タンパク質機能の維持や安定性の担保が期待される。

本研究では、共有結合型タンパク質集合体を調製するための酵素として微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) を選択した。MTG は特定のグルタミン (Q) 残基及びリジン (K) 残基側鎖間のアシル基転移反応を触媒する。これまでの研究において、MTG の架橋反応点 (K, Q) が共存するペプチドタグである PolyTag (HKRWRHYQRGG) を設計し、目的タンパク質のNもしくはC末端に導入することで、MTG 触媒反応を介した多様なタンパク質集合体の調製に成功した [1]。しかしながら、何れのタンパク質集合体の調製においても、未反応の単量体の残存が確認された。そこで、タンパク質基質の見かけの濃度を向上させることで、PolyTag を介した集合化が促進されるのではないかと考え、分子クラウディングに注目した。分子クラウディング環境では、溶液中にクラウディング分子が高濃度に存在するため、解析対象となる分子の占有体積が減少し、見かけの濃度が向上すると考えられる [2]。これまでに、架橋酵素反応系に対してクラウディング環境が与える効果は報告されていない。そこで、デキストラン (Dex) を用いて分子クラウディング環境を構築し、MTG 架橋反応による PolyTag 融合タンパク質の集合化挙動の評価を実施した (Fig. 1)。

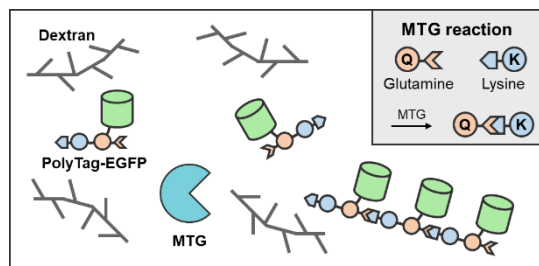


Fig. 1 Schematic illustration of this research.

【実験及び結果と考察】

遺伝子工学的手法により緑色蛍光タンパク質 (EGFP) のN末端に PolyTag を融合した PolyTag-EGFP を調製した。PolyTag-EGFP (10 μM) と MTG (0.5 U/mL) を、15 wt% の Dex 500k を含む PBS 溶液に添加し、1~60 分後に各水溶液中に生じた生成物に対して、SDS-PAGE による解析を行った。Dex 添加時において、Hexamer 以上の高分子量体の割合が増加したことから、クラウディング環境により架橋反応が促進され、集合体形成挙動が変化することが示唆された。

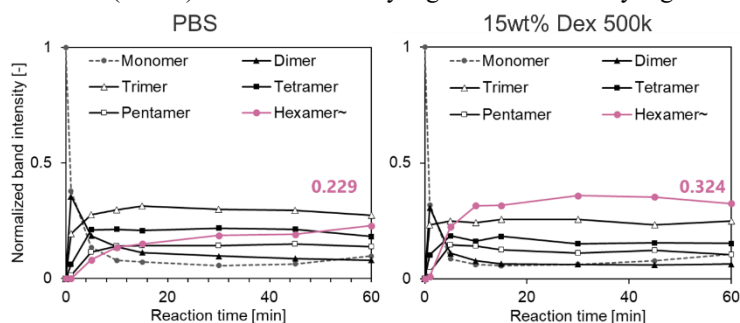


Fig. 2 Time course of product formation analyzed by SDS-PAGE band intensity measurements of the EGFP assembly catalyzed by MTG in PBS solution with or without Dex 500000.

【参考文献】

[1] R. Sato et al., *Anal. Biochem.*, **600**, 11370 (2020), [2] Y. Hata et al., *J. Mater. Chem. B.*, **6**, 6344 (2018)

細胞種選択的な膜透過性を持つ、細胞膜透過 PG-surfactant の開発

○山田桃果¹・住藤夏美¹・井上靖道²・梅澤直樹²・水野稔久^{*1}(¹ 名工大院工、² 名市大院薬)

Development of Membrane-Permeable PG-Surfactants with Cell Line-Selective Membrane Permeability
(Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology¹, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University²) YAMADA, Momoka¹; SUMITO, Natsumi¹; INOUE, Yasumichi²; UMEZAWA, Naoki²; MIZUNO, Toshihisa^{*1}

【緒言】近年、抗体などの蛋白質からなるバイオ医薬品の開発や利用が進められている。さらなるバイオ医薬品開発の進展において、細胞外の受容体などに作用させる従来のものとは異なり、細胞内分子に直接作用させる技術開発に注目が集まっており、これを可能とする細胞膜透過キャリアの開発が広く検討されている。また副作用を抑える観点からは、細胞内に導入される段階での細胞種選択性も重要である。一方近年我々の研究室では、リポペプチドであるペプチドジェミニ型界面活性剤 (PG-surfactant) [1]からの機能分子開発に取り組んでおり、外来蛋白質に対して細胞膜透過キャリアとして機能する「細胞膜透過 PG-surfactant (cpPGs)」の開発に成功し報告している[2]。本研究では、この cpPGs に対する細胞種選択的な膜透過性付与を目指し、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) への高い親和性が知られる GE11 ペプチドとの複合化を検討している。

【実験結果】cpPGs は、内部に含むカチオン性、アニオン性残基の導入割合により、膜透過性を調節可能である (Fig. 1) [2]。これまでに DKDKC₁₂-D₃ に対して GE11 ペプチドを導入することで、EGFR 高発現株である A431 細胞、低発現株である NIH3T3 細胞への吸着過程において、A431 細胞への優先性が確認され報告している。しかし元々膜透過性の低い DKDKC₁₂-D₃ を cpPG として用いていたことから、その後の細胞内取り込みまでは観測されなかった。そこで本研究では、適度な膜透過性を持つ DKDKC₁₂-K₁ を cpPG として選択し、これに GE11 ペプチドを付与した GE11-DKDKC₁₂-K₁ についての、細胞取り込み過程の評価を行なった。

まず添加数分以内での GE11-DKDKC₁₂-K₁ の異種細胞間での吸着割合の比較を CLSM 測定により評価した。その結果 GE11-DKDKC₁₂-D₃ の場合と同様に A431 細胞に対する吸着優先性がみられた。さらに添加後 1、3、24 時間培養後の細胞内への取り込み過程までを CLSM、FACS 測定により評価を行なったところ、GE11-DKDKC₁₂-D₃ の場合と異なり十分な細胞内への取り込みが見られ、更に NIH3T3 細胞に対する A431 細胞への取り込み選択性が 5~6 倍程度見られることがわかった (Fig.2)。阻害剤を用いた輸送経路評価は当日発表予定であるが、これらの結果は、細胞膜抗原への親和性ペプチドとの単純な複合化により、cp-PG から様々な細胞に対する細胞種選択的なキャリア分子が開発可能となることを示唆している。

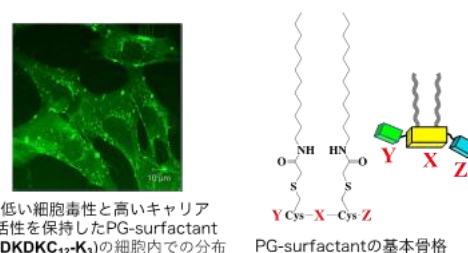


Fig. 1 Molecular structure of PG-surfactants (upper right) and comparison of the cell penetration properties of the series of cell penetration PGs surfactants (cp-PGs) (low table).

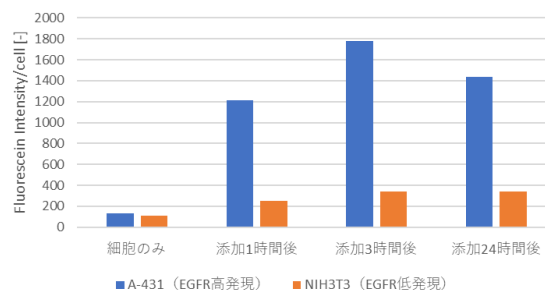


Fig.2 Comparison of the uptake amounts of FITC-labeled GE11-DKDKC₁₂-K₁ for A431 and NIH3T3 cells from FACS analysis.

[1] K. Umezaki & T. Mizuno, *Chem. Lett.* **41**, 1430-1432 (2012). [2] N. Sumito & T. Mizuno, *Bioconjugate Chem.* **31**, 821-833 (2020).

水/イオン液体二相系を用いたシトクロム P450BM3 の基質誤認識による非天然基質の水酸化

○須貝友紀・有安真也・横山侑弥・唐澤昌之・愛場雄一郎・荘司長三（名大院理）

Hydroxylation of Non-native Substrates Catalyzed by Cytochrome P450BM3 with Aqueous/Ionic Liquid Biphasic System (Graduate School of Science, Nagoya University) SUGAI, Yuki; ARIYASU, Shinya; YOKOYAMA, Yuya; KARASAWA, Masayuki; AIBA, Yuichiro; SHOJI, Osami

シトクロム P450BM3 (P450BM3) は、長鎖脂肪酸の垂末端部位の水酸化を触媒するヘムタンパク質であり、その高い触媒能からバイオ触媒への応用に向けた研究が盛んに行われている^[1]。当研究室で開発された基質誤認識システムは、P450BM3 に脂肪酸の構造を模した擬似基質 (デコイ分子) を取りこませることで、ベンゼンなどの非天然基質の水酸化を可能にした^[2]。さらに、このシステムを用いて、P450BM3 を発現させた大腸菌体内でのベンゼン水酸化にも成功している^[3]。一方、この反応は水を溶媒とし、菌体が生存できる環境が必要であるため、水への溶解性や菌体への毒性によって利用できる基質が限られている。化学合成で用いられる分子は水溶性が低いことや毒性が強いことも多いため、工業的な利用を考えると、需要のある反応に対して十分な効果を発揮させるのは困難な場合が多い。

本研究では、基質の溶解性の向上や毒性の低減による反応効率の向上や基質適応範囲の拡大を目指し、イオン液体に基質、水溶液に菌体を存在させた水/イオン液体二相系の検討を行った。イオン液体は、常温付近に融点を持つ塩であり、分子設計によって基質、生成物の溶解性を調節可能である。二相系では、相間での基質、生成物の分配によって濃度の調整ができるため、水溶性の低い基質をイオン液体が溶解し、水相へ飽和濃度付近まで供給し続けることや、基質や生成物をイオン液体相へ抽出し菌体への毒性を和らげることが可能となる (Fig. 1)。

イオン液体として [P_{6,6,6,14}][NTf₂] を用いることで、ベンゼンの水酸化の収量が約 2 倍に向上した (Fig. 2)。反応系に加えることが出来るベンゼンの総量が大幅に増加し、反応や揮発による基質の減少分がイオン液体からの供給によって補われるため、水相の基質濃度が一定に保たれたことで、酵素の活性が長時間維持されたと考えている。また、より毒性の高いクロロベンゼンにおいても、水槽の基質濃度を一定の低濃度に保ちながら長時間反応が進行し、収量の向上が見られた。現在、ガス状で水溶性の低いプロパンを基質として用いた検討を行い、本手法の基質適応範囲の拡大を行っている。

- 1) F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 14420–14426.
- 2) O. Shoji, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 10324–10329.
- 3) M. Karasawa, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 12264–12269.

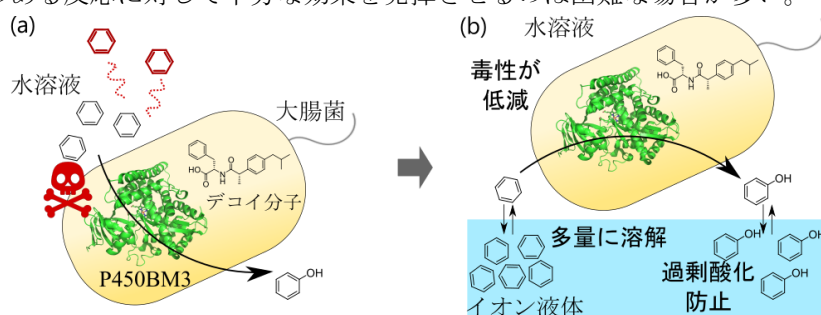


Fig 1. (a)水溶液一相と(b)水/イオン液体二相でのベンゼン水酸化反応

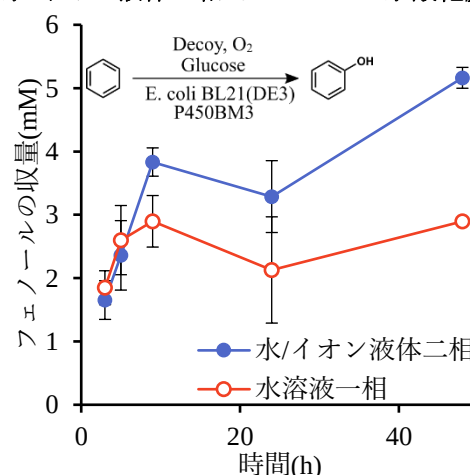


Fig 2. イオン液体の有無によるフェノール収量の変化

結合速度論に着目したヒスタミン受容体の化学遺伝学的制御

○ 柏 俊太郎・堂浦 智裕・清中 茂樹（名大院工）

Chemogenetic Regulation of Histamine Receptor Focusing on the Ligand Binding Kinetics (Graduate School of Engineering, Nagoya University,) KASHIWA, Shuntaro; DOURA, Tomohiro; KIYONAKA, Shigeki

細胞膜受容体とリガンドの結合を理解する際に、解離定数 (K_d) が用いられる。平衡状態かつリガンド大過剰の条件下において、受容体分子の半分がリガンドと結合する濃度に等しく、簡便に用いられる。培養細胞を用いた評価では受容体とリガンドの平衡状態を作り出すことができるが、実際の生体内では血液中及び体液中のリガンド濃度は常に変動しており平衡状態が成り立たない。つまり、生体内での受容体とリガンドの結合について理解するには K_d だけでは不十分で、結合速度定数 (k_{on})、解離速度定数 (k_{off}) をはじめとする結合速度論の観点からの理解が必要不可欠である。そこで、当研究室では細胞外シグナルを細胞内に伝達し、様々な生理的過程に関与する膜タンパク質である G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に対して速度論に着目した活性制御を目指している。本発表では GPCR の最大ファミリーである class A GPCR に属するヒスタミン H1 受容体 (H1R) の化学遺伝学的なリガンドの結合速度の制御について報告する。Class A GPCR の内在リガンド結合部位は 7 回膜貫通 (7TM) ドメインに存在するため、細胞外ループ (ECL) は内在性リガンドと直接的には相互作用していないことが多い。一方で、リガンドの入口近傍に位置する ECL の立体障害の違いは結合の速度論に影響すると考えられる。そこで我々は ECL に着目して様々なアミノ酸を変異導入することで、内在性リガンドとの結合親和性を保った変異体の作製と、H1R 選択的な阻害剤及びその誘導体を用いたスクリーニングを行った。その結果、野生型 H1R と変異型 H1R の間でリガンドの結合速度に差が生じることが示唆された。本手法は生体内での受容体とリガンドの結合について理解するうえで強力なツールとなることが期待される。

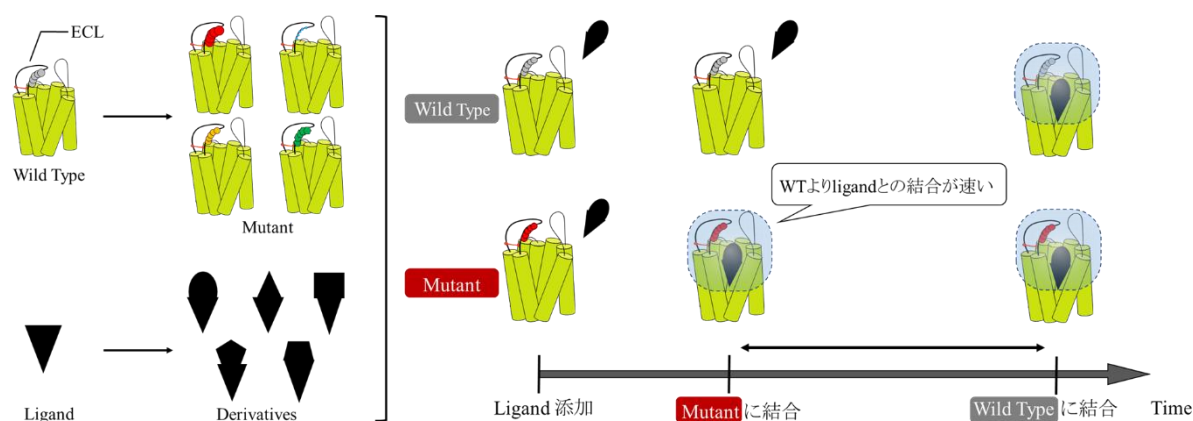


Fig. Overview of chemogenetic approach for regulating GPCR-ligand binding kinetics

π - π 相互作用を利用したアデノシン A_{2A} 受容体のケモジェネティック制御

○松岡佑真・杓野拓光・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

Chemogenetic regulation of adenosine A_{2A} receptor using π - π interactions between receptor and ligands.
(Graduate School of Engineering, Nagoya University) MATSUOKA, Yuma; SYAKUNO, Takumitsu; DOURA, Tomohiro; KIYONAKA, Shigeki

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は、細胞膜を介したシグナル伝達により広範な生理的プロセスに関与し、創薬標的として注目される。同種の GPCR であっても発現する細胞種によって異なる生理学的機能に関与することが知られるが、細胞種選択的な GPCR の活性制御は困難であり、個々の GPCR の詳細な機能は未解明な部分が多い。

上記の背景から我々は細胞種選択的に GPCR の活性を制御するケモジェネティックな手法として「細胞外ループ工学」を提唱している。これは、GPCR に保存される 7 回膜貫通(7TM)ドメインと細胞外ループ(ECL)という特徴的な構造に着目し、ECL にアミノ酸変異を加えることで内在リガンドとの親和性を維持しつつ、デザインした人工リガンドにより変異受容体の活性を選択的に制御する手法であり、当研究室では class C GPCR に属する代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)において変異受容体選択的な活性制御に成功している。

本発表では class A GPCR に属するアデノシン A_{2A} 受容体(A_{2A}R)に着目し、細胞外ループ工学による A_{2A}R の活性制御について報告する。A_{2A}R と内在リガンドであるアデノシンのリガンド結合部位は 7TM 内部の深くに位置するため、リガンド結合部位上部にあたる ECL への変異導入によりアデノシンとの親和性を維持すると共に、A_{2A}R 阻害剤の誘導体を用いて変異型 A_{2A}R 選択的な活性制御を指向した。上記戦略に基づき π - π 相互作用が生じることを意図して、芳香族性アミノ酸を変異導入した変異型 A_{2A}R および芳香環を持つ阻害剤のペアを作製した。HEK293 細胞でその機能評価を行ったところ、野生型 A_{2A}R よりも強く活性が阻害されることを見出し、変異型 A_{2A}R 選択的な活性制御に成功した。

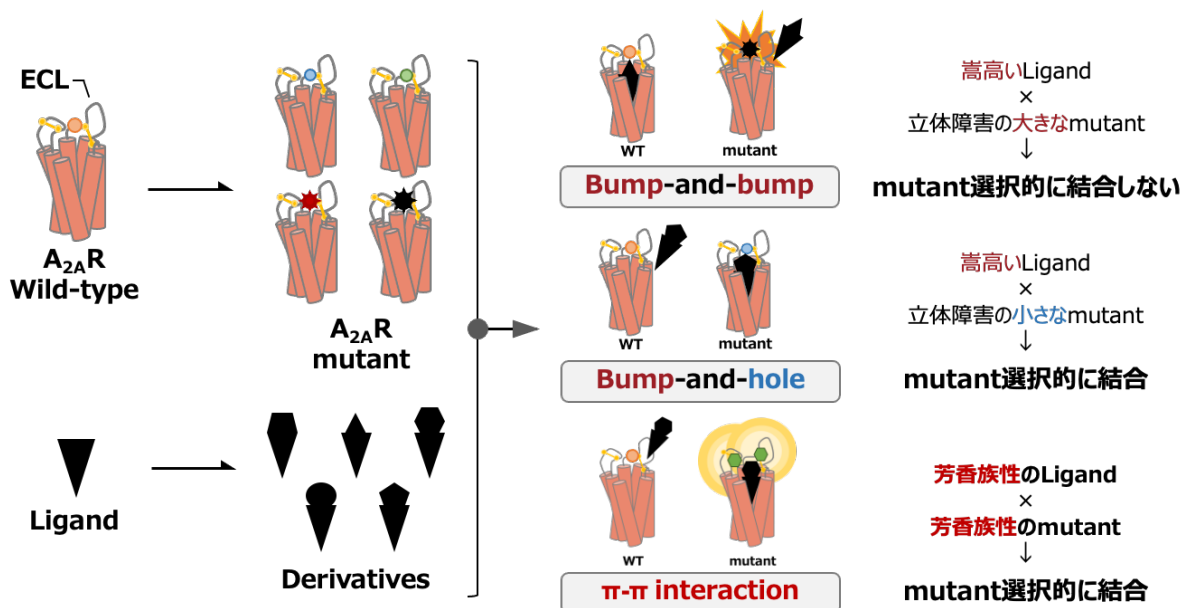


Fig. Outline of chemogenetic regulation of A_{2A}R using ECL engineering

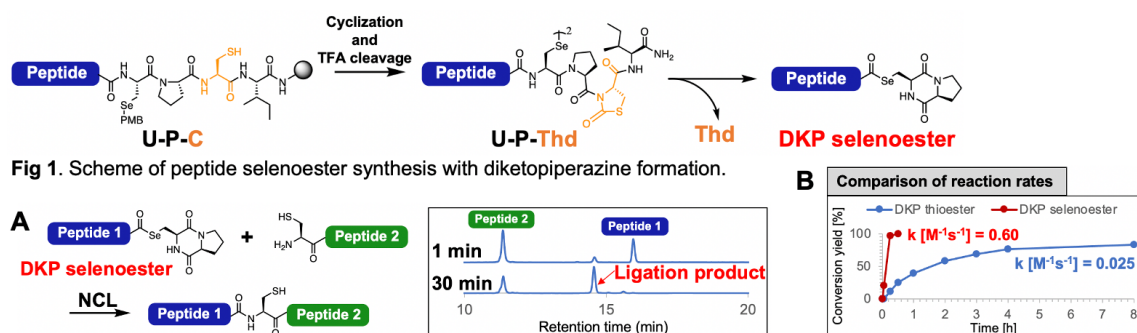
高効率ペプチドライゲーションのための新規セレノエステル合成法の開発

○橋本雅也¹・林剛介¹・村上裕¹ (¹名大院工)

A novel peptide selenoester synthesis method for efficient peptide ligation (Graduate School of Engineering, Nagoya University)¹⁾ HASHIMOTO, Masaya¹; HAYASHI, Gosuke¹; MURAKAMI Hiroshi¹

タンパク質を有機化学的に作製する「タンパク質化学合成法」は、他の方法では作製困難な修飾タンパク質や人工タンパク質の作製を可能にする。その合成では、ペプチド同士を繋ぎ合わせるペプチド連結反応が必要不可欠であり、最もよく用いられるのがネイティブケミカルライゲーション(NCL)と呼ばれる反応³⁾である。NCLではC末端にチオエステルを持つペプチドとN末端にシステインを持つペプチドを反応させ、ペプチド間に新たなペプチド結合を生成させる。近年、NCLにおいてチオエステルより反応性が高いセレノエステルの利用が盛んに研究されるようになってきた。しかし、従来のセレノエステル合成法には煩雑な操作や、低収率といった課題があった。そこで我々は新たなセレノエステル等価体として、セレノシステニルプロリルチアゾリジノン(U-P-Thd)構造を有するペプチドを開発した(Fig 1.)。UP-Thd ペプチドは、当研究室で以前開発したシステニルプロリルチアゾリジノン(CP-Thd)型チオエステル等価体^{1), 2)}のセレノシステイン版であり、Fmoc 固相合成で容易に合成可能で、比較的温和な条件下で効率良くセレノエステルへ変換することができる。

UP-Thd ペプチドの合成は、まず Fmoc 固相合成によりペプチド C 末端にセレノシステイン(U)、プロリン(P)、システイン(C)を持つペプチドを合成し、その後システインを選択的に環化させてチアゾリジノン(Thd)へと誘導することで目的のペプチドを得る。UP-Thd 構造は中性水溶液中で、N—Se アシルシフトと続くチアゾリジノンの脱離によって自発的にジケトピペラジンへと変換される。次に、合成したペプチドセレノエステルを用いてペプチド連結反応を検討した。セレノエステルペプチド 1 と N 末端にシステインを持つペプチド 2 を反応させたところ、反応開始 30 分以内に反応が完了したことが確認された(Fig 2A.)。また、チオエステルとの反応性を比較した結果、セレノエステルの反応速度は約 24 倍向上したことが確認された(Fig 2B.)。本研究で開発した簡便で効率的なセレノエステル合成法によってタンパク質化学合成がより効率化されると考えられる。



- 1) M. Yanase, K. Nakatsu, C. J. Cardoso, Y. Konda, G. Hayashi, A. Okamoto, *Chem. Sci.*, **10**, 5967-5975 (2019)
 2) K. Nakatsu, M. Yanase, G. Hayashi, A. Okamoto, *Org. Lett.*, **22**, 4670-4674 (2020)
 3) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science*, **266**, 776-779 (1994)

パラジウム錯体を利用したコロナウイルス結合人工抗体の効率的な合成

○小澤英知¹・林剛介¹・村上裕¹ (¹名大院工)

Efficient total chemical synthesis of artificial antibody (monobody) by utilizing Pd complex (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹) Eichi Ozawa¹; Gosuke Hayashi¹; Hiroshi Murakami¹

人工抗体は、IgG 抗体のように特定のタンパク質に特異的に結合する人工タンパク質であり、IgG 抗体よりも分子サイズが 1/10 程度と小さいため、生体内において組織浸潤性が高い、試験管内分子進化法により取得が可能、大腸菌による発現が容易、化学的な改良がしやすい、といった利点を有する。

現在、人工抗体は大腸菌発現によって作製されたものが実験に用いられているが、大腸菌発現では導入できるアミノ酸が 20 種類のアミノ酸に限定されるため、タンパク質の機能化を行う際に改良の範囲が制限されてしまう。そこで、我々の研究グループでは有機化学的にタンパク質を作製する「タンパク質化学合成法」を用いることで非天然アミノ酸を導入した高機能化人工抗体の創製を目指している。本発表では、当研究室で取得されたコロナウイルス S タンパク質結合人工抗体モノボディ¹⁾の化学合成ルートを確立したので紹介する。タンパク質化学合成法は、固相合成で作製したペプチド断片を順次ペプチド連結反応によってつなぎ合わせることでタンパク質を得る方法であり、非天然アミノ酸を部位特異的に導入することができる。しかし、連結する断片の数が多くなるほど精製過程に由来する収率の低下が問題となる。そこで、我々の研究グループで開発した Pd 錯体を用いた効率的ペプチド連結反応^{2,3)}を利用してモノボディの合成を行った。

108 アミノ酸からなるモノボディを 3 つのペプチド断片に分け、それぞれ固相合成で作製した(Fig. 1)。ペプチド 1 の C 末端 Asp の側鎖カルボン酸およびペプチド 2 の N 末端アミノ基には、それぞれ Pd 錯体で脱保護可能な Allyl 基および Alloc 基を導入した。ペプチド 2 と 3 の連結反応の後に Pd 錯体を加えることで連結したペプチドの N 末端が脱保護され、次の反応点が形成される。その後、新たにペプチド断片を加えることで 3 断片を精製せずに連結させることに成功し、さらに Asp 側鎖の Allyl 基も Pd 錯体によりワンポットで脱保護反応を行った(Fig. 2)。その後、HPLC 精製を行ってから連結部位のシステインを脱硫反応によってアラニンに変換し、モノボディを単離することに成功した。

1) T. Kondo, Y. Iwatani, K. Matsuoka, T. Fujino, S. Umemoto, Y. Yokomaku, K. Ishizaki, S. Kito, T. Sezaki, G. Hayashi, H. Murakami. *Sci. Adv.* 2020, **6**, eabd3916

2) N. Kamo, G. Hayashi, A. Okamoto; *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, **57**, 16533

3) N. Kamo, G. Hayashi, A. Okamoto; *Chem. Commun.* 2018, **54**, 4337

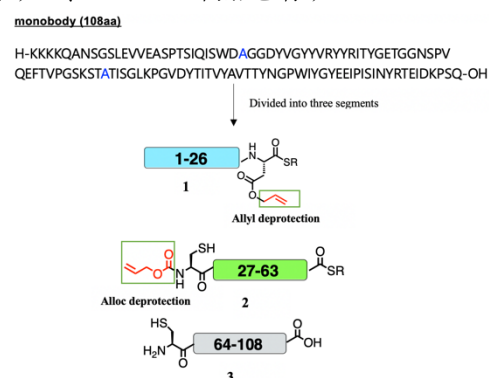


Fig 1. Monobody segment design

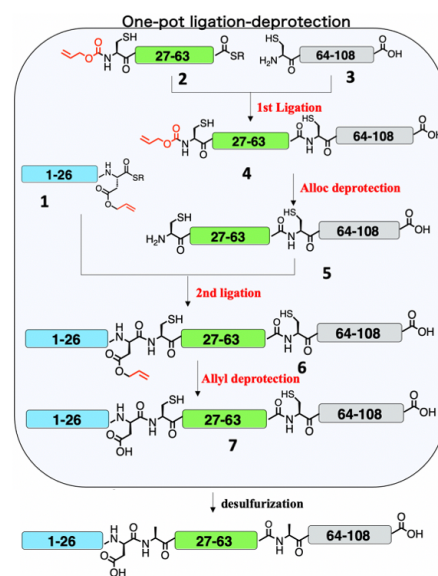


Fig 2. Peptide ligation scheme without purification

標的シトシンの周辺塩基が可逆的 RNA 光架橋反応を用いた RNA 編集に与える影響

○川添秀・石野佳奈子・中村重孝・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Effect of adjacent base of target cytosine in photochemical RNA editing using reversible RNA photo-cross-linking (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology)
KAWAZOE, Shu¹; ISHINO Kanako; NAKAMURA Shigetaka; Fujimoto, Kenzo

核酸塩基編集法は一塩基変異などから生じる遺伝子疾患の治療に対する有用な方法である。化学物質を用いて DNA を修飾する化学的手法と酵素的核酸塩基編集法の CRISPR/Cas を使用したゲノム編集やアデノシンデアミナーゼを使用した RNA 編集は、遺伝子疾患の治療法として近年、注目を集めている^{1,2}。生体内においてゲノム DNA はコピーが 1 対しか存在しない。そのためゲノム編集はオフターゲット効果のリスクが高いが、RNA は継続的に生成されるため、RNA 編集では DNA 編集と比較してそのリスクを減らすことが可能である。しかし、化学的手法では有害な化学物質を利用している点や酵素的手法においては配列選択性・編集効率が低く、細胞毒性があるという問題を抱えており、より利便性が高い編集法の開発が求められている。我々は、光により架橋と開裂が可能な光応答性人工核酸 3-cyanovinylcarbazole(^{CNV}K)を用いたシトシン(C)からウラシル(U)へのピンポイント編集法を開発している。また、細胞内 RNA に対する光架橋は、細胞内アンチセンス核酸の光制御などにより成功している。これまで、DNA を標的としてシトシンの周囲環境を変えると、生理的条件下で高い脱アミノ化効率を示すことを報告してきた³。本研究ではオフターゲット効果のリスクを軽減するために、細胞内に一本鎖で存在する RNA を標的とした光化学的核酸塩基編集を試み、脱アミノ化効率に対する標的シトシンの周囲環境の影響を明らかにしようと考えた。光架橋素子として ^{CNV}K 誘導体、対面塩基にグアニン(G)、イノシン(I)、シトシン(C)を用いてオリゴ DNA(ODN)を合成した。385nm の光照射により標的 RNA 鎖と相補鎖 ODN の光架橋体を作製し、37℃で脱アミノ化反応を行った。後に、312nm の光照射により光開裂させ UPLC 解析をし、ピーク面積から C から U への変換率を算出した。UPLC 解析結果より、すべてのプローブで C から U への変換が確認できた。光架橋素子に 3-carboxyvinylcarbazole(OHVK)、対合塩基にイノシンを用いた場合に最も変換率が高く、37℃で 7 日間反応後に約 70%の変換率を示した。変換効率の違いを議論するため、親水性の指標となる分配係数(LogP)測定を行った。その結果、C から U への変換速度と LogP には相関が見られ、親水性が高いほど変換速度が速いことを見出した。脱アミノ化時の水分子の求核置換反応を促進していると考えられ、標的 RNA 鎖中のシトシン周辺の親水性が RNA 編集(C→U)に大きな影響を及ぼしていることが示唆された。

Reference

1. L. Cong, A. Ran et al, *Science*, **2013**, 339, 819.
2. H. Ota, M. Sakurai et al., *Cell*, **2013**, 153, 575.
3. S. Nakamura, K. Ishino, K. Fujimoto, *ChemBioChem*, **2020**, 21, 3067.

コレラ菌由来色素分解ペルオキシダーゼによるヘムを分解しない脱鉄機構

○梅津彩加¹・佐々木美穂¹・石森浩一郎^{1,2}・内田毅^{1,2} (¹ 北大院総化、² 北大院理)

Mechanism of iron removal from heme by *Vibrio cholerae* DyP-type peroxidase (Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University¹, Faculty of Science, Hokkaido University²)
UMETSU, Sayaka¹; SASAKI, Miho¹; ISHIMORI, Koichiro^{1,2}; UCHIDA, Takeshi^{1,2}

鉄の獲得は細菌の増殖に必須であるため、多くの病原菌は、宿主であるヒトから取り込んだヘムを分解し、鉄を取り出す反応を触媒するヘム分解酵素を有している。コレラ菌においてもヘム分解酵素 HutZ が報告されており、分子状酸素を用いてポルフィリン環を開環させ、Fe²⁺を遊離させる。このようなヘム分解による鉄の獲得機構の阻害は、コレラ菌の抗菌薬の開発の標的となることが期待されるが、近年、大腸菌由来の色素分解ペルオキシダーゼ(DyP)である YfeX が、このようなヘム分解反応を用いずに鉄を遊離することが報告された。これまでの報告では YfeX を過剰発現させた大腸菌の溶菌液にヘムを加えることで、ヘムから鉄が遊離したプロトポルフィリン IX (PPIX)の生成を確認したのみで、その詳細な反応機構は明らかとなっていない。コレラ菌も YfeX と 46%の高いアミノ酸配列同一性をもつ DyP (*VcDyP*)を有していることから、ヘム分解を経由しない鉄獲得機構を有し、HutZ の機能阻害では十分な増殖阻害が期待できない可能性がある。そこで、本研究では *VcDyP* におけるヘム分解を経ない脱鉄反応機構の解明を目指した。

我々の先行研究で *VcDyP* による脱鉄反応が進行することを確かめている嫌気、還元条件下で、蛍光分光法を用いて *VcDyP* の脱鉄反応を PPIX の蛍光により追跡した。その結果 624 nm の蛍光強度が増加し(Fig. 1)、HPLC により生成物を同定したところ PPIX の生成が確認できた。ミオグロビンやヘムだけではこのような蛍光の増加は観測されなかったことから、*VcDyP* に特有の反応であった。反応に関与するアミノ酸残基を推定するため *VcDyP* による脱鉄反応の pH 依存性を測定した。その結果、pH 6.5–8 では蛍光強度が増大し、PPIX が生成したが、pH 6.2 以下では蛍光強度は増大せず、PPIX は生成しなかった (Fig. 2)。つまり、His のような pK_aが中性の残基がプロトン化されると反応が進行しないことがわかった。ヘムから PPIX を生成する脱鉄反応としては、塩酸処理が知られている。酸性条件下ではヘムのピロール環にプロトンが付加することでピロール窒素とヘム鉄の間の結合が切断され、その結果、鉄が遊離するが、*VcDyP* による脱鉄反応では溶媒のプロトンがヘムのピロール環の窒素を直接攻撃するのではなく、His がピロール環へのプロトン付加に関与している可能性が考えられた。ヘムの周辺には軸配位子である His213 しか His は存在しないことから、今後はこの残基を中心にヘムの周辺のアミノ酸残基の寄与に注目して、*VcDyP* におけるヘム分解を経ない脱鉄反応機構を検討する。

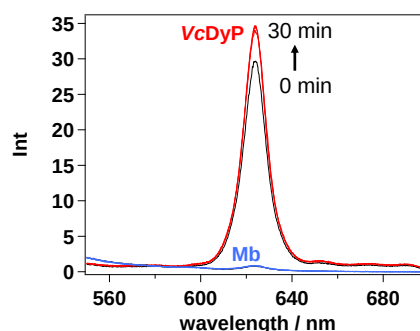


Fig. 1 PPIX generation by *VcDyP*
 black; before reaction, red or blue; after reaction

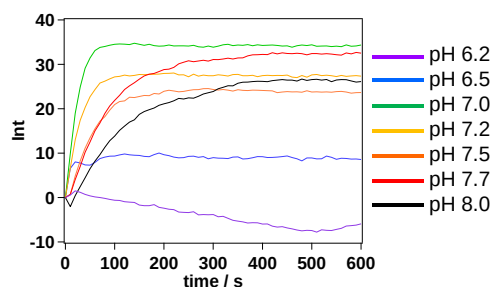


Fig. 2 Time course of intensity change in fluorescence from PPIX

細胞膜透過におけるフォールディング構造が形成する二次元カチオンクラスターの重要性

○羽森真美・北田千江梨・呉原美空・久木望・芝田信人・根木滋（同志社女大薬）

Important role of two-dimensional cationic cluster induced by protein folding in cellular uptake (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts) HAMORI, Mami; KITADA, Chieri; KUREHARA, Miku; KUKI, Nozomi; SHIBATA, Nobuhito; NEGI, Shigeru

近年、塩基性アミノ酸を用いた細胞膜透過性ペプチドに関する研究が数多くさなれている。McNaughton らは、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いて、タンパク質表面のカチオン性を高めることで膜透過能を付与できることを見出し、タンパク質表面の二次元カチオンクラスターの重要性を示した¹⁾。そこで本研究では、Sp1 亜鉛フィンガータンパク質 (Sp1ZFP) およびその変異体を用いた細胞膜透過実験を行い、タンパク質表面の二次元カチオンクラスター構造が細胞内移行にどのような影響を与えるかについて検討を行った。ZFP は総電荷数を変化させることなく、Zn (II) 配位の有無のみで二次構造形成のコントロールが行えるため、二次構造形成時に誘起される二次元カチオンクラスターの膜透過への影響を評価するにあたり、最適なモデルタンパク質であると考えられる。

Sp1ZFP の各種フィンガードメイン (Fig. 1) の合成は、大腸菌を用いたタンパク質発現および Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて行った。得られたタンパク質の C 末端に Cy5 蛍光ラベルの導入を行い、HeLa 細胞を用いた Sp1ZFP の細胞内分布を共焦点顕微鏡により観察し、細胞内移行量の測定を FACS を用いて行った。

共焦点顕微鏡により、全ての Sp1ZFP において細胞膜透過能が確認され、それぞれ核周辺に局在することが明らかとなった。また FACS による細胞内移行量の検討を行ったところ、各ドメインの細胞内移行量は概ね総電荷に依存したが、例外も認められた。この例外に対して、我々は総電荷数以外にタンパク質表面の二次元カチオンクラスター構造が細胞内移行に重要であると考えた。そこで、シングルフィンガー (1F1, 1F2 および 1F3) に対して、Zn (II) 配位能がなく二次構造誘起ができない Ala 変異体を作成し wt と比較検討を行い、タンパク質表面に形成されるカチオンクラスターの役割を検討した。その結果、いずれの場合も細胞内移行量は 1F-wt > 1F-Ala となった。また、1F3 において、その配列中に存在するカチオンクラスターの欠損体を作成し細胞内移行に与える影響を検討したところ、欠損体は野生型と同様な二次構造が形成されているにもかかわらず、カチオンクラスター欠損体では野生型と比較し細胞内移行量が明らかに減少することが確認された。以上の結果より、フォールディングによって形成されるフィンガードメイン表面の二次元カチオンクラスター構造は細胞内移行能に影響を与えることが明らかとなり、細胞膜表面との相互作用において重要な役割を果たすことが示唆された。

```

1F1      ——— DPGKKKQHICHIQGCCKVYGTSHLRAHLRWHTGEKCK
1F1-Ala  ——— DPGKKKQHIAHIQGAAGVYGTSHLRAHLRWHTGEKCK
1F2      ——— RPFMCTWSYCGKRFTRSDQLQRHKRTHTEGKCK
1F2-Ala  ——— RPFMATWSYAGKRFTRSDQLQRHKRTHTEGKCK
1F3      ——— KKFACPECPKRFMRSDHLSKHIKTHQNKKYKCK
1F3-Ala  ——— KKFAPAEPKRFMRSDHLSKHIKTHQNKKYKCK
1F3-N-AA ——— AAFACPECPKRFMRSDHLSKHIKTHQNKKYKCK
1F3-C-AA ——— KKFACPECPKRFMRSDHLSKHIKTHQNAAYKCK
1F3-KR-AA ——— KKFACPECPAAMRSDHLSKHIKTHQNKKYKCK
2F12     ——— MDPGKKKQHICHIQGCCKVYGTSHLRAHLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFTRSDQLQRHKRTHTEGKCK
2F13     ——— MDPGKKKQHICHIQGCCKVYGTSHLRAHLRWHTGEKKFACPECPKRFMRSDHLSKHIKTHQNKCK
2F23     ——— MTGERPFMCTWSYCGKRFTRSDQLQRHKRTHTEGKKFACPECPKRFMRSDHLSKHIKTHQNKCK
3F123    ——— MDPGKKKQHICHIQGCCKVYGTSHLRAHLRWHTGERPFMCTWSYCGKRFTRSDQLQRHKRTHTEGKKFACPECPKRFMRSDHLSKHIKTHQNKCK
  
```

Fig. 1. Amino acid sequences of Sp1 zinc finger proteins.

- 1) B. R. McNaughton, J. J. Cronican, D. B. Thompson, D. R. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106**, 6111 (2009)

チロシナーゼを用いた迅速かつ効率的な生細胞での近傍ラベリング

○松田侑奈¹・朱 浩¹・Jae Hoon Eric Oh^{1,2}・中村秀樹^{1,2}・辻川宗男^{1,2}・田村朋則¹・浜地格^{1,2} (¹京大院工、²JST ERATO)

Rapid and efficient proximity labeling in living cells with engineered tyrosinase (Graduate School of Engineering, Kyoto University¹, JST ERATO²) MATSUDA, Yuna¹; HAO, Zhu¹, JAE Hoon Eric Oh^{1,2}, NAKAMURA Hideki^{1,2}, TSUJIKAWA Muneo^{1,2}, TAMURA Tomonori¹, HAMACHI Itaru^{1,2}

近傍ラベリングはオルガネラや、標的タンパク質の周囲でタンパク質を無差別に標識する戦略であり、特定のオルガネラに局在するタンパク質やタンパク質間ネットワークの包括的な同定を可能にする。従来の酵素触媒の近傍ラベリング法ではペルオキシダーゼ (e.g. HRP, APEX) やビオチンリガーゼ (e.g. BioID, TurboID) 等が用いられる。しかしペルオキシダーゼの活性化には有毒な H₂O₂ が不可欠であり、細胞の代謝やタンパク質の翻訳後修飾に深刻な影響を与え、in vivo での適用が制限される。また、BioID 法ではラベリング速度が遅く (18-24 h)、動的な観測が制限される。TurboID の効率の高さは速い近傍ラベリング (10 分) を可能にする一方、細胞毒性と強いバックグラウンドラベリングを引き起こす。

以上の背景を踏まえ、本研究ではチロシナーゼを用いた新規の近傍ラベリング戦略を報告する。本手法では、目的オルガネラに発現した細菌由来のチロシナーゼ (bmTYR) がフェノール基質を高反応性のキノンへと変換し、近傍タンパク質の求核性残基と反応することでラベル化が進行する (Fig.1)。

bmTYR は単量体でサイズが小さく (34 kDa)、ジスルフィド結合を持たない。従来法に比べ、(1) 有毒な H₂O₂ を必要としない (2) ラベル化速度が速い (≦60 分) (3) アフィニティタグとしてビオチンに加え、蛍光色素を含む多様なタグを利用できる (4) 修飾可能なアミノ酸の範囲が広い (Cys, Lys, His) ことが利点である。

試験管内の実験において、5 分で顕著な BSA のラベル化が見られた (Fig. 2A)。生きた細胞に核・ミトコンドリア・細胞質をターゲットした bmTYR を発現させ、プローブ、低濃度の Cu²⁺ (≦10 μM) を添加後 60 分インキュベートすると各細胞小器官で効率良くラベル化が起こった (Fig.2 B, C)。以上の結果から、チロシナーゼを用いた近傍ラベリングに成功し、本手法がオルガネラレベルの解像度での in vivo プロテオミクスに有用であることが示唆された。

- 1) Rhee H *et al.* *Science* **339**, 1328–31 (2013).
- 2) Roux KJ *et al.* *J. Cell Biol.* **196**, 801–810 (2012).
- 3) Branon T *et al.* *Nat. Biotechnol.* **36**, 880–887 (2018).
- 4) Qin W *et al.* *Nat. Methods* **18**, 133–143 (2021).

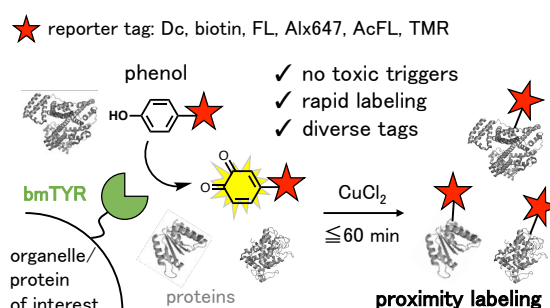


Fig 1. Schematic illustration of proximity labeling with tyrosinase

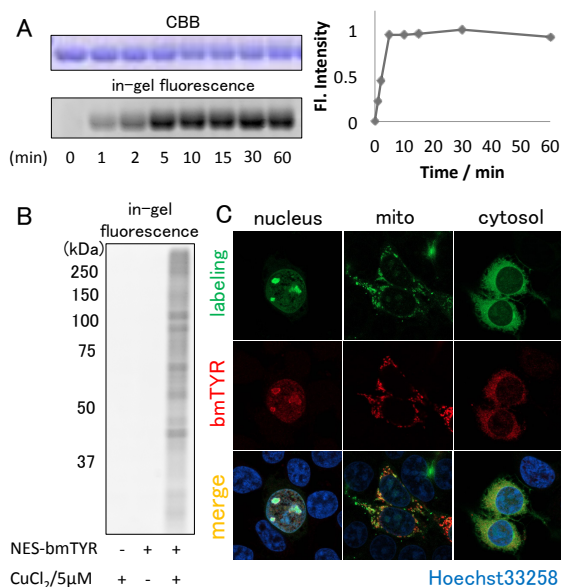


Fig 2. A) Time-dependent BSA labeling. B) and C) Proximity labeling in living cells with subcellular-localized bmTYR.

カルボニル基含有コラーゲンモデルペプチドの三重鎖構造の安定性

○竹村 直記・富崎 欣也（龍谷大理工）

Stability of Triple-chain Structure of Collagen Model Peptides Containing Carboxyl Groups (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) TAKEMURA, naoki TOMIZAKI, kin-ya

【緒言】病気や骨折などの外部からの強い刺激によって失われた骨を補填する方法として人工骨の利用が推進されている。現在では、構造及び組成の観点から天然の骨と似ているヒドロキシアパタイト（HA）が人工骨の材料として用いられている。しかし、HA 移植後自家骨置換に長時間を要することが知られている。そこで、コラーゲンなどの有機物で HA を被覆することによって骨の成長を促進することができるのではないかと考えた。しかし、天然のコラーゲン利用では一般的に機能制御が困難であること、陸生生物由来の人獣共通感染症のリスク低減や水生生物由来の低い変性温度の改善など解決すべき課題は多い。そこで、当研究室では、化学合成されたコラーゲンモデルペプチドを用いることで天然のコラーゲンの問題点を解決する方法に注目している。本研究では、カルシウムイオンに反応して集合体を形成し、HA 形成を促進することを期待して配列の中央部にアスパラギン酸を配置したコラーゲン分子（CMP-6, Fig.1, ）の合成を試みた。加えて、カルシウムイオンによる影響を考察するためカルボキシ基をもたない対照ペプチド（CMP-7, Fig.1, ）の合成も行った。

CMP-6 : Ac-(GPO)₅-GPD-(GPO)₄-G-NH₂

CMP-7 : Ac-(GPO)₁₀-G-NH₂

O = hydroxyproline

Fig.1. コラーゲンモデルペプチドのアミノ酸配列

【実験】液相合成法によりジペプチド（Fmoc-Gly-Pro-OH）を合成した。次に、固相合成法によりトリペプチド（Fmoc-Gly-Pro-Hyp(^tBu)-OH）を合成した。得られたトリペプチドをビルディングブロックとして固相合成法により CMP-6 及び CMP-7 を合成し、逆相 HPLC 及び MALDI-TOF-MS で目的ペプチドを精製・同定した。また、二次構造及び熱変性温度を評価するため CD スペクトル測定を行った。

【結果と考察】HPLC および MALDI-TOF-MS の測定の結果、コラーゲン分子の中間部にアスパラギン酸による負の電荷を有する CMP-6 および対照コラーゲン分子 CMP-7 の合成に成功したと考えられる。CD スペクトル測定の結果、4℃では CMP-6、CMP-7 ともにトリプルヘリックス構造をとっていることが分かった。熱変性温度は CMP-6 が 60℃（Fig.2）、CMP-7 が 70℃（Fig.3）となり差が現れた。よってカルボキシ基の存在が三重鎖構造を若干不安定することが分かった。

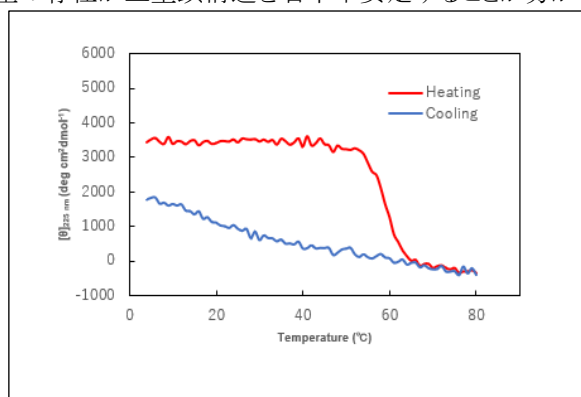


Fig.2. CMP-6 の熱変性温度測定結果

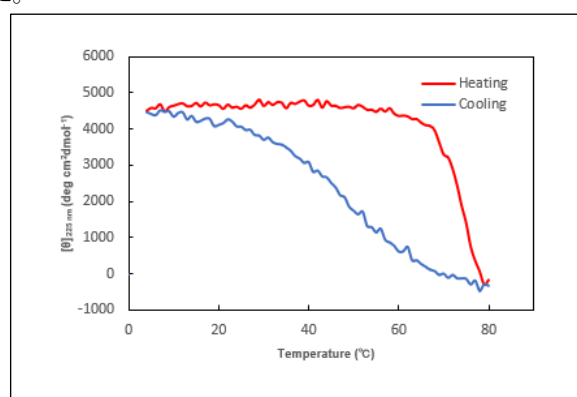


Fig.3. CMP-7 の熱変性温度測定結果

チタン-細胞間接着強化を指向したコラーゲンモデルペプチドの合成

○田中駿・富崎欣也（龍谷大理工）

Synthesis of A Collagen Model Peptide for Enhanced Titanium-Cell Adhesion. (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) TANAKA, Shun; TOMIZAKI, Kin-ya

近年、世界的な高齢化によりインプラント療法の需要が増加しており、耐腐食性および生体適合性の観点から、インプラントの材料としてチタンが利用されている。しかし、未処理のチタンでは、初期細胞接着量が少ないことによる細菌感染のリスクが課題として挙げられる。その解決策として、チタン表面の化学エッチングや高分子修飾など種々取り組まれている。例えば、天然コラーゲンを用いてチタン表面を修飾する場合、機能制御が困難なこと、陸上生物由来の人獣共通感染症のリスク、水生生物由来の変性温度の低さ等が挙げられるなどの課題は多い。しかし、化学合成されたコラーゲンモデルペプチド (CMP) を用いることでこれらの問題点を改善できるのではないかと考える。そこで本研究では、チタンと特異的に結合するチタン表面認識配列であるヒスチジン、リシン、ヒスチジン (HKH)^[1]と、細胞表面のインテグリンと特異的に結合する細胞接着配列であるグリシン、フェニルアラニン、ヒドロキシプロリン、グリシン、グルタミン酸、アルギニン (GFOGER)^[2]の二種の配列を典型的なコラーゲン配列に取り込んだ CMP-8 を設計・合成した (Fig.1)。

CMP-8 : Ac-His-Lys-His-Ape(5)-(Gly-Pro-Hyp)₄-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Gly-Pro-Hyp)₄-Gly-NH₂

Fig. 1. CMP-8 のアミノ酸配列

まず、液相合成法によりジペプチド (Fmoc-Gly-Pro-OH) を合成し、次いで、固相合成法によりトリペプチド (Fmoc-Gly-Pro-Hyp(^tBu)-OH) を合成した。得られたトリペプチドをビルディングブロックとして固相合成法により CMP-8 を合成した。得られたペプチドを 0.1 M Tris-HCl 溶液に溶解し、4 °C で 24 時間集合化させ CD スペクトル測定により二次構造を評価した。その後、波長を 225 nm に固定し、温度変化を 1 K/min に設定し、熱変性温度の測定を行った (Fig.2)。

CD スペクトル測定の結果から、4 °C ではトリプルヘリックス構造を形成し、80 °C ではランダム構造へと転移したことが分かった。また、再度冷却するとトリプルヘリックス構造へと可逆的に構造転移した。このことから、構造の可逆的な転移が確認でき、熱変性温度を 48 °C と決定した。

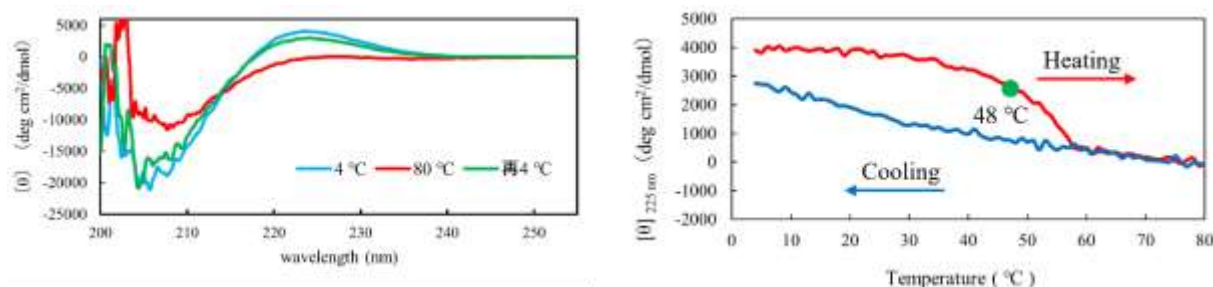


Fig. 2. CMP-8 の二次構造評価, [CMP-8] = 200 μM in 0.1 M Tris-HCl

[1] Kooh, X. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131 (31), pp 10992–10997.

[2] Khew S. T. and Tong Y. W. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 3153–3161

AFM を用いたファイバータンパク質 AtaA の力学特性解析法の確立

○鈴木浩平・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Establishment of analysis method for the mechanical property of a fiber protein using AFM (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SUZUKI, Kohei; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

アシネトバクテリウム属細菌 Tol 5 は、細胞表面に存在する長さ 250 nm のファイバータンパク質 AtaA を介してプラスチックやガラス、金属など様々な材料表面に対して高い付着性を示す¹⁾。原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた解析により、AtaA の付着には材料表面との直接的な相互作用だけでなくファイバーのもつ粘弾性などの力学特性も重要な役割を果たすことが最近分かってきた。しかし AtaA ファイバーに力がかかった際にどのような力学特性を示すのか、そしてそれがどのようなメカニズムで発揮されるのかの詳細についてはほとんどわかっていない。そこで本研究では、SpyTag/SpyCatcher²⁾を用いて AtaA をカンチレバープローブに共有結合で架橋することで、ファイバーの伸展に伴うフォース・ディスタンス (FD) カーブを AFM で一分子測定する実験系の確立を目指した。

まず、SpyTag を付加した AtaA を発現する細胞の構築を試みた。AtaA の N 末端の球状ドメイン (Nhead) を欠損させ、代わりに SpyTag を付加した組換え AtaA (SpyTag- Δ Nhead-AtaA) の発現プラスミドを構築した (Fig.1A)。これを Tol 5 の *ataA* 欠損株 (Tol 5 Δ *ataA*) に導入して発現させ SDS-PAGE とフローサイトメトリーに供したところ、タンパク質の生産及び細胞表層への提示が検出された。SpyTag- Δ Nhead-AtaA を発現させた Tol 5 Δ *ataA* を SpyCatcher と混合し SDS-PAGE に供したところ、SpyTag/SpyCatcher 間

での共有結合形成に伴う電気泳動移動度の減少が検出された。よって、SpyTag を付加した組換え AtaA が Tol 5 Δ *ataA* の細胞表層に適切に提示されていることが確認できた。

続いて、SpyTag-SpyCatcher 結合を介して AtaA を AFM プローブに架橋し、ファイバーの伸展に伴う FD カーブの取得を試みた (Fig. 1B)。SpyTag- Δ Nhead-AtaA と Δ Nhead-AtaA をそれぞれ発現させた Tol 5 Δ *ataA* をガラス基盤に固定化し、Cys-SpyCatcher で修飾した金コートプローブを細胞膜から約 200 nm の高さで 30 秒間静止させることで SpyTag-SpyCatcher 結合を形成させた。その後 1 μ m/s の速度で伸展させながら FD カーブを取得したところ、SpyTag の有無によって伸長距離と結合力に差が見られ、SpyTag- Δ Nhead-AtaA では AtaA 全長を伸展していると考えられる FD カーブを一定の割合で取得することができた。

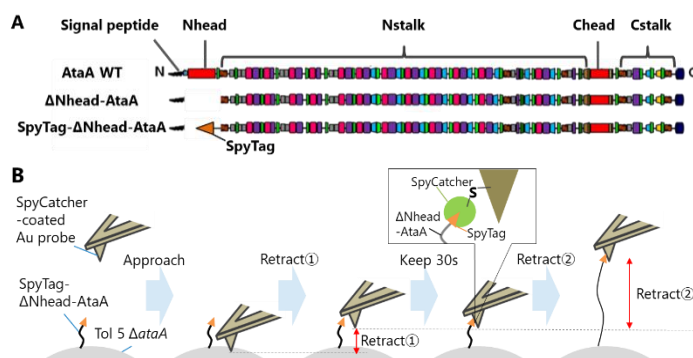


Fig. 1. (A) Schematic representation of AtaA, Δ Nhead-AtaA and SpyTag- Δ Nhead-AtaA. (B) The analytical method for the mechanical property of Spy-tagged AtaA using AFM.

- 1) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLOS ONE*, 7, e48830 (2012)
- 2) B. Zakeri, J. O. Fierer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109(12), E690-E697

有機光増感色素とタンパク質から構成される光レドックス人工酵素の開発

○内田裕貴・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Construction of a Photoredox Artificial Enzyme Consisting of an Organic Photosensitizer and Protein (Graduate School of Engineering, Osaka University) UCHIDA, Yuki; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

光レドックス触媒は、光による励起エネルギーを利用することで、熱による活性化では困難な反応の進行が期待されるため、活発に研究が行われている。近年では、光レドックス触媒と生体触媒を組み合わせた反応系が注目されており、光レドックス触媒の反応の多様性と、生体触媒の基質特異性、立体・位置選択性を組み合わせ、温和な条件下での反応と立体選択性の発現を可能にしている。しかし、多くの研究は光レドックス触媒による反応と生体触媒による光学分割の2段階の反応により、立体選択性を発現させており、光レドックス触媒反応の立体選択性を直接的に制御する系は限られている。そこで我々は、タンパク質の反応場に光レドックス触媒を配置し、光反応の立体選択性の制御を可能にする光レドックス人工酵素の開発を試みた。本研究では、光レドックス触媒として、有機光増感色素フルオレセイン、エオシン Y、ローダミン B、ローズベンガルを選択し、タンパク質は、フルオレセインと結合した結晶構造が報告されているリポカリンを選択した¹⁾。本研究では、これら有機光増感色素とリポカリンを組み合わせ、常温・常圧・水中の温和な条件の下、直接エナンチオ選択的な光誘起イミン還元反応を実現する光レドックス人工酵素の構築を目指している(Fig. 1)。

まず、モデル反応として既報²⁾を参考に 3,4-ジヒドロイソキノリン誘導体のイミン還元反応を選択した(Fig. 1)。触媒としてフルオレセイン、エオシン Y、ローダミン B、ローズベンガルのいずれかを用いて、アスコルビン酸(AscH₂)、3-メルカプトプロピオン酸(MPA)および 4-メルカプトフェニル酢酸(MPAA)の存在下で、青色 LED の照射によるイミン還元反応を評価した。その結果、すべての有機光増感色素において、光レドックス人工酵素の活性中心として働く可能性を示した。続いて、大腸菌を用いてリポカリンを発現し、フルオレセインに対するリポカリンの滴定実験から結合能を確認した。本発表では、有機光増感色素とリポカリンの複合体を触媒とするイミン還元反応の活性を報告する予定である。

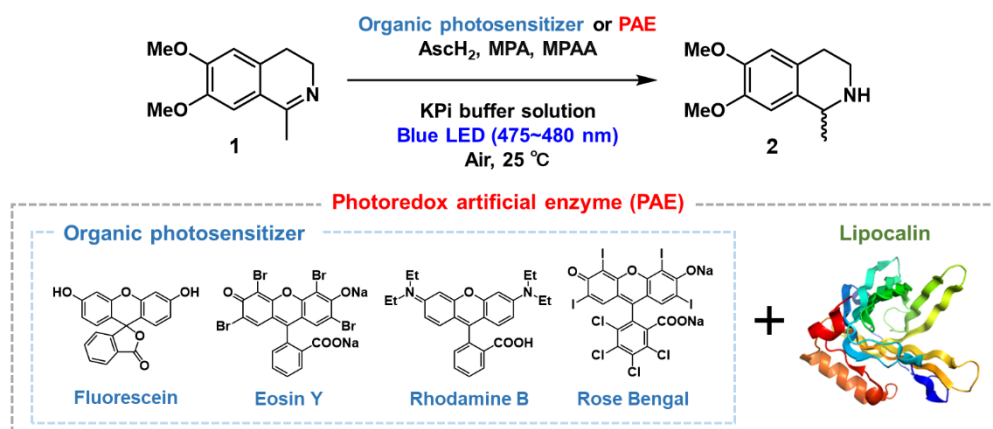


Fig 1. Imine reduction by each organic photosensitizer or photoredox artificial enzyme (PAE).

- 1) A. Skerra *et al.*, *PROTEINS*, **2003**, 53, 121-129.
- 2) O. S. Wenger *et al.*, *Chem. Sci.*, **2018**, 9, 5052–5056.

DNA コンジュゲートの光二量化を利用した二本鎖 DNA の特異的認識

○西村健人・北村裕介・勝田陽介・井原敏博（熊本大院先端）

Specific Recognition of double-stranded DNA through photo-dimerization of anthracene-modified DNA conjugates. (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University) NISHIMURA, Kento; KITAMURA, Yusuke; KATSUDA, Yousuke; IHARA, Toshihiro

当研究室における過去の研究によって、アントラセン修飾 DNA コンジュゲートと鋳型となる標的 DNA で形成したタンデム二本鎖複合体への光照射によって、境界で近接したアントラセン二分子の光二量化を介し、標的一本鎖 DNA を配列依存的に可逆的にラベル化することが可能である

ことがわかった¹⁾。この光反応は迅速かつ高効率に進行し生体直交的であることから、いわゆる「フォトクリック反応」といえる。これまでに様々なモチーフの核酸を鋳型とした検討を行っている。さらなる汎用性の向上を目指し、本研究では、長鎖の二本鎖を鋳型としたフォトクリック三本鎖形成による二本鎖 DNA の特異的な認識を試みる。三本鎖目のオリゴヌクレオチド (TFO) が結合可能な配列はホモプリン配列に限定されるが²⁾、Fig. 1 に示すようにホモプリン鎖を乗り換えながら TFO を結合させることで、比較的長い二本鎖も標的とすることが可能になると考えた。また、Hoogsteen 型の塩基対を形成して結合する TFO はもとより結合安定性が低い、TFO の末端にアントラセンを修飾しこれらを光化学的に連結することで、三本鎖構造の安定性向上が期待できる。

TFO がパラレル型のモチーフにて結合する三本鎖に関して検討を行った。鎖を乗り換えながらホモプリン配列を有する二本鎖をモデル標的として用いた。この場合、三本鎖目は逆向きの極性で結合するため、アントラセン修飾 DNA コンジュゲート (AntDNA) は 5'-5', 3'-3' 間にて連結することになる。その際、アントラセンと DNA を繋ぐリンカーの長さが連結効率や速度に対して重要な要素となることが予想されるため、三種類 (炭素数 3, 6, 8) のリンカー長のプローブを合成した。続いて、標的二本鎖に対して TFO となる AntDNA を添加し三本鎖を形成させた。0°C にて 365 nm の LED 光 (照射距離 1.5 cm, 300 mW) を 0~480 秒照射した後、逆相 HPLC により連結収率の確認を行い、同時に連結体を単離回収した。これを用いて融解実験を行い、光照射前後にて形成される三本鎖の安定性を評価した。

Fig. 2 に示すとおり、3'-3' 間での連結反応はリンカー長によらず、高い連結収率 (90%以上) にて迅速に進行した。一方、5'-5' 間ではどのリンカー長においても 50% 程度しか進行しなかった。三本鎖形成時の末端間距離が構造上 3'-3' 間より 5'-5' 間の方が遠いことに加え、平面なアントラセンが DNA 二重鎖の塩基対間へインターカレートしていることが、連結収率低下の原因として予想される。今後は、嵩高いアントラセンを修飾したプローブを用い連結収率の改善を試みる。また、リンカー長に関わらず全てのプローブにおいて、光連結体は、未連結時より高い融解温度 (T_m) を示すことが分かった。

1) T. Ihara et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 29, 8880-8881.

2) S. M. Mirkin et al., *Nature*. **1987**, 330, 495.

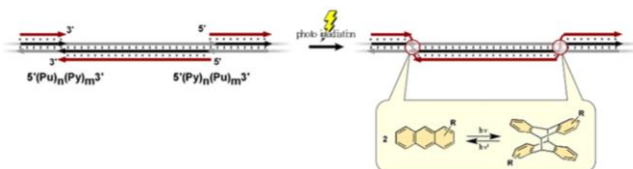


Fig. 1. Photo-induced triplex formation through the dimerization of anthracene-modified DNAs.

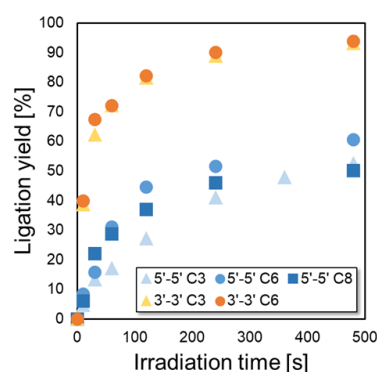


Fig. 2. Time course of the photo-dimerization.

がん選択的な核酸集合体構築による細胞死誘導

○大住拓輝¹・森廣邦彦¹・岡本晃充^{1,2} (¹東大院工、²東大先端研セ)

Cancer specific assembly of nucleic acids induces cell death (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹, Research Center for Advanced Science and Technology (RCAST), The University of Tokyo²) OSUMI, Hiraki¹; MORIHIRO, Kunihiro¹; OKAMOTO, Akimitsu^{1,2}

核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬では標的化が困難な分子を標的とすることができ、難治性疾患など従来では治療が難しかった分野への応用が期待されている。特に近年は核酸の化学修飾技術や標的部位への送達技術の進歩により核酸医薬品の認可が加速している。一方、核酸医薬の時空間的な機能制御を志向して核酸の保護基やプロドラッグの研究も行われているが、化学合成が簡便で、合成条件下でも血中でも安定であり、かつ細胞内環境に応じて選択的に脱保護される保護基の開発は困難を極めている。もし病変細胞内で選択的に核酸医薬を *in situ* 構築することができれば、そのプロドラッグ開発に大きなブレークスルーをもたらすことができる。

細胞内で構築する核酸医薬として、本研究では自然免疫を活性化する長鎖 DNA 二重鎖に着目した。長鎖 DNA 二重鎖は cGAS など細胞質中の DNA センサーに認識されることで I 型インターフェロンの発現を介して自然免疫を活性化し、細胞死を誘導する¹⁾。この機構のがん治療への応用が期待されているが、正常細胞への毒性や長い核酸分子をがん選択的に送達することの困難さが大きな障壁となっている。そこで、DNA ナノテクノロジーの一種である Hybridization Chain Reaction (HCR) により、短い

DNA 分子から長鎖 DNA 二重鎖を細胞内で構築することを考えた。HCR とは、トリガー核酸を起点として二種類のヘアピン型 DNA 間で繰り返される鎖交換反応により長鎖 DNA 二重鎖が構築される反応であり、温度制御や特殊な酵素を必要としないため細胞内での利用に適している (Fig. 1A)²⁾。がん細胞で過剰発現している miRNA をトリガー核酸として用いることで、がん細胞選択的に長鎖 DNA 二重鎖を構築して免疫を惹起し、副作用の低いがん治療法の開発を目指す (Fig. 1B)。

本研究では、試験管および細胞内において、二種のヘアピン型 DNA プロブが miRNA に応答して HCR を進行させることを確認した。また、代表的な細胞質中の DNA センサーである cGAS が HCR 産物に結合することも確認した。さらに、miRNA の発現量に応答した細胞死の評価も行なった。

1) Chen. *et al.*, *Nat. Immunol.*, **2016**, *17*, 1142-1149

2) Pierce. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, *101*, 43, 15275-15278

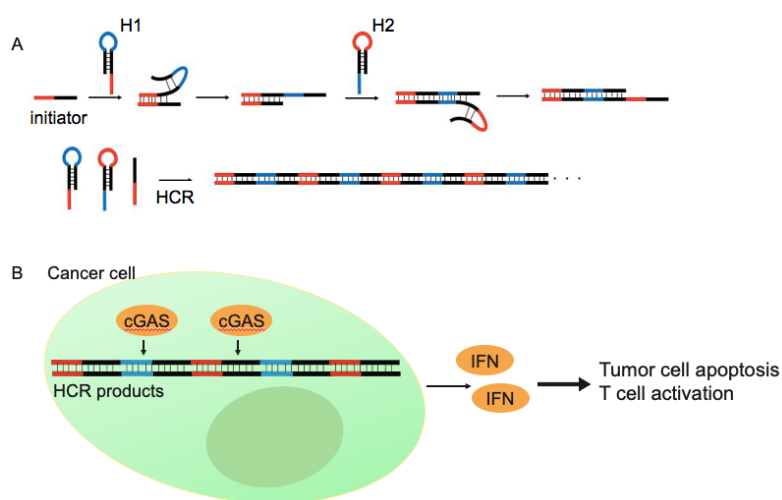


Fig 1. (A) Schematic illustration of HCR. (B) HCR products in cytoplasm induce immune stimulation and tumor cell death.