

ポスター発表(2日目)

■ 2021年9月9日(木) 15:40 ~ 16:40 | 後半番号 Zoom

■ 偶数 (2P-050~2P-094)

[2P-050] SNA型抗miRNAアンチセンス核酸の作用機序解明に向けたイメージング解析

*朱 紅宇¹、神谷 由紀子¹、浅沼 浩之¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科)

[2P-052] 副溝修飾アプタマーの探索を指向した置換基着脱型人工核酸の創製

*岡村 秀紀^{1,2}、伊藤 理奈^{1,2}、佐藤 健太^{1,2}、永次 史^{1,2} (1. 東北大学 多元物質科学研究所、2. 東北大学 大学院理学研究科)

[2P-054] 溶液測定に利用可能な SERS プローブの開発

*西川 英寿¹ (1. 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)

[2P-056] 5'-末端化学修飾siRNAのサイレンシング効果

*藤井 政幸¹、塩浜 康夫²、園川 舞華¹、久野 雅明¹、神武 洋二郎¹ (1. 近畿大学産業理工学部、2. 琉球大学熱帯生物圏研究センター)

[2P-058] トポロジー依存的なリガンド結合でグアニン四重鎖のDNA複製を制御する

*高橋 俊太郎¹、建石 寿枝¹、佐藤 しのぶ²、竹中 繁織²、PLAVEC Janez³、杉本 直己^{1,4} (1. 甲南大学先端生命工学研究所、2. 九州工業大学大学院物質工学研究系応用化学部門、3. Slovenian NMR Centre、4. 甲南大学フロンティアサイエンス学部)

[2P-060] SARS-CoV-2 のS1タンパク質RBD 結合アプタマーのイノシン導入効果の解析

*林 和佳奈¹、塚越 かおり¹、池袋 一典¹ (1. 東京農工大学大学院工学府)

[2P-062] ホールトラップ核酸塩基を用いた分子混雑環境におけるDNA内電子移動効率の評価

*武富 祐樹¹、山口 湧暉¹、櫻井 俊亮¹、田仲 真紀子¹ (1. 電気通信大学情報理工学研究科)

[2P-064] DNA 2 本鎖に光架橋可能な人工ペプチド開発

*内藤 大暉¹、三原 純一¹、Qiu Zhiyong¹、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-066] 末端に架橋構造を有するDNAを鋳型としたPCR解析

*平野 佑樹¹ (1. 北陸先端科学技術大学院大学)

[2P-068] キノリニウム型蛍光色素の合成および環境応答性

大庭 亨¹、*菅原 亜季¹、六本木 誠²、為末 真吾¹ (1. 宇都宮大院工農総合科学専攻、2. 宇都宮大先端計測分析部門)

[2P-070] エバネッセント光励起散乱による液滴中のリゾチーム凝集化分析

*車田 颯人¹ (1. 茨城工業高等専門学校専攻科)

[2P-072] 抗体を迅速に高性能蛍光免疫センサー化可能なプローブタンパク質 Coiled Q-probeによる各種抗原の検出

*笹本 佳那¹、安田 貴信¹、北口 哲也²、上田 宏² (1. 東京工業大学大学院生命理工学院、2. 東京工業大学化学生命研究所)

[2P-074] 金属フタロシアニン類の凝集を利用したアクティベータブル光音響造影剤の開発

*野北 康平¹、今泉 直人¹、三木 康嗣¹、大江 浩一¹ (1. 京都大学大学院工学研究科)

[2P-076] 2細胞間相互作用解析デバイスによるT細胞の抗原認識活性評価および発現遺伝子解析

*井手 大輝^{1,2}、齋藤 真人^{1,2}、青枝 大貴³、高松 漂太⁴、Espulgar Wilfred²、細川 正人⁵、松永 浩子⁵、有川 浩司⁵、竹山 春子^{5,6,7}、民谷 栄一^{2,8} (1. 阪大院工、2. 産総研・阪大先端フォトバイオ、3. 阪大微研、4. 阪大院医、5. 早大ナノライフ創新研、6. 早大院先進理工、7. 産総研-早大CBBD-OIL、8. 阪大産研)

[2P-078] 酸素発生型光合成生物のクロロフィル *b* の構造変換反応特性

*田中 雅之¹、佐賀 佳央¹ (1. 近畿大学大学院総合理工学研究科)

[2P-080] 高いペルオキシダーゼ活性を示す二核非ヘム鉄アミドアニオン配位錯体の開発

*福井 悠介¹、小寺 政人¹、人見 穰¹ (1. 同志社大学大学院 理工学研究科)

[2P-082] 金属ハイブリッドチャネルによる膜透過能制御

*小牧 航輔¹ (1. 立命館大学院生命科学研究科生命科学専攻)

[2P-084] ジオキサレニウムイオン中間体を經由する電解グリコシル化反応における支持電解質の効果

*石坂 優依¹、齋藤 阿須香¹、小林 丈泰²、渋谷 章人³、野上 敏材⁴ (1. 鳥取大学大学院持続性社会創生科学研究科、2. 鳥取大学工学部、3. 鳥取大学大学院工学研究科、4. 鳥取大学工学部GSCセンター)

[2P-086] アルキル鎖を有するダンシルトリアルギニンペプチドによる細胞膜上のシアル酸のTurn-On型蛍光イメージング

*岡崎 瑞紀¹、稲葉 央¹、松浦 和則¹ (1. 鳥取大院工)

[2P-088] タンパク質の配向を制御した再構成型リポソームの作製

*野場 考策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-090] Lipidic cubic phase中でのタンパク質拡散制御と経皮薬物送達への応用

*小坂 秀斗¹、若林 里衣¹、神谷 典穂¹、後藤 雅宏¹ (1. 九州大学工学研究院)

[2P-092] ヒアルロン酸-蛍光性カルボラン複合体によるBNCT

*河崎 陸¹、山名 啓太¹、真田 悠生²、増永 慎一郎²、鈴木 実²、櫻井 良憲²、坂東 香里³、田畑 杏里³、吉川 浩平³、東 秀紀³、杉川 幸太³、長崎 健³、池田 篤志¹ (1. 広島大学大学院先進理工系科学研究科、2. 京都大学複合原子力科学研究所、3. 大阪市立大学大学院工学研究科)

[2P-094] 細菌のヘム酵素が引き起こすフェントン反応によるカーボンナノチューブの分解

*高橋 慧良¹、田口 富美子¹、蟹江 純一²、堀 克敏¹ (1. 名古屋大学工学研究科、2. 株式会社フレンドマイクロブ)

SNA 型抗 miRNA アンチセンス核酸の作用機序解明に向けたイメージング解析

○朱紅宇・神谷由紀子・浅沼浩之(名大院工)

Elucidation of the Mechanism of SNA-Anti-miRNA through Intracellular Imaging (Graduate School of Engineering, Nagoya University.) Hongyu Zhu, Yukiko Kamiya, Hiroyuki Asanuma

microRNA (miRNA) は遺伝子発現を抑制する Non-coding RNA の一種である。miRNA は AGO2 タンパク質と RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるリボヌクレオプロテインを形成して初めて遺伝子発現抑制能を獲得する。近年、miRNA の発現異常ががんをはじめとした様々な疾患の要因の1つであることが示されている。miRNA の機能を特異的に抑制する抗 miRNA アンチセンス核酸(AMO)は新たな核酸医薬として期待されている。当研究室では、非環状人工核酸 Serinol nucleic acid (SNA)(Fig. 1)と修飾塩基を組み合わせ、高酵素耐性・高活性な anti-miR21 核酸(SNA-AMO)を開発することに成功している^[1]。しかしながら、SNA-AMO がどのような仕組みで miRNA を阻害しているのかは明らかとなっていない。特に、AMO が RISC を形成している miRNA に作用するのか、遊離の miRNA と結合するのかを明らかにすることは、AMO デザインにおいて非常に重要な知見となる。そこで、本研究では、開発した SNA-AMO の miRNA 阻害メカニズムを明らかにする事を目指し、細胞内における SNA-AMO と RISC の挙動を可視化解析により解明することを試みた。

miRNA と AMO の相互作用は FRET により可視化することとした。そのため、色素を導入した miRNA と AMO の開発を行なった。具体的には、標的 miRNA の前駆体 miRNA/miRNA* に蛍光基-消光剤ペアである BO とメチルレッド(MR)を、miRNA の活性を妨げない最適な部位^[2]に導入し、miRNA/miRNA* から解離した miRNA を可視化できるように設計した。さらに AMO には BO のアクセプターとなる Cy3 を導入することで、miRNA/AMO の結合により FRET が観測できる設計とした。これらの機能性核酸を合成し細胞内に導入することで、細胞内挙動の蛍光観察を行った。その結果、miRNA/miRNA* から解離した miRNA の発光、さらに、miRNA/AMO の複合体由来の FRET を観察することに成功した。また、これらの蛍光シグナルと RISC タンパク質である AGO2 を同時に可視化したところ、miRNA/AMO の複合体由来の FRET と、AGO2 由来の蛍光シグナルの共局在、すなわち、SNA-AMO と RISC が共局在している様子が観察された(Fig.1)。以上のことから、細胞内蛍光イメージング解析によって SNA-AMO は RISC に作用すると明らかにすることができた。

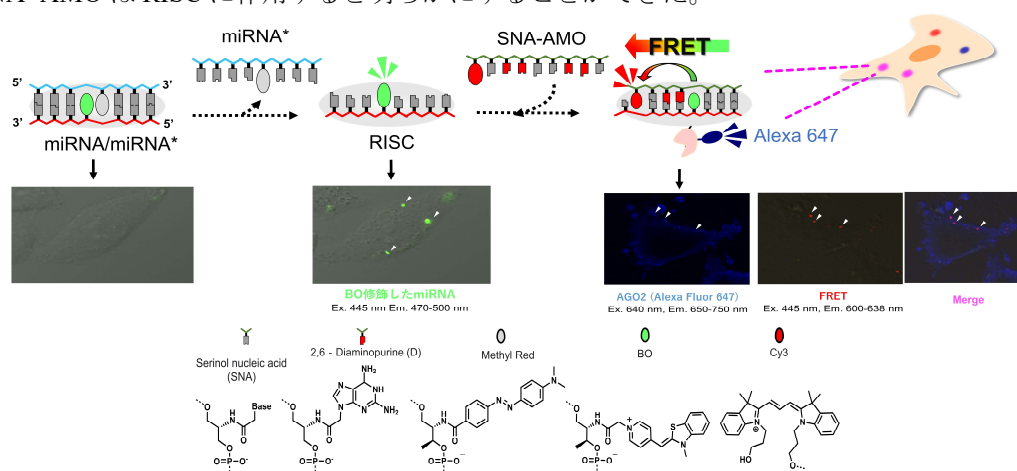


Fig. 1 SNA-AMO 作用機序可視化解析の設計と導入した色素

[1] Kamiya, et al., ChemBioChem. 2017, 18, 1917-192

[2] Kamiya, et al., Chemical Science. 2013, 4, 4016-4021.

副溝修飾アプタマーの探索を指向した置換基着脱型人工核酸の創製

○岡村秀紀^{1,2}、伊藤理奈^{1,2}、佐藤健太^{1,2}、永次史^{1,2} (1 東北大多元研、2 東北大院理)

Design and synthesis of substituent-detachable unnatural nucleic acids toward *in vitro* selection of minor groove-modified aptamer (¹Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, ²Graduate School of Science, Tohoku University) OKAMURA, Hidenori^{1,2}; ITO, Rina^{1,2}; SATO, Kenta^{1,2}; NAGATSUGI, Fumi^{1,2}

DNA アプタマーは、標的分子に対して選択的かつ高い親和性で結合できる DNA 分子である。その最大の特徴は、DNA のランダムライブラリーから標的結合配列の選別・増幅を繰り返す進化分子工学的手法 (SELEX 法) により簡便に獲得できることにあり、抗体に代わる次世代の分子標的技術としての応用が注目を集めている。しかし、4 種類の核酸塩基 (A, G, C, T) のみで構成される DNA アプタマーは化学的・構造的多様性に乏しいため、抗体を凌駕する性能を得られていないのが現状である。このような背景のもと、高性能な核酸アプタマーを開発する方法として、化学修飾した人工ヌクレオシドの利用が検討されている。これまでに、主溝側を化学修飾した核酸塩基を用いて DNA アプタマーを探索する方法論が多数報告されている¹⁾。一方、核酸塩基の副溝側を修飾した人工核酸は、ポリメラーゼ伸長反応を阻害するため、PCR を用いる SELEX 法への適用は困難であり、その有用性は未開拓である。そこで本研究では、副溝修飾アプタマーの有用性を明らかにするために、SELEX 法に適用可能な副溝修飾ヌクレオシドの開発を目的とした。

副溝修飾アプタマーを SELEX 法によって獲得するには、核酸塩基の副溝側に導入した置換基が PCR を阻害するという本質的な課題を克服する必要がある。本研究ではこの課題を解決する方法として、PCR を阻害する置換基を除去可能な新規修飾ヌクレオシドを用いることを計画し、DNA 上のマイナーグループ側に置換基を導入可能なチミジンアナログ (S) を設計した (図 1)。本分子に光切断性置換基を導入し、標的親和性に基づく選別を行った後、置換基を切断することで PCR による増幅が実現できると期待した。設計したチミジンアナログを導入したオリゴヌクレオチドを合成し、光切断可能な置換基の導入および置換基の光除去を検討した結果、それぞれの反応が効率良く進行する反応条件を見出した。さらに、置換基の光除去後に得られるヌクレオシド構造が、DNA ポリメラーゼ伸長反応においてチミジン等価体として認識されることを明らかにした。また、チミジンアナログ (S) の三リン酸体が、ポリメラーゼ反応においてアデノシンの相補的塩基として取り込まれることも明らかにした。

これらの結果は、図 1 に示したサイクルによる人工核酸を用いた副溝修飾アプタマー探索法が機能することを示唆しており、SELEX 法を用いたアプタマーの探索への応用が期待される。ポスターでは、分子設計、置換基着脱反応及び酵素反応について発表する。

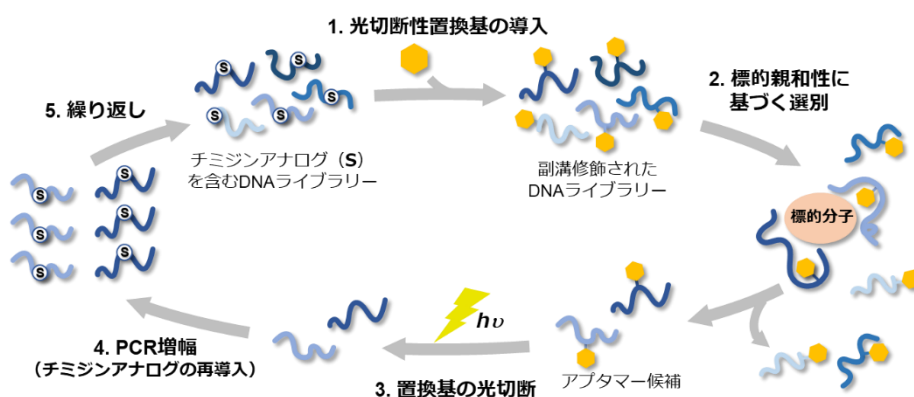


図 1. 置換基着脱可能な人工ヌクレオシドによる副溝修飾アプタマー探索法の設計概念

1) Vaught, J. D. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 4141; Imaizumi, Y. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 9412.

溶液測定に利用可能な SERS プロブの開発

○西川英寿・太田良・和久友則・小堀哲生（京工繊大院工芸）

Development of SERS probes for solution-phase detection of nucleic acids (Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology) ○NISHIKAWA, Hidetoshi; OTA, Ryo; WAKU, Tomonori; KOBORI, Akio

近年、がんやエイズなどの重篤疾患の発症に伴い、体液に含まれる核酸の発現量が特異的に変化することが明らかとなった。そのため、体液中の核酸は、低侵襲な疾患診断法であるリキッドバイオプシーに利用可能なバイオマーカーとして注目を浴びている。現在、核酸の定量法として利用されている定量 PCR 法は、高感度に核酸を定量できるという利点を持つが、測定試料中の夾雑物の除去や核酸増幅に時間がかかるという欠点を持つため、疾患診断法として汎用されていない。そこで我々は、単分子検出にも利用されるほどの高感度な技術である表面増強ラマン散乱 (SERS) に着目した。SERS は金属ナノ構造体に吸着した分子のラマン散乱光を 10^8 - 10^{10} 倍に増幅することが可能である。しかし、レーザーを当てた金ナノ構造体は発熱することが報告されており⁽¹⁾、レーザー照射時には金ナノ粒子近傍は高い温度になるため、核酸検出で重要な二重鎖形成が不安定化されることが予想される。そのため、溶液試料の SERS 測定による核酸定量分析はほとんど報告されていない。そこで、我々は溶液試料の SERS 測定を可能にするため、二重鎖の安定化を目指し、チミンと選択的に光架橋することが知られているトリオキサレン⁽²⁾を鎖中に導入した SERS プロブ S1, P2 を開発した。

S1, P2 には、生体分子のシグナルが観測されないサイレント領域にシグナルを有する 2 種類の生体直交型ラマンレポーター (EP: ●, PEP: ●) を導入した。また、S1, P2 に導入する光架橋性核酸は標的核酸を介して複合体を形成するように設計し、UV 照射後はこの複合体が安定化されるため、PEP のシグナルが観測される。

S1, P2 を用いて核酸検出を行ったところ、標的核酸存在下、UV 照射時のみ PEP のシグナルが観測された。また、PEP のピーク面積を EP のピーク面積で規格化すると、標的核酸存在下、UV 照射時の PEP のピーク面積が、他の条件に比べて最大 9.7 倍増加していることが明らかとなり、光架橋させることで熱による解離が抑制され、ラマンシグナルが増強されることが示唆された。

(1) G. Maltzahn, *et al.*, *Cancer Res*, **2009**, 69, 3892–3900.

(2) A. Kobori, *et al.*, *Chemistry Letters*, **2009**, 38, 272–273.

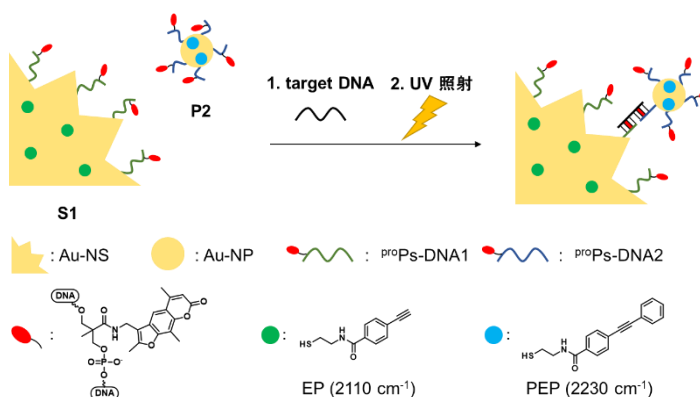


Fig 1. Procedure for detecting target DNA using S1 and P2.

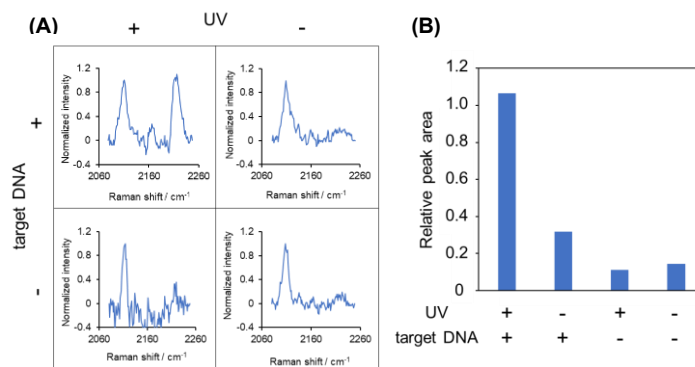


Fig 2. (A) Raman spectra of ratiometric SERS assay with different conditions. (B) Relative peak area of PEP in the different conditions.

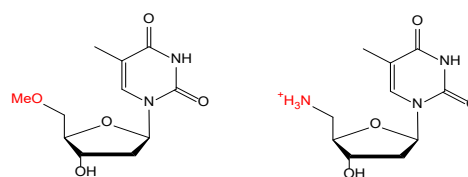
5'-末端化学修飾 siRNA のサイレンシング効果

○藤井政幸¹・塩浜康夫²・園川舞華¹・久野雅明¹・神武洋二郎¹ (¹近畿大産業理工、²琉球大学)

Silencing Effect of 5'-Modified of siRNA (Department of Biological & Environmental Chemistry, Kindai University², Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus²) FUJII, Masayuki¹; SHIOHAMA, Yasuo²; SONOKAWA, Maika¹; HISANO, Masaaki¹; Kotake, Yojiro¹

2012 年に RISC の中核をなすヒトアルゴノート 2 (hAgo2) の X 線結晶構造が解明され、合理的な分子デザインに基づく化学修飾が可能になった¹⁾。その中で、リン酸化されたガイド鎖 5'-末端が hAgo2 の MID ドメインのカチオンポケットに取り込まれて安定化されていることが明らかとなった。

本研究では、センス鎖、アンチセンス鎖の 5'-末端に 5'-O-メチル-5'-デオキシチミジン(X) および 5'-アミノ-5'-デオキシチミジン(Z)をそれぞれ導入した siRNA を合成し、そのサイレンシング効果への影響を評価した。



sense strand

RNA1; 5'-UACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'
RNA3; 5'-TACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'
RNA5; 5'-XACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'
RNA7; 5'-ZACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'

antisense strand

RNA2; 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'
RNA4; 5'-TCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'
RNA6; 5'-XCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'
RNA8; 5'-ZCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'

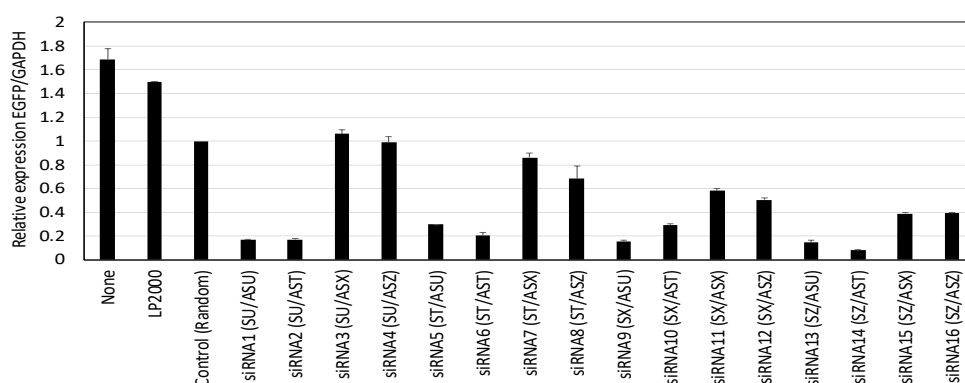


Figure 1. Silencing EGFP mRNA by 5'-Modified siRNA
[siRNA] = 100 nM, transfected by Lipofectamine 2000 HeLa(5 x 10⁴ cells /well, 10 % FCS/MEM), 5% CO₂, 37°C, 24h

5'-末端のアミノ基やメトキシ基は DICER/TRBP の結合、RISC ローディングコンプレックスの形成、RISC への積み込み過程で、siRNA の非対称性認識および鎖選択に大きく影響し、一方の 5'-末端を X または Z に置換した siRNA ではもう一方の鎖がガイド鎖として選択される確率が大きく向上した。同時に、5'- X または Z は hAgo2 の MID ドメインカチオンポケット中のアミノ酸残基による安定化を受けないため、1 本鎖化後に RISC を不安定化し、サイレンシング効果を低下させた。その結果、アンチセンス鎖 5'-末端を X または Z に置換した siRNA3, 4 はセンス鎖 U が 100%ガイド鎖として選択され、全くサイレンシング効果を示さなかった。したがって、センス鎖 5'-末端に X または Z を導入することにより、センス鎖がガイド鎖として選択されず、センス鎖の off-target 効果は回避できると言える。

1) MacRae, IJ. *et al.*, The crystal structure of human argonaute2. *Science*, 2012, 336 (6084) 1037–1040.

トポロジー依存的なリガンド結合でグアニン四重鎖の DNA 複製を制御する

○高橋 俊太郎¹・建石 寿枝¹・佐藤 しのぶ²・竹中 繁織²・PLAVEC Janez³・杉本 直己^{1,4} (¹甲南大 FIBER、²九工大院物質工、³Slovenian NMR Centre、⁴甲南大 FIRST)

Regulation of DNA replication by topology-dependent ligand binding on guanine quadruplexes (¹Konan University, FIBER, ²Kyushu Institute of Technology, ³Slovenian NMR Centre, ⁴Konan University, FIRST) **TAKAHASHI, Shuntaro¹; TATEISHI-KARIMATA, Hisae¹; SATO, Shinobu²; TAKENAKA Shigeori²; PLAVEC, Janez³; SUGIMOTO Naoki^{1,4}**

核酸の機能メカニズムの解明や、核酸を用いた機能性マテリアルの設計には、熱力学に基づいた物理化学的アプローチが非常に有効である (1)。核酸構造の中でも非二重らせん構造は、遺伝子発現を調節する働きを有することから、細胞内での非二重らせん構造形成の化学的制御に注目が集まっている (2)。例えば、非二重らせん構造の一つであるグアニン四重鎖 (G4) 構造に結合して安定化させ、DNA 複製を制御するリガンドは、がんや神経変性疾患の治療薬として期待されている。G4 構造にはいくつかのトポロジーがあり (Figure 1)、その役割として遺伝子発現調節への影響が注目されている (3, 4)。そのため、特定のトポロジーを有する G4 に結合するリガンドは、特定の遺伝子の複製を優先的に制御する能力を持つと考えられる。本研究では、特定のトポロジーを有する G4 配列に結合するリガンドによる、DNA 複製制御を定量的に解析した。ヒトゲノム由来の G4 DNA に対し、化学修飾の異なる様々なナフタレンジイミド誘導体を用いた結果、G4 構造の安定化は同程度でも複製阻害効果が異なる結果が得られた。NMR 解析により、ナフタレンジイミド誘導体は G4 の G カルテットに結合するだけでなく、リガンドとヒトゲノム由来のハイブリッド G4 型のループ領域との間に付加的な相互作用が観察された。したがって、リガンドによる G4 DNA 複製の抑制効果は構造安定性に依存するだけでなく、G4 とリガンド分子の相互作用様式にも依存することが明らかになった。本研究では、複製速度と G4 の安定性の相関関係を定量的に評価するために、「トポロジー依存的な複製反応の定量的研究 (Quantitative Study of Topology-dependent Replication; QSTR)」と呼ぶ独自の手法を開発した。QSTR によって、トポロジー依存的な結合に基づいて複製反応を制御する、様々なリガンド分子を系統的に分類できることが見出された。本解析法を用いることで、遺伝子発現の G4 トポロジー依存的に制御できる新しい分子の設計を促進することが期待される。

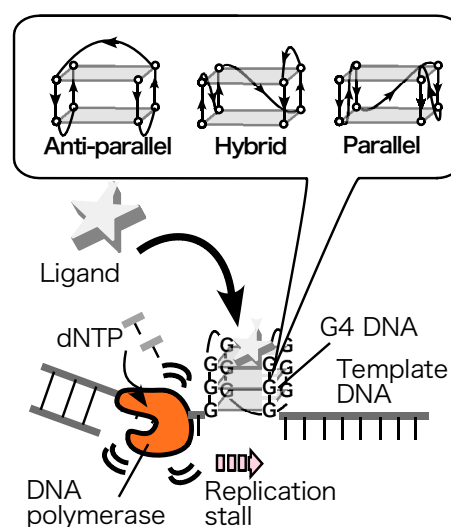


Figure 1 Schematic illustration of replication of G4 DNA having different topologies controlled by the binding of a G4 ligand.

[参考文献]

- (1) S. Takahashi and N. Sugimoto, *Chem. Soc. Rev.*, 49, 8393 (2020).
- (2) S. Takahashi and N. Sugimoto, *Acc. Chem. Res.*, 54, 2110 (2021).
- (3) S. Takahashi, J. A. Brazier, and N. Sugimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114, 9605 (2017).
- (4) S. Takahashi, K. T. Kim, P. Podbevsek, J. Plavec, B. H. Kim, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 140, 5774 (2018).

SARS-CoV-2 の S1 タンパク質 RBD 結合アプタマーの

イノシン導入効果の解析

○林 和佳奈¹・塚越 かおり¹・池袋 一典¹ (¹東京農工大院工)

Analysis of inosine introduced aptamer against SARS-CoV-2 S1 protein RBD (¹Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology) HAYASHI, Wakana¹; TSUKAKOSHI, Kaori,¹; IKEBUKURO, Kazunori¹

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は SARS-CoV-2 というコロナウイルスの一種が引き起こす肺炎を伴う感染症であり、世界中に影響を与えている。このような感染症の流行を抑止するためには、迅速で正確な診断に基づく患者の隔離が有効であり、費用対効果の高い迅速で正確な診断技術の開発が求められている[1]。アプタマーは標的に対して高い結合親和性と特異性を有するため、検出への応用が期待される分子認識素子である。そこで当研究室では SARS-CoV-2 の検出を目的として、コロナウイルスの主要な抗原として知られているウイルス表面上に露出したスパイクタンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) に結合するアプタマーの獲得を試みた。本研究ではアプタマーの標的に対する結合親和性の向上を目指し、アデニンの 6 位の炭素が脱アミノ化されている第五の塩基であるイノシンを導入することで、DNA とタンパク質間の疎水性相互作用の増強を期待した。

当研究室ではこれまでに、Yanling Song らによって獲得された RBD 標的アプタマー「CoV2-RBD-4C」[2]の二次構造に着目した配列改良によって、結合能が向上した RBD-46 というアプタマーを獲得している。そこでまず、RBD-46 を複数の構造単位を設定し、その構造単位ごとに配列をシャッフルして新たな配列を複数作成し、これらを合成して、アプタマーブロッティングによって結合能を評価した。その結果、結合能の向上がわずかに確認できた 4 配列をイノシン導入のための親鎖とした。これら 4 配列と RBD-46 に対してイノシンをランダムに導入した 40 配列を作成し、20 配列ずつアプタマーブロッティングで結合能を評価した。その結果、多くの配列で親配列である RBD-46 と比較して結合シグナルの増強が確認された (Fig.1 yellow and blue)。

続いてさらなる結合親和性の向上を目的として、前述したように、これまでの評価で得られた結合能の向上が示唆された配列である CoV2-1R-02, CoV2-2R-01, CoV2-3R-02 を親配列として複数の構造単位を設定し、その構造単位ごとに配列をシャッフルして新たな配列を複数作成し、突然変異としてイノシンを導入することで新たな 20 配列を作成した。これらを合成してアプタマーブロッティングにより結合能を評価した結果、いくつかの配列で結合シグナルの増強が観察された (Fig.1 green)。以上の結果から、今後もイノシンを導入したアプタマーの改良を進めることで更なる結合能の増強が期待できると考える。

続いてさらなる結合親和性の向上を目的として、前述したように、これまでの評価で得られた結合能の向上が示唆された配列である CoV2-1R-02, CoV2-2R-01, CoV2-3R-02 を親配列として複数の構造単位を設定し、その構造単位ごとに配列をシャッフルして新たな配列を複数作成し、突然変異としてイノシンを導入することで新たな 20 配列を作成した。これらを合成してアプタマーブロッティングにより結合能を評価した結果、いくつかの配列で結合シグナルの増強が観察された (Fig.1 green)。以上の結果から、今後もイノシンを導入したアプタマーの改良を進めることで更なる結合能の増強が期待できると考える。

- [1] Bruce J. Tromberg, P.D.; Tara A. Schwetz, P.D.; Eliseo J. Pérez-Stable, M.D.; Richard J. Hodes, M.D.; Richard P. Woychik, P.D.; Rick A. Bright, P.D.; Rachael L. Fleurence, P.D.; Francis S. Collins, M.D., P.D., *N Engl J Med*, **383**, 1071 (2020)
- [2] Song, Y.; Song, J.; Wei, X.; Huang, M.; Sun, M.; Zhu, L.; Lin, B.; Shen, H.; Zhu, Z.; Yang, C., *Anal. Chem.*, **92**, 9895 (2020)

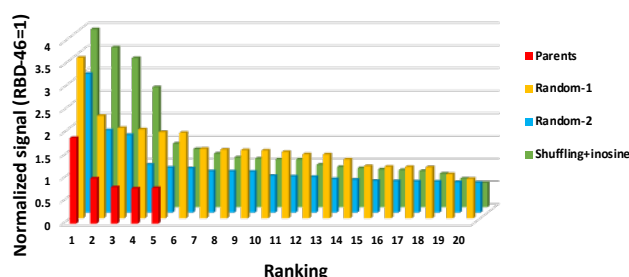


Fig.1 Binding ability of aptamer candidates against RBD. Dot intensity of RBD immobilized region was calculated using ImageJ and normalized as "the dot intensity of RBD-46 = 1". Ranking indicates that the sequences are ranked in order of the intensity of the normalized signal.

ホールトラップ核酸塩基を用いた分子混雑環境における DNA 内電子移動効率の評価

○武富祐樹・山口湧暉・櫻井俊亮・田仲真紀子（電通大院情報）

Evaluation of electron transfer through DNA crowded conditions under using hole-trapping nucleobases(The University of Electro-Communications); Taketomi, Yuki; Yamaguchi, Yuki; Sakurai, Shunsuke; Tanaka, Makiko

DNA 内では核酸塩基対間の π - π スタッキングを介した電子移動が起こることが知られている。DNA 内電子移動は生体内の酵素間のシグナル伝達に関与している可能性など、生体内での働きも着目されている。DNA 内の電子移動特性はこれまで主に希薄水溶液中の DNA を用いて研究されてきた。しかし、DNA が機能する生体内は実際には分子混雑環境にあり、DNA が凝縮構造をとることもある。当研究グループのこれまでの研究により、希薄水溶液中と共存分子が高密度で存在する条件では、DNA 内電子移動の挙動は大きく異なることが確認されている¹⁾。また、高濃度のポリマーと塩によって形成される液晶 Ψ 型 DNA 内では、電子移動によって誘発されるグアニン塩基の損傷の効率が大幅に増大することが明らかになった²⁾。しかし、このような電子移動特性の研究は未だ未解明な点が多く、詳細についてはさらなる検討が必要である。電子移動酸化の生成物として損傷グアニンがあるが、一電子酸化を受けたグアニンが生成物を与える反応は比較的遅く、さらに段階的に酸化損傷物を生成してしまうことから、グアニンの損傷量から正確な電子移動効率を見積もることはできない。

そこで本研究では、シクロプロパン環を有するグアニン（以下、 $^{\text{CP}}$ G）を、DNA 内のホール捕捉塩基として使用した³⁾。 $^{\text{CP}}$ G は酸化損傷物がグアニン上に発生すると、非常に速い開環反応をおこしてホールを捉え、ホール移動を強制的に止めることができるため、 $^{\text{CP}}$ G の分解量は DNA 内の電子移動効率の指標となる。液晶 Ψ 型 DNA と均一な希薄水溶液中の B 型 DNA を比較し、DNA 内電子移動効率を調べた。 $^{\text{CP}}$ G を含む DNA 鎖は、前駆体を含むオリゴヌクレオチドから固相合成し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による 2 回の精製後、マスマスペクトル測定及び HPLC 分析によって同定した。相補鎖には光増感剤を含むオリゴヌクレオチドを使用し二本鎖（42mer）とし、ポリエチレングリコール（PEG1540）を添加することで分子混雑環境を作製した。DNA の構造は CD スペクトルや UV-vis 吸収スペクトル、共焦点蛍光顕微鏡によって確認した。PEG 濃度の異なる DNA 溶液に光照射を行い、酵素分解処理後、HPLC によって核酸塩基の損傷量を定量した。光照射後の $^{\text{CP}}$ G の損傷率を Fig. 1a に示す。PEG 濃度の上昇に伴い、 $^{\text{CP}}$ G の損傷率が増加することがわかった。また、PEG1540 40wt%、NaCl 100mM を含む条件では、DNA は Ψ 型の液晶を形成し（Fig. 2b）、凝集のない条件よりも $^{\text{CP}}$ G の損傷率を高める結果となった。分子混雑環境での誘電率の変化および、液晶状態での DNA 間のスタッキングが高効率の DNA 内電子移動を誘発したことが考えられる。

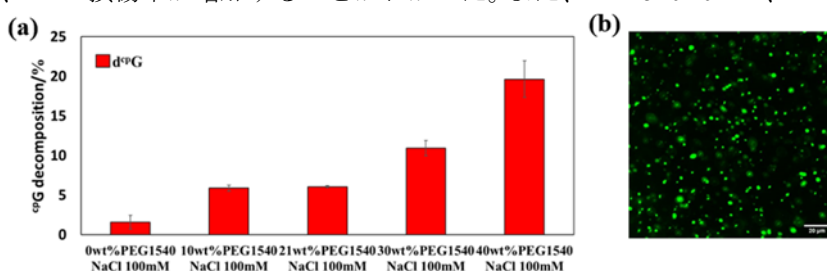


Fig. 1 (a) $^{\text{CP}}$ G decomposition percentages of pyrene-modified oligonucleotides (b) Fluorescence images of liquid crystalline Ψ -DNA with intercalated SYBR Green I (scale bar 20 μm)

- 1) M. Tanaka, T. Matsumoto, H. Iida, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 6695.
- 2) S. Sakurai, M. Esumi and M. Tanaka, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 7695.
- 3) K. Nakatani, C. Dohno and I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9681.

DNA 2 本鎖に光架橋可能な人工ペプチド開発

○内藤大暉・三原純一・QIU Zhiyong・中村重孝・藤本健造（北陸先端大先端科学）

Development of artificial peptides capable of photo-cross-linking to double-stranded DNA (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and technology) NAITO, Hiroki; MIHARA, Junichi; QIU, Zhiyong; NAKAMURA, Shigetaka; FUJIMOTO, Kenzo

近年の核酸医薬研究では、生体内に存在する mRNA に対して作用するアンチセンス法や RNAi 法などが報告されている。しかし標的 mRNA の翻訳をブロックしても、対応する遺伝子から常に mRNA が転写されるため、RNA を標的とした際には持続的な治療が必要となる。一方、ゲノム DNA を標的とした遺伝子発現抑制では、一度の治療で効率的かつ長期間の遺伝子発現抑制が可能である¹。しかし、ゲノム DNA は生体内において二本鎖状態で存在しており、ヒストンに巻きつき、クロマチン構造を形成しているため、核酸医薬の標的とした際には、効率的にゲノム DNA にアクセスし、ハイブリダイゼーションする方法が求められる。これまで triplex forming oligonucleotide(TFO)² や double duple invasion(DDI)法³などが報告されているが、標的にできる配列の制限や効率の面で課題も多い。

当研究室では 3-シアノビニルカルバゾール骨格を有する ^{CNV}K や ^{CNV}D などの光応答性人工核酸を含む DNA が数秒の光照射により相補的な DNA もしくは RNA のピリミジン塩基と光架橋できることを報告している。これまで細胞内アンチセンス効果の光制御や好感度検出に成功している。しかし、この ^{CNV}K を含むオリゴ DNA を用いた DNA 二本鎖への光架橋を評価したが、高効率で光架橋することは難しい。一方、生体内ではゲノム DNA に対しては酵素が作用しており、複製や転写を行っている。これはタンパク質がゲノム DNA にアクセスできることを示している。そこで、これらタンパク質に核酸に対する光架橋能を付与できれば、二本鎖 DNA に対して光架橋し、転写を阻害できるのではないかと考えた。

本研究では核酸に対して光架橋可能な光応答性アミノ酸として 3-cyanovinylcarbazole amino acid(^{CNV}A)を合成した。このアミノ酸を核酸結合性の GCN4 peptide の部分配列(Ac-DPAALKRARN TEAARR^{CNV}A RARKLQGCG-CONH₂)に組み込み、CRE14 DNA との光架橋を評価した。その結果、DNA 二本鎖と光架橋性ペプチドの光架橋反応が確認されたので報告する⁴。

-
- 1) D. Praseuth, et.al., *BBA - Gene Structure and Expression*, **1999**, 1489, 181.
 - 2) Frank-Kamenetskii MD, et.al., *Annu Rev Biochem*, **1995**, 64, 65 - 95
 - 3) Jesper Lohse, et.al., *PNAS*, **1999**, 96, 11804 - 11808
 - 4) Zhiyong Qiu, et.al., *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2019**, 17, 6277 - 6283

末端に架橋構造を有する DNA を鋳型とした PCR 解析

○平野佑樹・WANG, Chen・中村重孝・藤本健造 (北陸先端大先端科学)

PCR analysis using DNA having cross-linking at terminal site as template (School of Advanced Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology) HIRANO, Yuki; WANG, Chen; NAKAMURA, Shigetaka; FUJIMOTO, Kenzo

昨今の新型コロナウイルスの流行に伴い、「PCR」という言葉を耳にすることが多くなっている。PCR(Polymerase chain reaction)とはごく微量の DNA から目的となる遺伝子断片を増幅させる技術であり、分子生物学において最も知られている技術の 1 つである。ヒトのゲノムのような巨大な DNA 分子の中から特定の DNA 断片だけを短時間に正確に大量増幅でき、酵素を用いた遺伝子操作法の中で最も使用されている手法である。この PCR を用いた創薬研究の 1 つに DNA Encoded Library(DEL)がある。DEL は DNA でラベルされた低分子化合物ライブラリーからヒット化合物をスクリーニングし、PCR と配列解析技術を用いた High-Throughput な手法である。しかし、DNA タグにはライブラリー構築過程でも乖離しない(誤解析を防ぐ)、高い安定性が求められる。そのため、DNA をリンカーで繋げた DNA タグが報告されているが、PCR 効率に悪影響を与えるため、より最適な DNA タグが求められている。

本研究室ではこれまでに光応答性人工核酸を用いた DNA 操作法を確立しており、それらを用いた様々なアプリケーションを報告している。一例として、本研究室で開発された光応答性人工核酸 N³-methyl-5-cyanovinyldeoxyuridine(MCVU)を利用して、強い熱安定性及び酵素安定性を有する DNA end capping 構造のようなユニークな構造を有する DNA が報告されている。また、光可逆的操作が可能な 3-cyanovinylcarbazol(CNVK)なども報告している。CNVK を含むオリゴ DNA は 366 nm の光照射により相補鎖中のピリミジン塩基と光架橋し、その後、312nm の光照射を行うことにより光開裂する。そのため標的核酸の高感度検出や生体内でのアンチセンス効果の光制御などに利用されている。本研究では、PCR を阻害しない DNA タグの開発を目指し、可逆的 DNA 光架橋反応を用いた DNA end capping 構造を有する DNA 断片を作成し、ligation 反応及び PCR に与える影響を調べた。

- 1) Y. Yoshimura and K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3227.
- 2) S. Brenner, R. A. Lerner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1992**, 89, 5381.
- 3) S. Nakamura, H. Hashimoto, S. Kobayashi, K. Fujimoto, *ChemBioChem*, **2017**, 18, 1984.
- 4) S. Nakamura, K. Fujimoto, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2014**, 89, 1086.
- 5) Y. Yoshimura, H. Okada, K. Fujimoto, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 1523.

キノリニウム型蛍光色素の合成および環境応答性

大庭亨¹・菅原亜季¹・六本木誠²・為末真吾¹ (¹宇都宮大院工農総合科学専攻、
²宇都宮大先端計測分析部門)

Synthesis and environment sensitivity of novel quinolinium dyes (Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya University¹, Advanced Instrumental Analysis Department, Utsunomiya University²)
 OBA, Toru¹; SUGAWARA, Aki¹; ROPPONGI, Makoto²; TAMESUE, Shingo¹

脳の高次機能の解明のために、多数の神経細胞の活動を同時に、高い時間分解能で測定できる膜電位感受性色素 (VSD) の開発が求められている。我々はその候補として、キノリンを電子アクセプターとした新規な分子内電荷移動型蛍光色素を合成し、その電位応答を報告してきた。本研究では、より電子アクセプター性を高めたキノリニウム部位を持つ新規な蛍光プローブを合成し、その環境応答性を検討することを目的とした (Figure 1)。

Pfizer キノリン合成をかき反応として 5-ブロモキノリン誘導体を合成し、続いて 4-エチニル-*N,N*-ジメチルアニリンとの菌頭カップリングから **1** を得た (Figure 2)。さらに、キノリン環の *N*-オキシド化によってキノリニウム誘導体 **2** を得た。これらの色素を 1 wt% SDS 水溶液中に分散し、電解質 (10 wt% Na₂HPO₄ aq.) を滴下したところ、**1**、**2** ともにやや短波長シフトしながら蛍光強度が増加した (Figure 3)。**2** の蛍光強度の増加率 (6.4 倍) は、**1** や別途合成した **3**、市販の VSD (**4**) のいずれよりも大きく、**2** はミセル表面の電気的環境に強く応答することが示唆された。

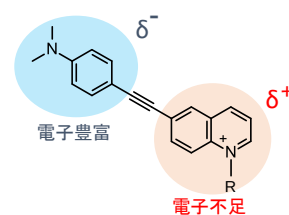


Figure 1. 新規なキノリニウム型蛍光色素の基本構造.

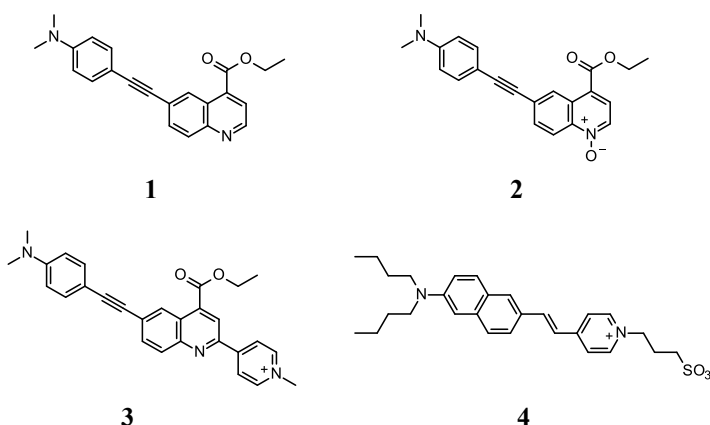


Figure 2. 各化合物の構造.

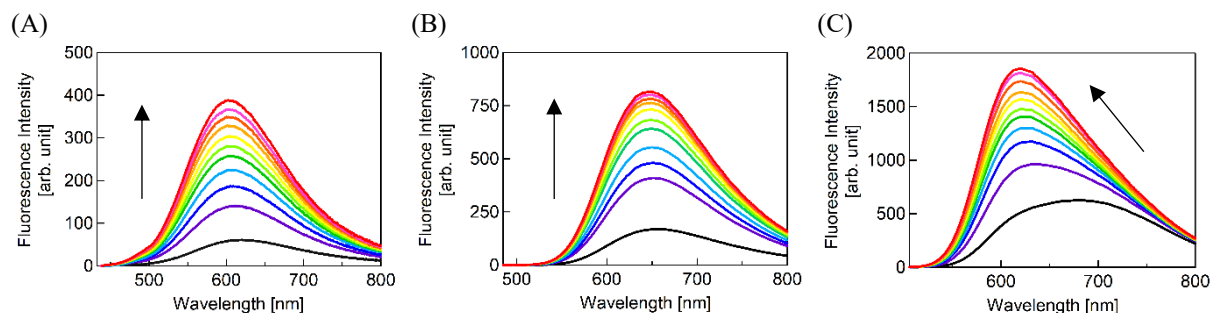


Figure 3. 各色素の 1 wt% SDS 水溶液に 10 wt% Na₂HPO₄ aq. を添加した時の蛍光発光スペクトル変化. (A) 化合物 **2**, λ_{ex} 423 nm; (B) 化合物 **3**, λ_{ex} 475 nm; (C) 化合物 **4**, λ_{ex} 496 nm. いずれも色素濃度は 10 μM, Na₂HPO₄ 濃度は 0.5 wt%→3.3 wt%, 室温で測定.

エバネッセント光励起散乱による液滴中のリゾチーム凝集化分析

○車田颯人¹・鯉淵翔¹・田中大輔²・尾形慎³・植英規⁴・若松孝¹（¹茨城高専、
²大分高専、³福島大学、⁴福島高専）

Analysis for Lysozyme Aggregation in Droplet by Evanescent Light Excitation Scattering (Ibaraki KOSEN¹, Oita KOSEN², Fukushima University³, Fukushima KOSEN⁴) KURUMADA, Hayato¹; KOIBUCHI, Kakeru¹; TANAKA, Daisuke²; OGATA, Makoto³; UE, Hidenori⁴; WAKAMATSU, Takashi¹

医薬品や機能性食品の研究開発では、タンパク質の構造解析が重要であるが、必要となるタンパク質の結晶作製は、試行錯誤で行われており、ボトルネックである。タンパク質の結晶化では、液滴によるハンギングドロップ蒸気拡散法が広く用いられている。本研究では、液滴中における結晶化前のタンパク質凝集化をリアルタイムで分析するために、全反射エバネッセント光励起の動的散乱(DLS)測定システムを構築し、代表的なモデルタンパク質のリゾチームの凝集化を分析した。

正三角柱ガラスプリズムにニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)の結晶化溶液の液滴(〜30 μ L)を付着させ、プリズム/水の全反射臨界面角(61.3°)以上の入射角で細いレーザ光(ビーム径約1 mm ϕ , 波長532 nm, 出力25 mW)を入射させる(Fig. 1)。液滴中に発生するエバネッセント光によるタンパク質凝集体の微弱な散乱光を液滴側から二重絞りを介して光電子増倍管(PMT)で検出した。エバネッセント光の液中への侵入長は、波長程度であり、界面近傍領域の凝集体からの散乱光を高感度に測定できる。液滴サンプルをガラスセルで封止して、液滴の蒸発を防いだ。今回はリザーバーなしで測定した。オシロスコープで測定したDLS信号を高速フーリエ変換(FFT)し、周波数パワースペクトルの経時変化を評価した。ここでは、酢酸-酢酸Na(pH 4.53)バッファーに溶解した30 mg/mLのHEWLに対し、結晶化剤NaClの濃度2%と4%(wt/v)についてHEWLの凝集化を比較した。なお、HEWL溶液に結晶化剤の添加・混合後直ぐに、プリズムに液滴サンプルを付着させ、DLS測定を行った。DLSデータの解析では、測定データの間隔を30秒とし、20個のデータ群を用いた。

NaClの初期濃度4%(wt/v)のサンプル液滴のFFTパワースペクトルは、経過時間と共に10 Hz以下の低周波で大きくなった(Fig.2)。

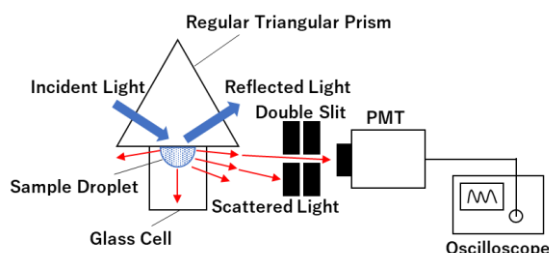


Fig.1 Measurement system for evanescent light excitation scattering.

これは添加NaClの凝集効果と溶媒蒸発による液滴濃度の上昇の結果、形成HEWL凝集体のサイズが大きくなり、ブラウン運動が穏やかになったことによる。一方、NaCl初期濃度2%(wt/v)の液滴サンプルでも同様に、時間経過に伴い低周波域でパワースペクトルが顕著になったが、4%(wt/v)NaClに比べ、この現象は約20分遅れて発生した。

構築したエバネッセント光励起の動的散乱(DLS)測定システムは、タンパク質液滴を使用するハンギングドロップ蒸気拡散法における結晶化前のタンパク質凝集化分析に適する。

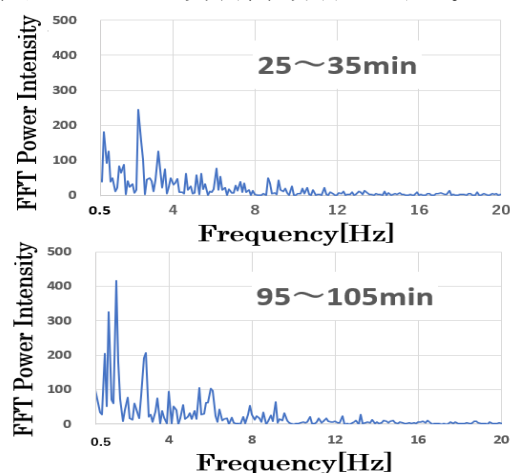


Fig.2 FFT Power spectra for HEWL solution with 4%(wt/v) NaCl.

抗体を迅速に高性能蛍光免疫センサー化可能なプローブタンパク質 Coiled Q-probe による各種抗原の検出

○笹本佳那¹・安田貴信¹・北口哲也²・上田 宏² (¹東工大院生命理工、²東工大研究院化生研)

A probe protein Coiled Q-probe that rapidly turns antibodies into a high-performance fluorescent immunosensor for various antigens (¹Graduate School of Life Science and Technology, and ²Laboratory for Chemistry and Life Science, Tokyo Institute of Technology) SASAMOTO, Kana¹; YASUDA, Takanobu¹; KITAGUCHI, Tetsuya²; UEDA, Hiroshi²

背景 臨床診断や環境分析において微量分子の迅速かつ簡便な検出が求められている。抗体を部位特異的に蛍光色素修飾した蛍光免疫センサー Quecnhbody (Q-body) は抗体内の Trp 残基により蛍光消光 (クエンチ) し、抗原濃度依存的に蛍光が回復 (脱クエンチ) するため、迅速・簡便に抗原を検出できる¹⁾。一方、Q-body に適した抗体の選抜、蛍光色素-抗体間のリンカーの最適化には遺伝子操作が必要であり、新規 Q-body 構築には時間と労力が必要だった。当研究室では以前、抗体結合タンパク質 ProteinM (PM) のC末端側を蛍光色素修飾した Quenchprobe (Q-probe) を開発した²⁾。Q-probe は抗体と混合するだけで抗体を Q-body 化可能であるため、遺伝子操作なしに迅速に Q-body に適した抗体を選抜可能である。一方で Q-probe の脱クエンチ効率は2倍程度であり、Q-probe を Q-body に適した抗体の選抜ではなく、任意の抗体の蛍光免疫センサーとして使用するには蛍光応答が少ないという課題があった。

目的 本研究の目的は Q-probe の蛍光応答の向上である。そのために E4(EIAALEK)₄ ペプチドと K4 (KIAALKE)₄ ペプチドのコイルドコイル構造形成³⁾を利用した PM の蛍光色素標識法による迅速なリンカー最適化法の開発を試みた。

方法 Protein M (熱安定化変異体) のC末端に3種類の長さの異なるリンカーを介して E4 配列を付加した Protein M を発現、精製した (PM-E4)。これらに対して3種類の長さのリンカーを介して蛍光色素が結合した K4 ペプチドを様々なペアで結合させ、多種類の Coiled Q-probe を作製した (Fig. 1)。これらに抗体を加え蛍光強度を測定しクエンチ効率を調べた後、抗原を添加し脱クエンチ効率を評価した。

結果・考察 数種類の Coiled Q-probe で抗オステオカルシン(BGP)抗体の Fab 断片を評価した結果、PM-E4 間、蛍光色素-K4 間両方のリンカーが長いペアで作製した Coiled Q-probe が最も高い脱クエンチ効率を示し、従来の Q-probe より応答を向上させることに成功した(1.9 倍→4.2 倍) (Fig. 2A)。一方抗コルチゾール(CS) IgG 抗体では長い PM-E4 間リンカーと短い蛍光色素-K4 間リンカーのペアで作製した Coiled Q-probe が最も高い脱クエンチ効率を示し、こちらも従来の Q-probe より応答を向上させることに成功した(2.2 倍→2.4 倍) (Fig. 2B)。以上のことから Coiled Q-probe を用いた迅速なリンカー最適化手法は Q-body における蛍光応答の向上に有用なことが示唆された。今後更なる PM-E4 間リンカー、蛍光色素-K4 間リンカーの最適化を行うことにより、より多くの抗体を蛍光免疫センサー化できると考えられる。

1) Abe, R. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **133** 17388-17394 (2011)

2) Dong, J. *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **165**, 112425 (2020)

3) J. R. Litowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 37272-37279 (2002)

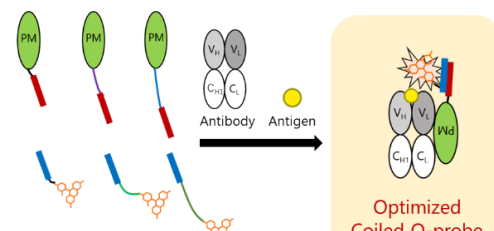


Fig 1. The strategy of rapid linker optimization

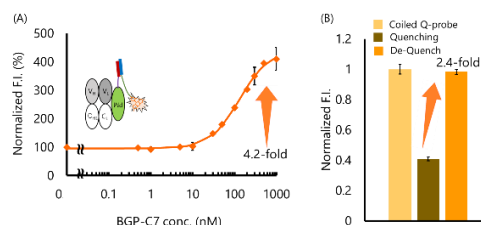


Fig. 2. (A) De-quenching of anti-BGP Fab by BGP-C7 epitope peptide (B) Quenching of anti-cortisol (CS) IgG and De-quenching by CS.

金属フタロシアニン類の凝集を利用したアクティベータブル光音響造影剤の開発

○野北康平・今泉直人・三木康嗣・大江浩一（京大院工）

Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing aggregation of metallo-phthalocyanines
(Graduate School of Engineering, Kyoto University) NOGITA, Kohei; IMAIZUMI, Naoto; MIKI, Koji; OHE, Kouichi

光音響（PA）イメージングは、生体内の深部組織の情報を高い分解能で可視化できる非侵襲的な手法として近年注目されている。金属フタロシアニン（MPc）類および金属ナフタロシアニン（MNc）類は光照射に対し安定な色素であり、吸収した近赤外光のエネルギーを効率的に熱エネルギーに変換することで強い PA 信号を発することができるため、PA イメージング用造影剤への応用が期待されている。本研究では、近赤外光照射に応答して PA 信号が増大する MPc、および癌の転移や血管新生に関わる酵素である MMP-2 に応答して PA 信号が増大する MNc を開発した。

軸配位子に平均分子量 2000 のポリエチレングリコール（PEG）を結合させた両親媒性 AIPc 誘導体 **AIPcPEG** (Figure 1a) は水中でベシクルを形成した。**AIPcPEG** のベシクルに近赤外光 ($\lambda = 730 \text{ nm}$) を照射すると **AIPcPEG** の軸配位子が切断され、水溶性を失った AIPc が凝集することにより、結果として PA 信号強度が増大した (Figure 1b)。

次に、プロテアーゼの一つである MMP-2 が切断するペプチド配列 PLGLAG を PEG と MNc の間に持つ両親媒性 AINc 誘導体 **AINc-pep-PEG** (Figure 1a) を合成した。MMP-2 を作用させると **AINc-pep-PEG** のペプチド鎖が切断されて軸配位子が短くなり、水溶性を失った AINc が凝集することで、PA 信号強度 PA_{680} (励起波長: 680 nm) が増大した。一方、この時 PA 信号強度 PA_{760} (励起波長: 760 nm) は減少した (Figure 1c)。さらに、MMP-2 が過剰発現した腫瘍細胞 HT-1080 を移植したマウスに **AINc-pep-PEG** を投与した後、腫瘍部位での PA 信号強度を測定した。投与後 1 時間で **AINc-pep-PEG** の各励起波長での PA 信号強度比 ($PA_{680, \text{vivo}}/PA_{760, \text{vivo}}$) は約 2.5 倍に増大し、6 時間後まで維持された (Figure 1d)。

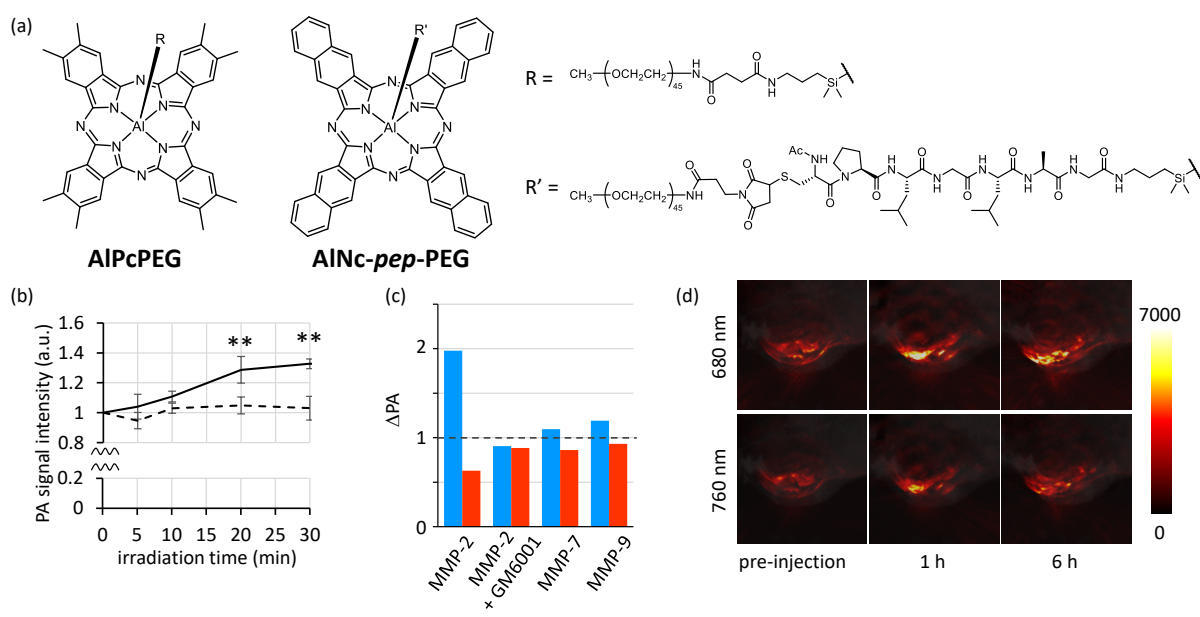


Figure 1. (a) Structure of **AIPcPEG** and **AINc-pep-PEG**. (b) Time-dependent PA signal intensity change of **AIPcPEG** under photoirradiation at 730 nm (For PA signal generation: $\lambda_{\text{ex}} = 680 \text{ nm}$). Vesicles (solid) or aggregates (dashed) of **AIPcPEG**. (c) PA signal intensity increment (ΔPA) of **AINc-pep-PEG** (30 μM , pH = 7.2) at 680 nm (blue) and 760 nm (red) after incubation with enzyme for 2 h. GM6001: inhibitor of MMP-2. (d) Representative *in vivo* PA images of HT-1080-bearing mice after *i.v.* injection of **AINc-pep-PEG**.

2 細胞間相互作用解析デバイスによる T 細胞の抗原認識活性評価および発現遺伝子解析

○井手大輝^{1,2}・齋藤真人^{1,2}・青枝大貴³・高松漂太⁴・Wilfred Villariza Espulgar^{1,2}・細川正人⁵・松永浩子⁵・鈴木直子⁵・有川浩司⁵・竹山春子^{5,6,7}・民谷栄一^{2,8} (1 阪大院工、2 産総研・阪大先端フォトバイオ、3 阪大微研、4 阪大院医、5 早大ナノライフ創新研、6 早大院先進理工、7 産総研-早大 CBBDOIL、8 阪大産研)

Single-cell level analysis of T cell antigen-recognition activity and expression genes by the microfluidic device for cell-cell interaction (Graduate School of Engineering, Osaka Univ.¹, AIST-Osaka Univ. PhotoBIO-OIL², Research Institute for Microbial Disease, Osaka Univ.³, Graduate School of Medicine, Osaka Univ.⁴, Research organization for nano and Life Innovation, Waseda Univ.⁵, Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda Univ.⁶, CBBDOIL, AIST-Waseda Univ.⁷, and The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka Univ.⁸) Hiroki Ide^{1,2}, Masato Saito^{1,2}, Taiki Aoshi³, Hyota Takamatsu⁴, Wilfred Villariza Espulgar^{1,2}, Masahito Hosokawa⁵, Hiroko Matsunaga⁵, Naoko Suzuki⁵, Koji Arikawa⁵, Haruko Takeyama^{5,6,7} and Eiichi Tamiya^{2,8}.

病原体の情報である抗原を提示する抗原提示細胞 (APC) と T 細胞受容体 (TCR) による抗原特異的な細胞間相互作用は、免疫応答を惹起する生体防御の要となっている。近年、T 細胞と APC の抗原特異性を応用したがん治療法が報告されており¹、新規治療法の開発に向けて T 細胞の解析が重要視されている。しかし、あらゆる抗原に対応するために T 細胞は各々で異なっており²、免疫応答を惹起する抗原特異的な T 細胞の検出手法は未だ確立されていない。そこで本研究では、独自に開発したマイクロ流体デバイスを用いて T 細胞/APC の細胞間相互作用について 1 細胞毎に解析した³。APC との相互作用に伴う T 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を 1 細胞毎に測定することで T 細胞活性を評価した。T 細胞/APC の相互作用解析後、デバイス中央部の開口部 ($\phi=5 \text{ mm}$) から任意の T 細胞を回収し遺伝子解析することで、T 細胞内 Ca^{2+} と遺伝子発現の相関性の紐づけを試みた。

フォトリソグラフィ技術によりサブミクロンオーダーでデバイスの設計製作し、生体適合性が高く自家蛍光の少ない PDMS を材料にスライドガラス上にデバイスを作製した。アレイ状に配置した微細構造部に APC を 1 細胞補足し、T 細胞を灌流させ APC に接触させることで T 細胞と APC の相互作用を促した。実験では、モデル系として一律な TCR を発現する遺伝子改変マウス及び野生型マウス由来の T 細胞、APC を用いて抗原特異／非特異ペアでの比較を行った。T 細胞が APC に接触した時点で相互作用が開始したと仮定し、 Ca^{2+} 蛍光インジケータである Fluo-4 により T 細胞内 Ca^{2+} 変化を経時的に蛍光測定した。得られた蛍光強度を正規化し、蛍光強度変化を指標に T 細胞活性を評価した。特異ペアの T 細胞では、持続的に高い蛍光強度が測定された一方、非特異ペアでは一時的な蛍光強度ピークを示すだけであった。T 細胞内 Ca^{2+} が免疫機能活性のメッセンジャーとして働く³ことを意味する結果と考えられる。相互作用測定から 3 時間のインキュベート後、マイクロマニピュレーターを用いてデバイスから任意の T 細胞を 1 細胞毎に回収し、RNA-Seq を行った。R/Bioconductor パッケージの edgeR により特異／非特異ペア間で発現変動遺伝子を検出解析したところ、TCR 抗原認識の下流における遺伝子群が確認された。以上より、デバイス上で生体同様の T 細胞/APC 相互作用が確認され、活性化 T 細胞における表現型と遺伝子型の相関性を紐づけ可能であることが示唆される結果を得た。

[1] A. Minervina, *et al.*, *Transpl. Int.*, 32, 1111-1123 (2019). [2] H. Ide, *et al.*, *Sens. Actuators B Chem.*, 330, 129306 (2021). [3] A. Casrouge, *et al.*, *J. Immunol.*, 164 (11), 5782-5787 (2000).

酸素発生型光合成生物のクロロフィル *b* の構造変換反応特性

○田中雅之・佐賀佳央（近畿大院総合理工）

Reaction Properties of Structural Conversion of Chlorophyll *b* in Oxygenic Photosynthetic Organisms

(Graduate School of Science and Engineering, Kindai University) TANAKA Masayuki; SAGA yoshitaka

酸素発生型光合成においてクロロフィルは光エネルギーを化学エネルギーに変えるための重要な色素である。特に、光化学系 I の反応中心タンパク質に存在するクロロフィルとその異性体であるクロロフィルエピマーからなるクロロフィル二量体（スペシャルペア）は初期電荷分離反応を担っている。このクロロフィルエピマーの生成メカニズムや生合成を触媒する酵素の存在が明らかになっていない。クロロフィルの環骨格に直結した置換基はクロロフィルの化学反応特性に影響を及ぼすことが明らかになっていることから、Chl *a*、*b*、*d* (Fig. 1) のエピマー化反応を比較分析し置換基効果の影響を明らかにすることを本研究の第一の目的とした。また、緑色植物で光エネルギーの捕捉と伝達を行う LHC II タンパク質に結合した状態の Chl *b* のホルミル基の還元反応特性とタンパク質への影響を調べることを第二の目的とした。

Chl *a*、*b*、*d* をそれぞれ *Spirulina*、ほうれん草、*Acaryochloris marina* から抽出し、トリエチルアミンを用いて 20 °C、ジエチルエーテル溶液中でエピマー化反応の経時変化を追跡した。トリエチルアミン濃度を 0.05 M から 0.3 M に変化させて分析を行った結果、どの濃度においても Chl *b* の反応速度が最も大きく Chl *a* の反応速度が最も小さいことが明らかになった (Fig. 2)。エピマー化反応では Chl 分子の 13² 位炭素に結合するプロトンが引き抜かれることで反応中間体としてエノラートアニオンが生成する。電子吸引性基であるホルミル基は、環全体の電子密度を低下させエピマー化反応中間体を安定化させる。これよりホルミル基を持つクロロフィルのエピマー化反応の反応速度は大きくなると考えられる。さらにホルミル基を持つ Chl *b* と Chl *d* のエピマー化反応速度の違いをハメットの σ 値を用いて検証すると、Chl 分子のエピマー化反応には 3 位と 7 位置換基の誘起効果の足し合わせがはたらき、それにより Chl *b* の反応速度は Chl *d* の反応速度よりも大きくなったと考えられる。

また、ほうれん草から単離し可溶化した LHC II タンパク質にテトラヒドロホウ酸ナトリウムを加えることによる LHC II に結合した状態の Chl *b* の側鎖の還元反応を試みた。

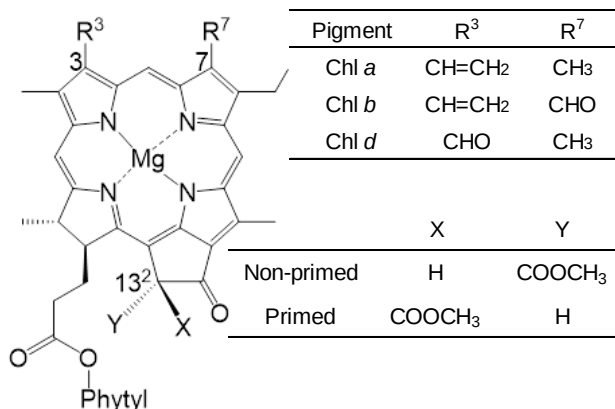


Fig. 1. Molecular structures of three chlorophyllous pigments used in this study.

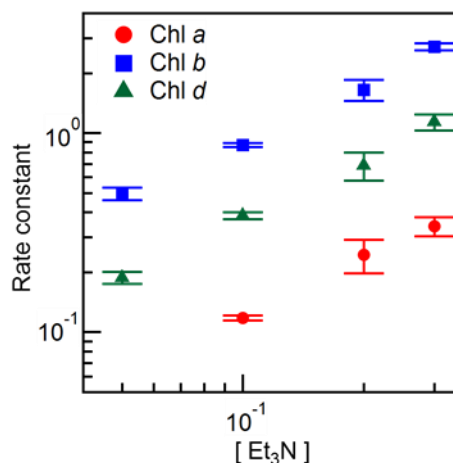


Fig. 2. The epimerization rate constants of three Chl pigments.

高いペルオキシダーゼ活性を示す二核非ヘム鉄アミドアニオン配位錯体の開発

○福井悠介・小寺政人・人見穰（同志社大院理工）

Development of Dinuclear Nonheme Carboxamidoiron(III) Complexes with High Peroxidase Activity
(Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) FUKUI, Yusuke; KODERA, Masahito; HITOMI, Yutaka

西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）は、過酸化水素（ H_2O_2 ）を酸化剤としてフェノール類をはじめとする様々な基質を一電子酸化するヘム酵素であり、電気化学センサー、免疫組織化学、ELISA など幅広い用途に用いられる。しかし、酵素である HRP は高温・酸性条件では不安定であり、その活性が実験結果に影響を及ぼす。ペルオキシダーゼ機能を備えた金属錯体やナノ粒子は、HRP の有する問題を解決し高い再現性、定量性を与える有用な試薬となると期待されている^[1]。これまでに我々は、アミドアニオン配位単核非ヘム鉄錯体（ $\text{Fe}^{\text{III}}\text{mpaq}$ ）が他の単核非ヘム鉄錯体よりも高いペルオキシダーゼ活性を示すことを報告している（Chart 1, left）^[2]。しかし、酵素である HRP と比べると、 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{mpaq}$ のペルオキシダーゼ活性は著しく低い。 $\text{Fe}^{\text{III}}\text{mpaq}$ は H_2O_2 と反応し、中間体として hydroperoxo 種を生成するのに対し、2 核鉄(III)錯体は、 μ -1,2-peroxo 種の様な過酸が架橋された 2 核鉄(III)中間体を生成することが出来るため、単核鉄(III)錯体と比べて安定なペルオキシド付加体形成が促進され H_2O_2 親和性が向上すると期待した。本研究では、2 つの $\text{H}\text{-mpaq}$ を長さの異なる 3 種類のメチレンリンカーで連結した二核化配位子とその鉄錯体 $\text{Fe}_2(\text{C}_n\text{mpaq}_2)$ ($n = 2, 3, \text{and } 4$) を合成した（Chart 1, right）。

二核鉄(III)錯体のペルオキシダーゼ活性は、ABTS を基質とし stopped-flow 装置を用いて評価した。ABTS の 1 電子酸化体である ABTS cation radical の有する 414 nm の吸収強度の増加を利用し初速度 v_0 (M sec^{-1}) を算出した。比較的高い濃度の ABTS を含む溶液を用いて、反応させる H_2O_2 濃度を変化させることで、 H_2O_2 親和性と活性種の生成速度を評価した。この条件では、律速段階は酸化活性種の生成であると考えられるため、初速度 v_0 は $v_0 = 2k_2[\text{H}_2\text{O}_2][\text{cat}]/([K_m + [\text{H}_2\text{O}_2]])$ で表される。ここで、 k_2 は酸化活性種の生成に関する速度定数、 K_m はミカエリス定数である。新規に合成した 2 核鉄(III)錯体はいずれも、 H_2O_2 との二次反応速度定数、 k_2/K_m が単核の $\text{Fe}^{\text{III}}\text{mpaq}$ よりも高いことが判明した。また、その反応性はリンカーの長さに強く依存し、 $\text{C3} > \text{C2} \approx \text{C4}$ の順であることが分かった（Fig. 1）。

また、 H_2O_2 との反応により生成する中間体を特定するために HEPES 緩衝液（2 mM, pH 7.2）中、4°C で $\text{Fe}_2(\text{C3mpaq}_2)$ 錯体と 20 当量の H_2O_2 を反応させ、電子吸収スペクトルの変化を追跡した。その結果、 H_2O_2 添加後、580 nm 付近の吸収の増大が観測され、新しい錯種が生成していることが示唆された。さらに CH_3CN 中、-40°C で 10 当量の H_2O_2 と反応させて、ESI-MS スペクトルを測定した結果、 $\text{Fe}_2(\text{C3mpaq}_2)$ 錯体の μ -1,2-peroxo 種（ $[\text{Fe}_2(\text{O})(\text{OO})(\text{C3mpaq}_2)] + \text{H}^+$ ）に相当する $m/z = 783$ に分子イオンピークが観測された。

[1] A. D. Ryabov, T. J. Collins, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 45, 15116.

[2] Y. Hitomi *et al.*, *Dalton Trans.* **2013**, 42, 12878.

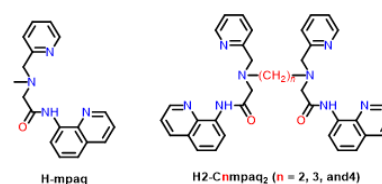


Chart 1. Structure of the ligands

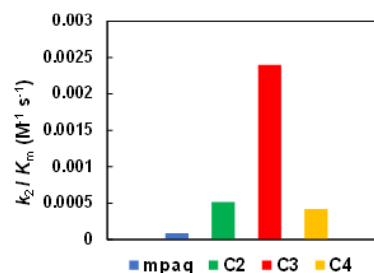


Figure 1. Second order rates for the reaction with hydrogen peroxide.

金属ハイブリッドチャネルによる膜透過能制御

○小牧航輔・越山友美（立命館大学院生）

Control of Membrane Permeability by Metal Hybrid Channels (Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University) KOMAKI, Kosuke; KOSHIYAMA, Tomomi

チャネルタンパク質による膜を介したイオン輸送は、細胞の浸透圧調節や神経細胞での電気シグナルの伝達など、細胞活動において重要な役割を果たしている。このような生体内において重要な機能を担うイオンチャネルの動作メカニズムの解明が進められる一方で、天然のイオンチャネルの機能を環状ペプチドや高分子などの合成分子で再現した人工チャネルが多数報告されている。人工チャネルの多くは、分子間の水素結合や π スタッキングなどにより脂質膜上で自己集積することでイオンチャネルを形成する。また、金属配位結合を利用した人工チャネルもいくつか報告されている。金属イオンと配位子の種類により配位構造が規定できるため、チャネル分子の自己集積の制御において配位結合は有用であると考えられる。当研究室では、金属配位を利用したイオンチャネルの透過能制御に取り組んでおり、先行研究で、天然のチャネル分子であるアンフォテリシン B (AmB) に金属結合部位として 2,2'-bipyridine (bpy) 配位子を修飾した bpy-AmB を設計・合成し (Fig 1)、銅イオンなどの金属イオンの配位に伴いイオンチャネルが形成することを見出している¹⁾。pH と金属イオンの種類により bpy-AmB チャネルの膜透過能を制御できることを報告したものの、イオン選択性等の詳細は分かっていない。そこで本研究では、アルカリ金属イオンの透過能について評価し、bpy-AmB チャネルのイオン透過能のさらなる解明を目指した。

bpy-AmB チャネルのアルカリ金属イオンの透過能の評価は、pH に依存して発光が変化する 8-Hydroxypyrene-1,3,6-Trisulfonate (HPTS) を内包したリポソーム (HPTS@Lipo) を用いて行った (Fig 2)。リン脂質は、疎水基部分の脂肪酸の構造が異なる 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine (POPC)、または 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) を用いた。HPTS@Lipo へ MOH (M = Li, Na, K, Rb, Cs)、bpy-AmB、 $M'Cl_2$ ($M' = Cu, Co, Ni$) を順次添加し、イオン透過に伴う HPTS 由来の 510 nm の蛍光強度の変化を時間追跡した。アルカリ金属イオンの種類により透過能に違いが見られた。また、添加する金属イオンによる透過能の違いも見られ、 Ni^{2+} と Co^{2+} と比べて Cu^{2+} は、より高い透過能を示した。現在、透過能の評価に加え、吸収スペクトルや CD スペクトル測定による bpy-AmB の膜中での集積状態変化の解析も進めている。

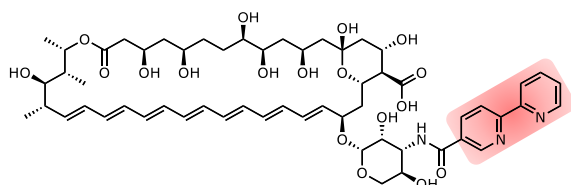


Fig.1 Structure of N-2,2'-bipyridinyl-Amphotericin B (bpy-AmB).

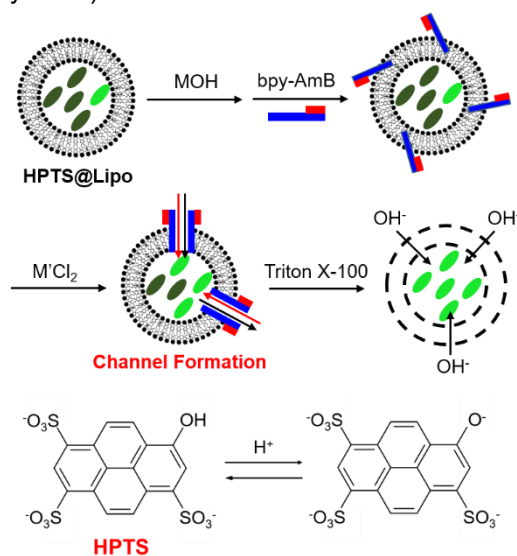


Fig.2 Schematic representation of the HPTS assay.

1) T. Koshiyama, Y. Inoue, S. Asada, K. Kawahara, S. Ide, K. Yasuhara, M. Ohba, *Chem. Commun.*, **57**, 2895-2898 (2021).

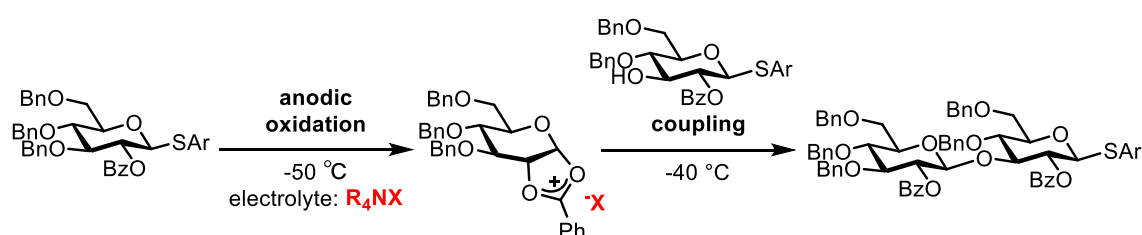
ジオキサレニウムイオン中間体を經由する電解グリコシル化反応における支持電解質の効果

○石坂優依¹・齋藤阿須香¹・小林丈泰²・渋谷章人³・野上敏材⁴ (¹鳥取大院持続性社会創生、²鳥取大工、³鳥取大院工、⁴鳥取大工 GSC センター)

Effect of supporting electrolyte on electrochemical glycosylation via dioxalenium ion intermediate (Graduate School of Sustainability Science, Tottori University¹, Faculty of Engineering, Tottori University² Graduate School of Engineering, Tottori University³ GSC center, Faculty of Engineering, Tottori University⁴) ISHISAKA, Yui¹; SAITO, Asuka¹; KOBAYASHI, Takehiro²; SHIBUYA, Akito³; NOKAMI, Toshiki¹

合成ターゲットの環状β-グルカン 13 糖は根粒菌に分類される *Bradyrhizobium* 属の細菌から産出され、抗酸化作用などの生物活性を有する¹⁾。これまでの研究で環状部分の 12 糖の半分の構造である鎖状β-グルカン 6 糖の合成を達成している²⁾。しかし、全合成の達成に向けて環状 12 糖に含まれるβ-1,3-グリコシド結合をより効率的に構築する必要がある。本研究ではβ-1,3-グリコシド結合の合成効率化を目指し、電解グリコシル化の反応条件最適化を支持電解質の検討を中心に検討した。

まず、支持電解質のカチオンをテトラブチルアンモニウムイオン (Bu₄N⁺) に固定して、アニオンの影響を調べた (entries 1-5)。その結果、Bu₄NOTf (entry 5) を用いた場合に最も高い収率で目的の 2 糖が得られた。Bu₄NOTf を支持電解質に用いて、電解酸化によって生じるグリコシル化反応の低温 NMR を測定したところ、グリコシル化反応中間体としてジオキサレニウムイオン中間体が確認された。従って、ジオキサレニウムイオン中間体の安定性に支持電解質のアニオンが大きく関与していると考えられる。続いて、カチオン構造の異なる 3 種類の支持電解質、Et₄NOTf、1-Butyl-3-methylimidazolium triflate [Bmim][OTf]、1-Butyl-1-methylpyrrolidinium triflate [Bmpy][OTf] を検討した (entries 6-8)。その結果、イオン液体である[Bmpy][OTf] (entry 8) を用いた際に、最も高い収率で目的の 2 糖が得られた。これは支持電解質のアニオンだけでなく、カチオン構造もジオキサレニウムイオン中間体の安定性あるいは反応性に寄与していることを示す興味深い結果である。ポスター発表では 3 糖以上のオリゴ糖合成の結果についても議論する。



entry	electrolyte	NMR yield	entry	electrolyte	NMR yield
1	Bu ₄ NBF ₄	59	5	Bu ₄ NOTf	89
2	Bu ₄ NOTs	0	6	Et ₄ NOTf	61
3	Bu ₄ NB(C ₆ F ₅) ₄	15	7	[Bmin][OTf]	70
4	Bu ₄ NClO ₄	39	8	[Bmpy][OTf]	97

1) Nair, A. V.; Gummadi, S. N.; Doble, M. *Biotechnol. Lett.* **2016**, 38, 1519.

2) Manmode, S.; Kato, M.; Ichianagi, T.; Nokami, T.; Itoh, T. *Asian J. Org. Chem.* **2018**, 7, 1802.

アルキル鎖を有するダンシルトリアルギニンペプチドによる細胞膜上のシアル酸の Turn-On 型蛍光イメージング

○岡崎瑞紀・稲葉央・松浦和則（鳥取大院工）

Turn-On fluorescent imaging of sialic acids on cell membrane with Dansyl-triarginine peptide bearing alkyl chain (Graduate School of Engineering, Tottori University) OKAZAKI, Mizuki; INABA, Hiroshi; MATSUURA, Kazunori

細胞膜表面に存在するシアル酸含有糖脂質ガングリオシド(GM1, GM2, GM3 など)は、細胞の分化、増殖、ウイルス感染などの様々な生命現象に関与している。ガングリオシドは悪性腫瘍において過剰に発現していることから、癌バイオマーカーとしても注目されている。これまで、ガングリオシドを蛍光イメージングするプローブとして、蛍光ラベルした抗 GM1 抗体やレクチンなどが報告されている¹⁾。また、ファージディスプレイ法によりガングリオシドを認識する人工ペプチドレセプターも開発されているが²⁾、解析が容易である「Turn-On 型」低分子プローブの開発は未発達である。我々は、ガングリオシドを認識する Turn-On 型低分子蛍光プローブとして、疎水性環境下で蛍光増大する Dansyl 基を有する Dansyl-(Arg)₃-OMe を開発し、ガングリオシドミセルに対して会合定数 10^5 M^{-1} オーダーで結合して蛍光強度が約 6 倍増大することを見出している。また、共焦点レーザー走査型顕微鏡(CLSM)観察により、ガングリオシド含有ジャイアントリポソーム(GL)の蛍光イメージングに成功している³⁾。しかし、ガングリオシドを発現しているヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞の蛍光イメージングでは、細胞内で蛍光像が確認されたことから、Dansyl-(Arg)₃-OMe が細胞内に取り込まれてしまうことが示唆された。

本研究では、細胞膜表面上のガングリオシドの特異的なイメージングを指向し、細胞膜表面と疎水性相互作用により結合する膜結合アンカーとしてアルキル鎖を導入した新規プローブ Dansyl-(Arg)₃-Lys(Octanoyl)-NH₂ を合成した(Fig 1a)。新規プローブによる HepG2 細胞上のガングリオシドの蛍光イメージングを検討したところ、HepG2 細胞表面で蛍光像を確認した(Fig 1b)。また、HepG2 細胞表面のシアル酸をシアリダーゼで除去した後に Dansyl-(Arg)₃-Lys(Octanoyl)-NH₂ を添加して CLSM 観察したところ、細胞膜表面上の蛍光像は減少した。さらに、シアル酸認識レクチン(WGA)を先に添加することにより、Dansyl-(Arg)₃-Lys(Octanoyl)-NH₂ のシアル酸への結合阻害が見られた。これらのことから、新規プローブ Dansyl-(Arg)₃-Lys(Octanoyl)-NH₂ は HepG2 細胞表面上のガングリオシドのシアル酸を認識していることが示唆された。

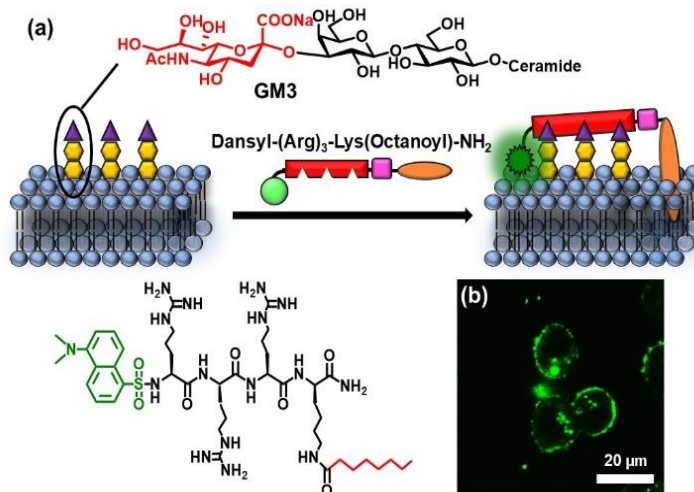


Fig 1. (a) Dansyl-(Arg)₃-Lys(Octanoyl)-NH₂ によるガングリオシドの蛍光イメージング (b) 20 μM Dansyl-(Arg)₃-Lys(Octanoyl)-NH₂ を添加した HepG2 細胞の CLSM 像 (Ex: 400 nm, Em: 524 nm)

- 1) J. Whited, X. Zhang, H. Nie, D. Wang, Y. Li, X. -L. Sun, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 2364 (2018)
- 2) T. Matsubara, M. Sumi, H. Kubota, T. Taki, Y. Okahata, T. Sato, *J. Med. Chem.*, **52**, 4247 (2009)
- 3) K. Matsuura, K. Hisamoto, T. Tanaka, R. Sakamoto, M. Okazaki, H. Inaba, *ACS Org. Inorg. Au*, accepted.

タンパク質の配向を制御した再構成型リポソームの作製

○野場 考策・吉本 将悟・堀 克敏（名大院工）

Creation of a reconstituted liposome with regulated protein orientation

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) NOBA, Kosaku; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

細胞膜の外葉と内葉では、それぞれ異なる膜タンパク質で構成されている。膜内外における膜タンパク質組成や配向性の違いは、細胞のシグナル伝達や膜分裂、細胞内外への分子輸送、ウイルスの形成や出芽などに必須の役割を果たしている。近年、このような複雑な細胞機能を合成生物学的に理解することを目的として、脂質膜上での膜タンパク質の配向性をボトムアップ的に制御したリポソームを構築する試みがなされている。このようなリポソームを調製する方法として、Water in Oil emulsion (W/O)界面通過法がよく知られている。この方法ではリポソームを構成する脂質に官能基を持つ脂質を混ぜ込むことで、脂質膜の外葉、内葉、またはその両方にタンパク質が配向した 30 μm 前後の巨大なリポソームを作ることができる¹⁾。ウイルスやバクテリアに近いサブミクロンサイズのリポソームを作製する方法としては Extruder などの流体デバイスを用いた方法²⁾

があるが、官能基を持つ脂質が膜の内外にランダムに配向してしまうため、タンパク質を膜内葉に配向させることは出来なかった。そこで我々は、膜内葉にタンパク質が配向したサブミクロンサイズのリポソーム創出を目的として、W/O 界面通過法と extruder 法の組み合わせを検討した。

タンパク質を膜内葉に配向させるため、Benzylguanine 基が修飾された脂質 (BG 脂質)を用いて SNAP タグ融合 GFP (SNAP-GFP)を封入したリポソームを W/O 界面通過法で作製し、extruder 法で 1 μm 以下に調製したところ、目的サイズのリポソームが得られた (図 1)。得られたリポソームの内部に SNAP-GFP が封入できているかを調べるため、リポソームをプロテイナーゼ K (ProK)で処理し、GFP の蛍光強度をプレートリーダーで測定した。その結果、本手法で作製したリポソームは ProK 処理の前後で蛍光強度がほとんど減少せず、SNAP-GFP がリポソーム内部に封入できていることが確認できた。続いて、封入した SNAP-GFP が BG 基と共有結合で連結しているかを調べるため、SDS-PAGE によりタンパク質を分子量に従って分離し、抗 GFP 抗体を用いた Western blotting で検出した。BG 脂質を含むリポソームに封入した SNAP-GFP は、BG 脂質を含まないリポソームに封入した SNAP-GFP よりも高分子量側にシグナルが検出され、BG 脂質と SNAP-GFP の間で共有結合が形成されていることが確認できた。これらの結果は、W/O 界面通過法と extruder 法の組み合わせにより、膜内葉にタンパク質が配向したサブミクロンサイズのリポソームが作製できることを示唆している。本手法は、ウイルスやバクテリアの脂質膜内葉のボトムアップ的再構成に応用できることが期待される。

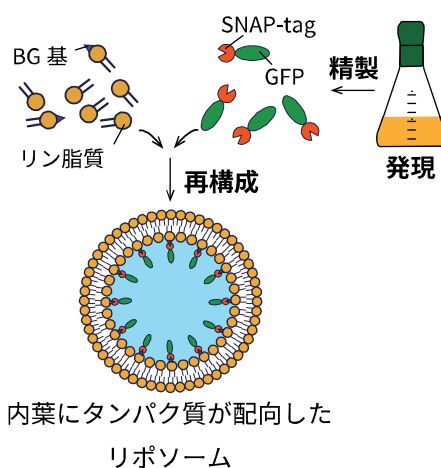


Fig. 1 Schematic illustration of the creation of the liposome with a regulated protein orientation.

- 1) Uyeda, A.; Watanabe, T.; Hohsaka, T.; Matsuura, T., Different protein localizations on the inner and outer leaflet of cell-sized liposomes using cell-free protein synthesis. *Synthetic Biology* 2018, 3(1): ysy007.
- 2) Ong, S. G.; Chitneni, M.; Lee, K. S.; Ming, L. C.; Yuen, K. H., Evaluation of Extrusion Technique for Nanosizing Liposomes. *Pharmaceutics* 2016, 8(4): 36.

Lipidic cubic phase 中でのタンパク質拡散制御と経皮薬物送達への応用

○小坂秀斗¹・若林里衣¹・神谷典穂¹・後藤雅宏¹ (¹九大院工)

Modulation of protein diffusion in lipidic cubic phase and transcutaneous penetration (Graduate School of Engineering, Kyushu University¹) KOZAKA, Shuto¹; WAKABAYASHI, Rie¹; KAMIYA, Norihiro¹; GOTO, Masahiro¹

皮膚を介して薬物を投与する経皮投与法は、近年の発展が顕著な中・高分子医薬品の非侵襲的な薬物投与法として注目を集めている。ところが皮膚最外層の角層の働きにより、500 Da 以上の中・高分子量薬物を経皮浸透させることは困難である。そこで我々は脂質キュービック相 (lipidic cubic phase; LCP) に注目し、経皮浸透促進技術の開発に取り組んで

きた。LCP とは両親媒性分子と親水性溶媒中からなる自己集合体であり、高い安定性やゲル様の粘弾性など経皮製剤に適した物理化学的特性を有する。最大で分子量 13.3 kDa までの中分子量薬物では LCP 内に封入することで経皮浸透性が向上する一方¹、タンパク質などの高分子量薬物は液晶中に存在する微細孔からの放出が著しく遅く、経皮浸透が制限されることが課題であった。そこで本研究では *N*-octyl- β -D-glucoside (OG) の添加によって微細孔径 (R_w) を膨潤させた swollen LCP (SLCP) を調製し、LCP 中の物質拡散性および経皮浸透性の向上を試みたのでこれを報告する (Fig. 1)。

Glyceryl monooleate (GMO) と水からなる LCP に対して OG を添加し、 R_w が 18.6 Å から 32.8 Å に増大した SLCP を調製した。ここに分子量の異なる種々のペプチドとタンパク質を内包し、超純水に接触させた際の薬物放出量を経時的に測定した。Fickian-diffusion モデルを用いて拡散係数 (D) を算出したところ、内包物の分子量が大きくなるに従って D が低下したことから、LCP 中での物質拡散は内包物の分子サイズに依存する可能性が示唆された (Fig. 2)。 R_w と内包物の断面回転半径 (R_g) の比 (r) と $\log D$ に負の直線関係が見られたことから ($\log D = -4.22r - 5.77$, $R^2 = 0.9415$)、 R_w を膨潤させることで、LCP 中の物質拡散を促進できると考えられる。続いて種々のタンパク質を内包した LCP および SLCP をマウス皮膚に 6 時間塗布し、浸透量を測定することで、LCP 中の物質拡散と経皮浸透性の相関を調査した。 D に対して各タンパク質の経皮浸透量をプロットしたところ、正の相関が見られた (Fig. 3)。特に分子量 42.7 kDa の ovalbumin では LCP による経皮浸透促進が見られなかった一方、SLCP において 4 倍程度の浸透量向上が認められた。以上のことから、 R_w 膨潤によって LCP 中での物質拡散ならびに皮膚に塗布した際の経皮浸透性を向上できることが判明した。

1) M. Kawai, *et al.*, *Mol. Pharm.*, 18, 1038-1048, (2021).

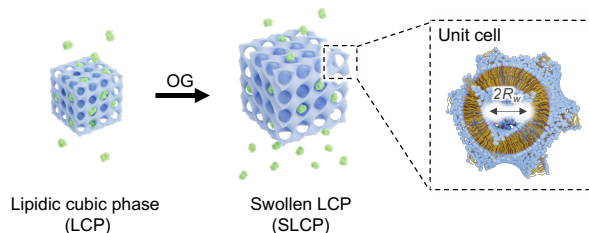


Fig. 1 Schematic illustration of this study

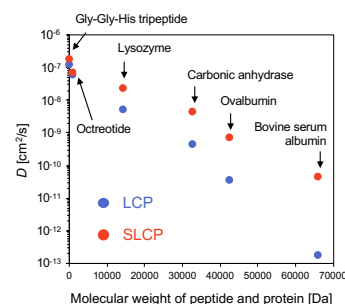


Fig. 2 Relation between D and molecular weight of peptides and proteins

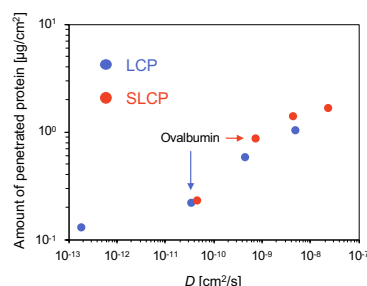


Fig. 3 Relation between skin penetration and D

ヒアルロン酸-蛍光性カルボラン複合体による BNCT

○河崎陸¹・山名啓太¹・真田悠生²・増永慎一郎²・鈴木実²・櫻井良憲²・坂東香里³・田畑杏梨³・吉川浩平³・東秀紀³・杉川幸太¹・長崎健³・池田篤志¹ (1 広大院先進理工、2 京大複合原子研・3 阪市大院工)

Complex of fluorescent carborane with hyaluronic acid for BNCT (Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University¹, Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University², Graduate School of Engineering, Osaka City University) KAWASAKI, Riku¹; KEITA, Yamana¹; SANADA, Yu²; MASUNAGA, Shin-ichiro²; SUZUKI, Minoru²; SAKURAI, Yoshinori²; BANDO, Kaori³; YOSHIKAWA, Kohei³; AZUMA, Hideki³; SUGIKAWA, Kouta¹; NAGASAKI, Takeshi³; IKEDA, Atsushi¹

近年の医療技術や科学技術の進展に伴って、がんの治療成績は向上してきた。それに伴って、患者の臓器を温存した低侵襲な治療法の開発が健康長寿社会の実現において求められている。そのような治療法の一つとして、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) が挙げられる。BNCT は我が国が世界を大きく牽引するがん放射線療法である。BNCT はホウ素と中性子の間で起こる核反応によって生じる粒子線のエネルギーを利用して遂行される。この粒子線のエネルギーの有効範囲が細胞の大きさ一つ分に相当することから、ホウ素薬剤をがん細胞選択的に送達することでがん細胞選択的に殺傷することができる。すなわち、本治療法の成否はがん細胞への選択的なホウ素薬剤の送達にある。現在、臨床にはアミノ酸誘導体である L-BPA や水溶性ホウ素クラスターである BSH がホウ素薬剤として用いられているものの、水溶性や腫瘍選択性など、送達上の課題が残されている。一方で、疎水性ホウ素クラスターであるカルボランもその分子内に多くホウ素原子を含むことや高い安定性から、BNCT 用ホウ素薬剤としての応用が期待されてきたが、その疎水性の高さから、臨床への応用は制限されてきた。

そこで本研究では、がん細胞表面に過剰発現している CD44 を介した効率的な取込みが知られているヒアルロン酸を用いることで蛍光性カルボラン¹⁾を水溶化させ、その蛍光イメージング能を有するホウ素薬剤としての機能について評価を行った結果について報告する²⁾。

ヒアルロン酸と蛍光性カルボランをボールミルによりエネルギーを印加し、水で抽出することでヒアルロン酸-蛍光性カルボラン複合体を得た。複合体からなる分散液の紫外可視吸光スペクトル測定の結果から、蛍光性カルボランに由来するピークが観測され、その濃度が 730 μM (ホウ素濃度、7300 ppm) であることや蛍光イメージングに用いるのに十分な発光強度を示すことが明らかとなった。さらに、動的光散乱測定の結果から、その粒子径が EPR 効果に適した 200 nm 程度であることが確認された。

ここでヒアルロン酸-蛍光性カルボラン複合体をマウス結腸がん細胞との相互作用を確認したところ、細胞内に蛍光性カルボランに由来する蛍光シグナルが観測され、確かに送達されたホウ素の細胞内動態の観察に有用であることが明らかとなった。さらには、ヒアルロン酸を過剰に添加することで複合体の取込みが阻害されたことから、本システムが CD44 を介して取り込まれていることが明らかとなった。また、マウスマクロファージ細胞との共培養系において、がん細胞への選択的な取込みが確認されたことから、本システムのがん細胞選択的なホウ素薬剤としての機能が示された。最後に、がん細胞内へと導入後、中性子線照射を行うことで BNCT による治療効果を検討した結果、臨床薬である L-BPA-フルクトース錯体よりも高い抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった。以上のことから、本システムはホウ素の細胞内イメージングを可能にするホウ素薬剤として期待できる。

参考文献

- 1) K. Nishino, *et. al.*, *Org. Lett.*, **18**, 4064. (2016).
- 2) K. Yamana, *et. al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **559**, 210, (2021).

細菌のヘム酵素が引き起こすフェントン反応によるカーボンナノチューブの分解

○高橋慧良¹・田口富美子¹・蟹江純一²・堀克敏¹ (¹名大院工、²(株)フレンドマイクロ)

Degradation of carbon nanotubes by Fenton reaction induced by bacterial heme enzyme (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Friend Microbe Inc.²) TAKAHASHI, Seira¹; TAGUCHI, Fumiko¹; KANIE, Juichi²; HORI, Katsutoshi¹

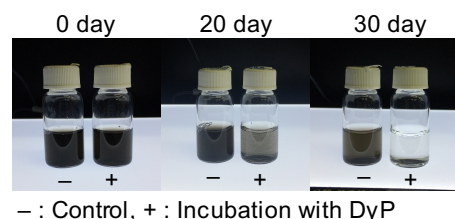
カーボンナノチューブ (CNT) は、その優れた特性から様々な用途への応用が期待されている。一方で、CNTの長期的な安全性はまだ不明であり、CNTの生分解性や環境中での運命を探ることは喫緊の課題となっている。環境中での長期的な安全性を議論するためには、CNTの生分解特性と環境運命を明らかにする必要がある。現在までにいくつかの動植物や真菌の酵素によるCNTの分解が報告されているが、それらの生物の分布域や生息条件は限られている¹。本研究では、より幅広い環境におけるCNTの環境運命を探るために、細菌の酵素によるCNT分解の可能性を調査した。一般的な土壌細菌であり高いリグニン分解能力を持つことが知られる *Pseudomonas putida* mt-2²⁾ の色素脱色ペルオキシダーゼ (DyP) 組換えタンパク質を、H₂O₂ 存在下でCNTとインキュベートし、CNTの分解を750 nmにおける吸光度 (A₇₅₀) およびラマンスペクトルの測定により確認した。インキュベート中のDyPの

酵素活性は2,2'-azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulfonate)(ABTS)の酸化により測定した。30日後、CNT懸濁液は透明に変化し(Fig. 1)、A₇₅₀の減少が確認された。また、インキュベート前のCNTのラマンスペクトルに見られたD-bandおよびG-bandは30日後に消失し、CNTの分解が確認された。しかし、DyPはインキュベート開始後1時間で失活しており、CNTの分解はDyPの酵素活性によるものではない事が示唆された(Fig. 2A)。

ヘム酵素はH₂O₂ 存在下でヘムの崩壊により鉄を放出し失活することが知られており、インキュベート中のCNT懸濁液の遊離鉄濃度を測定したところ、鉄濃度の増加が確認された(Fig. 2B)。キレート剤であるジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) の存在下ではDyPとのインキュベートによるCNTの分解は大幅に抑制された。同じくヘム系酵素であるシトクロム P450 の組換えタンパク質を用いて実験を行ったところ、DyPと同様の結果が得られた。これらの結果から、ヘム酵素の失活により放出された鉄によるフェントン反応によってCNTが分解されることが明らかとなった。ヘム酵素は全ての細菌が分泌するものであり、細菌の細胞外 H₂O₂ 濃度はCNT存在下で上昇する事が知られているため、この現象は幅広い環境中で生じる可能性があり、CNTの環境運命を探る上で重要な知見である。

1) M. Chen, X. Qin, G. Zeng, *Trends Biotechnol.*, **35**, 836-846 (2017)

2) T.D.H. Bugg, M. Ahmad, E.M. Hardiman, R. Singh, *Curr. Opin. Biotech.*, **22**, 394-400 (2011)



– : Control, + : Incubation with DyP

Fig. 1. Photographs of samples at different incubation times.

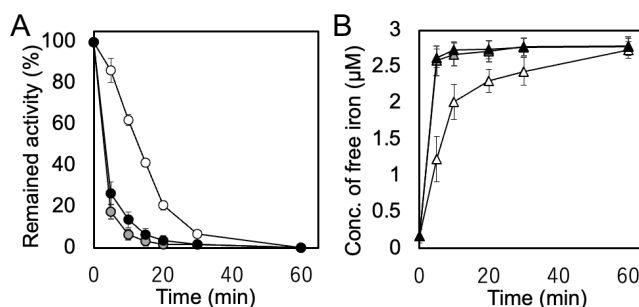


Fig. 2. Time course of enzyme activity of mt2DyP during incubation with CNTs. (B) Time course of free iron concentration in samples during incubation. The color of the marker indicates the concentration of H₂O₂: 1 mM (white), 10 mM (gray), 100 mM (black).