

ポスター発表(2日目)

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

■ 偶数 (2P-002~2P-048)

[2P-002] トリコテセンを用いた抗体医薬作製の試み

*楠本 和史¹、小泉慶明¹、加藤和則¹、安藤直子¹ (1. 東洋大学大学院理工学研究科)

[2P-004] RAD23A-UBA2によるK48鎖特異的認識機構の構造基盤

*佐藤 裕介^{1,2}、瓜島 絢²、日野 智也^{1,2}、永野 真吾^{1,2} (1. 鳥取大学GSC研究センター、2. 鳥取大学工学部)

[2P-006] SnoopCatcher/SnoopTagを用いた非メチル化CpG結合ドメイン融合ルシフェラーゼの構築と非メチル化CpG検出法の開発

*宮田 峻通¹、島村 葉月¹、吉田 亘¹ (1. 東京工科大院バイオニクス)

[2P-008] 紅色光合成細菌の光捕集タンパク質LH2へ再構成したホルミル基含有クロロフィルのスペクトル特性

*田中 愛子¹、山下 真花¹、篠田 稔行²、靱 達也²、木村 行宏³、佐賀 佳央¹ (1. 近畿大学大学院総合理工学研究科、2. 東京理科大学大学院理学研究科、3. 神戸大学大学院農学研究科)

[2P-010] 骨組織形成を指向した温度応答性タンパク質ハイドロゲルの構築

*岩丸 和聖¹、山本 遼太郎¹、眞下 泰正¹、三重 正和¹、小畠 英理¹ (1. 東京工業大学生命理工学院)

[2P-012] 細胞標的性DNAアプタマー修飾人工ウイルスキャプシドの構築

*内山 晃輔¹、稲葉 央¹、古川 寛人¹、松浦 和則¹ (1. 鳥取大学院工学研究科)

[2P-014] 構造変化が不明なタンパク質に対する蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーの設計戦略

*田嶋 竣介¹、中田 栄司¹、坂口 怜子²、才村 正幸¹、森 泰生³、森井 孝¹ (1. 京都大学エネルギー理工学研究所、2. 産業医科大学医学部、3. 京都大学大学院工学研究科)

[2P-016] 酵素反応を用いた両親媒性ペプチド集合体の事後修飾に及ぼす因子探索

*樋口 亜也斗¹、若林 里衣¹、後藤 雅宏^{1,2}、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-018] PG-Surfactantを用いた合成高分子の哺乳類細胞膜への提示法の検討

*中窪 樹¹、水野 稔久¹ (1. 名古屋工業大学大学院工学専攻生命応用科学系プログラム)

[2P-020] 疎水性タグ化合物による神経変性疾患関連タンパク質の分解誘導

*平井 景梧¹、山下 博子²、友重 秀介¹、三島 祐悟¹、佐藤 伸一^{1,3}、橋本 祐一²、石川 稔¹ (1. 東北大院生命、2. 東大定量研、3. 東北大学際研)

[2P-022] 酸素感受性イオンチャネルTRPA1動態の定量解析に向けたcpHalo-tag修飾

*杉原 佑太郎¹、曾我 恭平¹、小島 憲人¹、森 泰生²、清中 茂樹¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 京都大学大学院工学研究科)

[2P-024] 分子中央部へのアルキレン鎖導入によるペプチド集積化と生物学的機能化

*矢口 敦也¹、平松 弘嗣²、味岡 逸樹^{3,4}、村岡 貴博^{1,4} (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 国立陽明交通大学、3. 東京医科歯科大学脳統合機能研究センター、4. 神奈川県立産業技術総合研究所)

[2P-026] 維持メチル化機構解明を指向したジユビキチン化 PAF15 タンパク質の化学合成

*高橋 侑也¹、郡 聡実²、有田 恭平²、林 剛介¹、村上 裕¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科生命分子工学専攻、2. 横浜市立大学大学院生命医科学研究科)

[2P-028] ケトンの不斉水素化反応を触媒する人工金属酵素の開発

*石井 俊宏¹、吉岡 紗穂¹、松本 隆聖¹、丸毛 智史¹、藤枝 伸宇¹ (1. 阪府大院生環)

[2P-030] ペルオキシレドキシノ十量体リング構造を用いた蛋白質の捕捉

*宇津 拓実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-032] アシル化マクロピノサイトース誘導ペプチドによる細胞外小胞の細胞内送達

*中川 優奈¹、ARAFILES Jan Vincent V.¹、広瀬 久昭¹、二木 史朗¹ (1. 京都大学化学研究所)

[2P-034] 固定化駆動法によるマウス脳内でのmGlu1リガンドの動態解析

*美野 丈晴¹、天池 一真¹、野中 洋^{1,2}、坂本 清志¹、浜地 格^{1,2} (1. 京大院工、2. JST ERATO)

[2P-036] リン酸基および細胞認識部位を有するコラーゲンモデルペプチドの合成評価

*堀 雅竜¹ (1. 龍谷大学)

[2P-038] ALDH由来ミトコンドリア移行シグナルを有するペプチド誘導体の二次構造と細胞内動態評価

*高山 啓¹、山崎 正幸²、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学理工学研究科物質化学専攻、2. 龍谷大学農学部食品栄養学科)

[2P-040] 再構成無細胞翻訳系における4塩基コドンの多重探索法の開発

*渡邊 貴嘉¹、Novitasari Dian¹、芳坂 貴弘¹ (1. 北陸先端大マテリアル)

[2P-042] 開環メタセシス重合の基質となるノルボルネン類縁体を提示したアミロイド線維の調製

*植野 喬成¹ (1. 大阪大学工学部)

[2P-044] メッセンジャーRNAのチオ修飾による翻訳開始反応の促進

*阿部 奈保子¹、川口 大輔¹、児玉 亜有実¹、橋谷 文貴¹、友池 史明²、木村 康明¹、清水 義宏³、阿部 洋^{1,4,5} (1. 名古屋大学大学院理学研究科、2. 学習院大学理学部、3. 理化学研究所、4. JST-CREST、5. iGCORE)

[2P-046] 蛍光RNAアプタマー17-3の2次構造解明を目指した生化学解析

*安部 俊輔¹、小山 孝紀¹、松村 茂祥¹、井川 善也¹ (1. 富山大学大学院理工学教育部 化学専攻)

[2P-048] PCAF型PYPタグリガンドを用いた核酸結合色素/タンパク質ハイブリッドプローブの開発

*松木 星¹ (1. 大阪大学大学院工学研究科)

トリコテセンを用いた抗体医薬作製の試み

○楠本和史・小泉慶明・加藤和則・安藤直子（東洋大院理工）

Production of trichothecene-conjugated antibody as an anti-cancer agent. (Faculty of Science & Engineering, Toyo University) KUSUMOTO, Kazushi; KOIZUMI, Yoshiaki; KATO, Kazunori; TAKAHASHI-ANDO, Naoko

トリコテセンとは *Fusarium* 属、*Myrothecium* 属などの糸状菌によって二次代謝産物として生産されるカビ毒の一群である¹⁾。トリコテセンは細胞分裂の盛んな癌細胞に対して強い毒性を示し、またタンパク質や DNA の合成を阻害し、複数の経路でアポトーシスを誘導するため抗癌剤への応用利用が期待されている。トリコテセンは癌細胞のみならず正常細胞にも毒性を作用するが、抗体医薬の発展により、癌細胞に選択的にトリコテセンを運搬し細胞死を誘導することが可能となってきた。そこで本研究では、癌細胞の表面に多く発現している表面抗原を認識する抗体を利用して、トリコテセン類を抗体に結合させることで、癌細胞のみを攻撃する手法を目指すこととした²⁾。その際、癌関連抗原の中でも様々な癌細胞に発現している EpCAM と EphA2 に着目した。これらの抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体にトリコテセン類を付加させれば、癌細胞へ特異的にトリコテセンが導入され、細胞死させることが可能だと考えられる。

まず本研究では、抗体付加させるトリコテセン類の選抜を行うこととした。抗体を付加させるためには水酸基を有する必要がある。そこでトリコテセン類の中でも毒性が強く、また水酸基を有し、薬剤としても特に期待されている T-2 toxin、HT-2 toxin、4,15-diacetoxyscirpenol (DAS)、Verrucaric acid を抗体付加トリコテセン候補として選択した。これらのトリコテセンをヒト乳がん細胞 (MCF-7) に添加し、毒性を評価したところ、その毒性は Verrucaric acid > T-2 toxin > HT-2 toxin > DAS の順となった。

次に抗体にトリコテセンを付加させるためには、リンカーが必要となる。そこで、有機化学的手法によりリンカーの作製を試みた³⁾。上記の4種のトリコテセンのうち、T-2 toxin を用いて抗体付加させるためのリンカー作製を行った。小分子を抗体に接続させるリンカーには多くの種類が存在するが、本実験では細胞内に取り込まれたトリコテセンが切り離されやすいリンカーを選択した。リンカー作製では2段階の工程があり、第1段階では T-2 toxin にグルタル酸無水物を反応させてできる T-2 toxin hemiglutarate (T-2 HG) への変換である。第2段階では作製した T-2 HG に N-ヒドロキシコハク酸イミドを反応させてできる T-2-G-O-Succinimide (T-2-G-OSu) への変換である。それぞれ反応させた後、HPLC または LC-MS/MS によって合成確認を行った (Fig. 1)。LC-MS/MS 解析の結果、T-2-G-OSu のアンモニウムイオン付加体の m/z である 695.3 Da にピークが確認できた。これは T-2 toxin と比較したときの差分がちょうどリンカー部分の m/z と一致しており、また MS/MS のフラグメントイオンも T-2 toxin と酷似しているため T-2-G-OSu が合成できたと確認できた。現在、作製した T-2-G-OSu と抗 EpCAM 抗体との結合を行い、培養ヒト癌細胞に対する殺細胞効果を検討している。

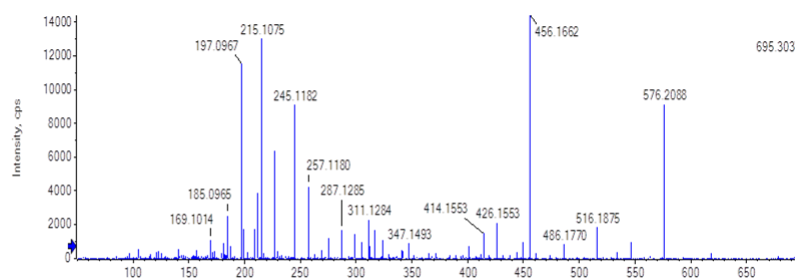


Fig. 1. T-2-G-OSu の LC-MS/MS 解

1) 安藤 直子、松井 宏介、鈴木 将 他 (2020) JSM Mycotoxins, 70 (2), 67-74.

2) Wu, Q., Qang, X., et al. Arch. Toxicol. (2017) 91 (12), 3737-3785.

3) Kojima S., Nakamura N., Ueno Y. et al. (1993) Nat. Toxins. 1 (4), 209-215.

RAD23A-UBA2 による K48 鎖特異的認識機構の構造基盤

○佐藤裕介^{1,2}・瓜島絢²・日野智也^{1,2}・永野真吾^{1,2}(¹鳥取大 GSC センター、²鳥取大工)

Structural basis for specific recognition of Lys63-linked polyubiquitin chains by the UBA domains RAD23A

(GSC center, Tottori University¹, Department of Engineering, Tottori University²)SATO Yusuke^{1,2}; URISHIMA, Aya²; HINO Tomoya^{1,2}, NAGANO, Shingo^{1,2}

ユビキチンは 76 残基からなる、真核生物に高度に保存されたタンパク質で、C 末端グリシン残基を用いて標的タンパク質のリジン残基と共有結合することで翻訳後修飾因子として振る舞い、その機能を様々に制御する。多くの場合ユビキチン自身のリジン残基 (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63)、もしくは N 末端メチオニン残基 (M1) のアミノ基を用いてユビキチンが連続的に共有結合しユビキチン鎖を形成する。この結合に使われるアミノ基の違いによってユビキチン鎖は異なる構造と機能を持つ事が知られている。多様なユビキチン鎖の中でも、K48 で繋がったユビキチン鎖 (K48 鎖) が細胞内で最も豊富に存在し、プロテアソームによる分解シグナルとして機能する。これまで、K48 鎖修飾を受けた基質タンパク質は一義的にプロテアソームによる分解を受けると考えられてきたが、近年プロテアソームと相互作用する様々なアクセサリタンパク質が同定され、これらアクセサリタンパク質によって基質タンパク質の運搬、認識、分解と言った各ステップが厳密に調節されている事がわかってきた。

アクセサリタンパク質の 1 つである RAD23B は、プロテアソームと結合する UBL ドメイン、ユビキチン鎖全般と結合する UBA1 ドメイン、そして K48 鎖特異的に結合する UBA2 ドメインを有し、K48 鎖修飾を受けた基質をプロテアソームへと運搬するシャトル分子として機能すると考えられてきた(Fig.1)。しかし最近、RAD23B は K48 鎖修飾を受けた基質やプロテアソームと相互作用することで液 - 液相分離による液滴を形成し、プロテアソームと分解すべき基質を集積させ、分解反応を促進させる働きがある事が報告された。つまり、RAD23B は単なるシャトル分子として働くだけではなく、プロテアソーム依存的な分解の場を形成するという機能を持つと考えられる。今回、我々は RAD23B と非常に相同性の高い RAD23A の UBA2 ドメイン (RAD23A-UBA2) と、K48 鎖との複合体の結晶構造を決定し、RAD23A-UBA2 による K48 鎖特異的な結合機構を解明した(Fig.2)。興味深いことに、RAD23A-UBA2 は溶液中では単量体として存在するが、結晶構造中では K48 鎖との結合によって 2 量体を形成していた。UBA2 の 2 量体化が溶液中でも起こるのか、2 量体化が溶液中で起こった場合細胞内での RAD23 の機能にどのような影響を及ぼすか、といった点は今後解析する。

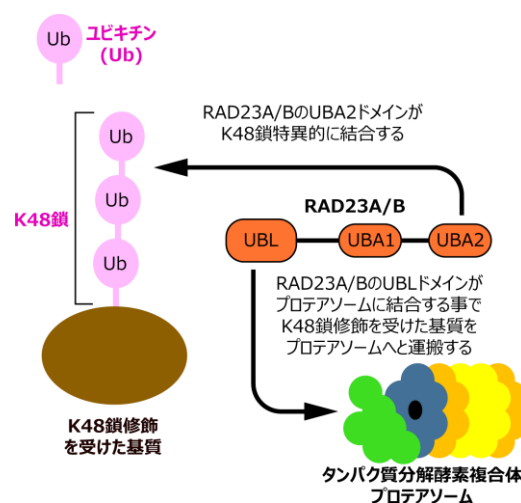


Fig.1 RAD23A/B の機能

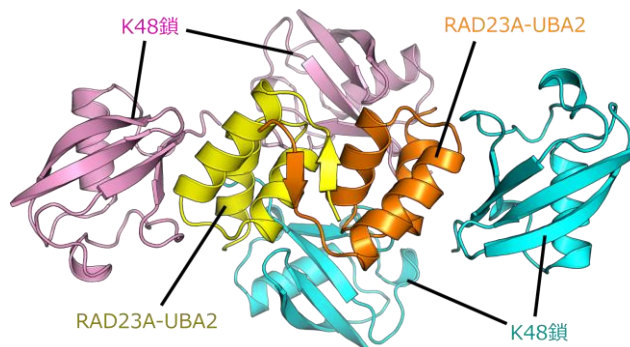


Fig.2 RAD23A-UBA2 と K48 鎖との複合体の結晶構造

SnoopCatcher/SnoopTag を用いた非メチル化 CpG 結合ドメイン融合ルシフェラーゼの構築と非メチル化 CpG 検出法の開発

○宮田 峻通・島村 葉月・吉田 亘（東京工科大院バイオニクス）

Development of unmethylated CpG detection method using unmethylated CpG binding domain fused luciferase constructed by SnoopCatcher/SnoopTag system (Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology) MIYATA, Takamichi; SHIMAMURA, Hazuki; YOSHIDA, Wataru

ヒトゲノム DNA には、5 メチルシトシンや N⁶ メチルアデニンなど様々な修飾塩基が含まれる。本研究では Methylated-CpG-binding domain (MBD) と Firefly luciferase (Fluc) を融合させた MBD-Fluc と、unmethylated-CpG-binding domain である Cys-X-X-Cys motif (CXXC) と Oplophorus luciferase (Oluc) を融合させた CXXC-Oluc を構築し、これらを用いたゲノム DNA メチル化レベル測定法を開発した¹⁾。これは Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) を利用し異なる波長の BRET シグナルでゲノム DNA 中のメチル化 CpG 量と非メチル化 CpG 量を同時に定量する方法である。さらに、ヘミメチル化 CpG を認識する SET and RING-associated (SRA) domain と Fluc を融合した SRA-Fluc を構築し、同様の原理でヘミメチル化レベルを測定する方法も開発している²⁾。これらの結果は修飾塩基認識タンパク質融合ルシフェラーゼを構築すれば、その標的修飾塩基を BRET により検出できることを示している。

そこで、本研究ではタンパク質ライゲーションシステム SnoopCatcher/SnoopTag を用いることで、任意の組み合わせの修飾塩基認識タンパク質融合ルシフェラーゼを構築する方法を確立することを目的とした。ライゲーションシステム SnoopCatcher/SnoopTag は肺炎球菌アドヘジン RrgA C-Terminal ドメインを分割することで作製されたタンパク質ライゲーションシステムである³⁾。反応残基である SnoopTag のリシンと SnoopCatcher のアスパラギンとの間でイソペプチド結合が形成される。本研究では CXXC に SnoopTag (CXXC-SnoopTag) を、Oluc に SnoopCatcher (SnoopCatcher-Oluc) を付加した 2 種類のタンパク質を組換え生産し、これらのライゲーション産物を用いてゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を定量できるか検討した。

pET30c-streptagII-CXXC-SnoopTag 発現ベクターと pET30c-streptagII-SnoopCatcher-Oluc 発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。形質転換した BE21 (DE3) を OD₆₀₀ が 0.5–0.6 になるまで培養し、1.2 mM IPTG を添加して CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc の発現誘導を行った。CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc を Strep-Tactin カラムを用いて精製し、SDS-PAGE により CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc が精製されたことを確認した。次に、1×PBS buffer 内で CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc をインキュベートし、ライゲーションさせた。このライゲーション産物と DNA インターカレーター BOBO-1 を HeLa ゲノム DNA に加え、Oluc の発光により励起された BOBO-1 の蛍光スペクトルを測定した。その結果、485 nm における BOBO-1 の蛍光強度が HeLa ゲノム DNA の非メチル化 CpG レベルに依存して上昇した。つまり、CXXC-SnoopTag と SnoopCatcher-Oluc のライゲーション産物を用いることにより、ゲノム DNA の非メチル化 CpG 量を BRET により定量できることが示された。以上の結果より、ライゲーションシステム SnoopCatcher/SnoopTag を用いることで、BRET を用いてゲノム DNA 中の修飾塩基を検出できる修飾塩基認識タンパク質融合ルシフェラーゼを構築できることが示唆された。

1) Y. Baba, K. Yamamoto, W. Yoshida, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 4765 (2019)

2) N. Taka, I. Karube, W. Yoshida, *Anal. Lett.*, **52**, 1258 (2019)

3) G. Veggiani, T. Nakamura, M. D. Brenner, R. V. Gayet, J. Yan, C. V. Robinson, M. Howarth, *PNAS*, **113**, 1202 (2016)

紅色光合成細菌の光捕集タンパク質 LH2 へ再構成したホルミル基含有クロロフィルのスペクトル特性

○田中 愛子¹・山下 眞花¹・篠田 稔行²・靱 達也²・木村 行宏³・佐賀 佳央¹

(¹近畿大院総合理工、²東京理科大院理、³神戸大院農)

Spectral Properties of Formylated Chlorophylls in Light-harvesting Protein LH2 from the Purple Photosynthetic Bacterium *Rhodoblastus acidophilus* (Graduate School of Science and Engineering, Kindai University¹, Graduate School of Science, Tokyo University of Science², Graduate School of Agriculture, Kobe University³) TANAKA, Aiko¹; YAMASHITA, Madoka¹; SHINODA, Toshiyuki²; TOMO, Tatsuya²; KIMURA, Yukihiro³; SAGA, Yoshitaka¹

光合成タンパク質中のバクテリオクロロフィル(BChl) *a* やクロロフィル(Chl)が持つカルボキシル基は、光合成機能において重要な役割を担っている。光捕集タンパク質 LH2 の B800 BChl *a* の場合には、3 位アセチル基と β-Arg20 が水素結合形成することで電子状態が制御されている。本研究では、LH2 タンパク質の B800 部位にホルミル基を有する酸素発生型光合成生物の Chl 色素を再構成することで、Chl 色素のホルミル基とタンパク質間の相互作用と吸収帯への影響を明らかにすることを目的とした。

培養した紅色光合成細菌

Rhodoblastus acidophilus から天然 LH2 を単離し、酸性条件でインキュベートすることで B800 BChl *a* を脱離させた。Chl *b*、Chl *d*、Chl *f*(図 1)をそれぞれハウレンソウ、およびシアノバクテリアである *Acaryochloris marina* と *Halomicronema hongdechloris* から抽出・精製した。得られた色素を B800 脱離 LH2 と中性条件でインキュベートし、再構成 LH2 を得た。

LH2 の B800 結合ポケットに再構成された色素の Q_y 吸収帯はいずれも 5 配位の単量体状態と比べて長波長シフトしたが、特に Chl *d* と Chl *f* は大きくシフトした。Chl *d* と Chl *f* を再構成した LH2 の共鳴ラマン測定において、A 環に存在するホルミル基の C=O 伸縮に由来するシグナルは水素結合形成によって低波数シフトした。また、LH2 タンパク質の構造から、これらのホルミル基と β-Arg20 との水素結合形成は可能であると推察された。したがって、B800 結合ポケットに導入されたときの Chl *b* と Chl *d/f* の Q_y 吸収帯シフトの違いを生み出す要因として、Chl の A 環に存在するホルミル基とポリペプチド間での水素結合の形成が示唆された。

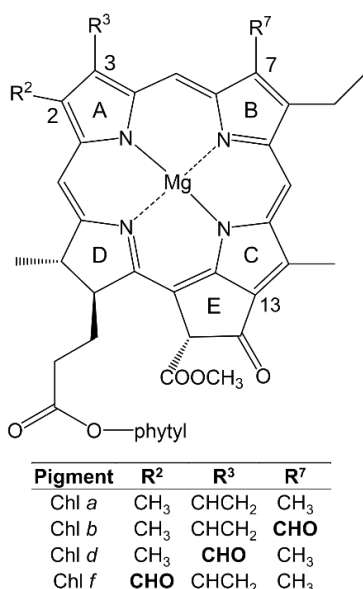


Fig. 1 Molecular structures of chlorophylls in oxygenic photosynthetic organisms.

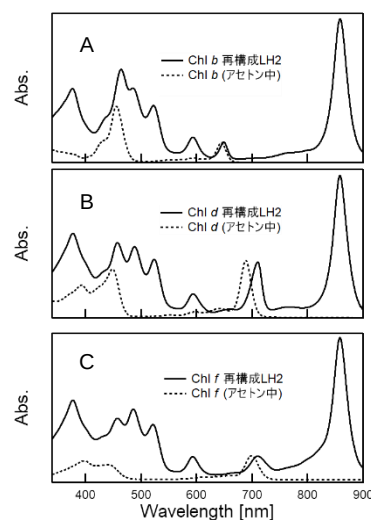


Fig. 2 Absorption spectra of reconstituted LH2 (solid curve) and chlorophylls in acetone (broken curve). A: Chl *b* B: Chl *d* C: Chl *f*.

骨組織形成を指向した温度応答性タンパク質ハイドロゲルの構築

○岩丸和聖・山本遼太郎・眞下泰正・三重正和・小島英理（東工大生命理工）

Development of thermo-responsive protein hydrogel for bone formation (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) IWAMARU, Kazumasa; YAMAMOTO, Ryotaro; MASHIMO, Yasumasa; MIE, Masayasu; KOBATAKE, Eiry

【緒言】現在、骨の外傷や骨疾患などに対する治療法として骨移植という手法が用いられている。しかし骨移植による治療には感染症のリスクや回復に要する期間の長さなどが課題として挙げられている。このような課題を克服できる骨の治療法として、組織工学の利用が注目されている。組織工学は細胞、シグナル分子、足場材料の3要素で構成されており、当研究室はその中でも組織再生に適切な足場材料の開発に取り組んできた。そして細胞の3次元組織形成の実現に向けて、温度に応答してハイドロゲル化する融合タンパク質である、(AVGVP)₄₂-D₈₈-CL (coiled-coil unit bound ELP; O-CUBE)を開発した。このO-CUBEは、温度に応答して疎水性相互作用により凝集するエラスチン由来の疎水性ポリペプチド(AVGVP)の42回くり返し配列(ELP)、ELPの過剰な凝集を防ぐポリアスパラギン酸D₈₈、融合タンパク質同士の架橋点となるアンチパラレルホモ四量体coiled-coil構造を形成するCoil-LL(CL)の3部分で構成されており、エラスチン由来の(AVGVP)₄₂のはたらきにより、4°C付近ではゾル化、37°C付近ではゲル化し、可逆的な温度応答性を有する。またこのハイドロゲルは、生体適合性や生分解性に優れており、タンパク質濃度を調整することによりゲルの硬さを制御することができるため、組織工学の足場材料として使用することが期待できる。本研究では、このO-CUBEを基盤として、骨シアロタンパク質(BSP)由来のRGD配列を挿入した(AVGVP)₄₂-D₈₈-bRGD-CL(bRGD-CUBE; B-CUBE)を構築し、骨組織の形成を目的とした。ここでは、このB-CUBEを3次元組織形成の足場材料としてヒト間葉系幹細胞(hMSC)の骨芽細胞分化誘導評価を行った。

【実験】CUBEタンパク質は大腸菌発現系によって発現させ、エラスチン由来ポリペプチド特有の性質である温度応答性を利用した精製方法である、Inverse Transition Cycling(ITC)法により精製した。精製したタンパク質をPBSで希釈し、温度応答的にハイドロゲル化するタンパク質溶液を得た。温度変化に伴う濁度変化測定を行うことで、加温によるゲル化及び冷却によるゾル化の評価を行った。また、CUBEタンパク質をコートしたプレート上で、hMSCの細胞接着能や増殖能を評価した後、2次元での骨分化誘導培地を用いたhMSCの骨芽細胞分化誘導を行い、骨芽細胞の初期分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定した。3次元培養において骨芽細胞分化誘導を行う際には、B-CUBE溶液内にhMSCを懸濁させてプレートに滴下することによりドロップレットを形成させ、37°Cに加温することでハイドロゲルを作製した。ここに骨芽細胞分化誘導培地を加えることで、細胞の分化を誘導した。

【結果と考察】ITC法によって精製したタンパク質溶液は、37°Cに加温することによって、ハイドロゲル化した。O-CUBEとB-CUBEをプレートにコートし、その上でhMSCの2次元培養を行ったところ、RGD配列が存在するB-CUBE上でのみ細胞の接着、増殖が確認できた。B-CUBE上でのhMSCの骨分化誘導の実験では、分化マーカーであるALP活性の上昇が見られた。次に、ハイドロゲル内にて細胞の培養を行ったところ、細胞の増殖が確認されたことからハイドロゲル内での3次元培養が可能であることが示され、構築したタンパク質ハイドロゲルを用いた骨組織の形成が可能であることが示唆された。

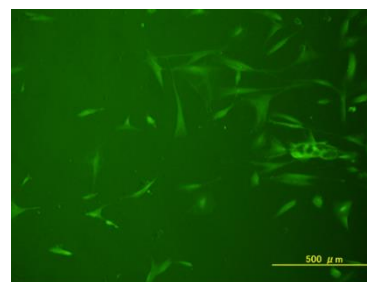


Fig 1. Morphological evaluation of hMSCs after 24 h of incubation on plates coated with B-CUBE.
Scale bar = 500 μm

細胞標的性 DNA アプタマー修飾人工ウイルスキャプシドの構築

○内山晃輔・稲葉央・古川寛人・松浦和則（鳥取大院工）

Construction of artificial viral capsid modified with Cell-targeting DNA aptamer

(Graduate School of Engineering, Tottori University) UCHIYAMA, Kosuke; INABA, Hiroshi; FURUKAWA, Hiroto; MATSUURA, Kazunori

近年、リガンド-レセプター間の相互作用を通して、標的細胞に選択的にデリバリーするナノ材料の創製が盛んに行われている。「アプタマー」は分子認識能を有する核酸分子であり、塩基配列によって特定の立体構造を形成して標的分子を認識することで、細胞標的能をナノ材料に付与することが可能である¹⁾。一方、当研究室では、

トマトブッシースタントウイルス由来の24残基 β -Annulus peptideが水中で自己集合することで直径30~50 nmの人工ウイルスキャプシドを形成し、内部にDNAやタンパク質・無機ナノ粒子などが内包可能である

ことを見出している²⁾。また、C末端側の化学修飾により、ヒト血清アルブミン(HSA)や、RNase Sなどのタンパク質を表面被覆した人工ウイルスキャプシドの構築にも成功している^{3,4)}。本研究では、リンパ腫細胞を認識するDNAアプタマーを表面修飾した人工ウイルスキャプシドを構築し、細胞標的性DDSキャリアとして応用することを目指した(Fig.1)。

Fmoc 固相合成法を用いてC末端側にCysを有する β -Annulus-GGGCG peptide (INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGSGGGCG)を合成し、Sulfo-GMBS リンカーを介して、リンパ腫細胞特異的なDNAアプタマーTE02⁵⁾を連結した。 β -Annulus-TE02 (25 μ M)は10 mM phosphate buffer (pH 7.0) 中において、動的光散乱(DLS)測定により55 $\pm$ 16 nmの粒径分布を示し(Fig.2a)、TEM観察により60 nm程度の球状集合体を形成していることが確認された(Fig.2b)。TE02アプタマー修飾人工ウイルスキャプシドのリンパ腫Daudi細胞への取り込みをCLSM観察により評価したところ、未修飾のキャプシドよりも約2倍取り込まれることがわかった(Fig.2c, d)。現在、TE02アプタマー修飾キャプシドの細胞選択性を検討している。

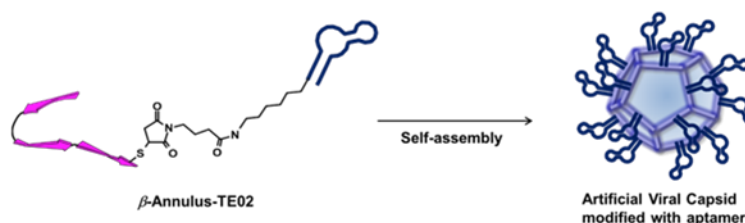


Fig.1 Schematic illustration of construction of artificial viral capsid modified with DNA aptamer.

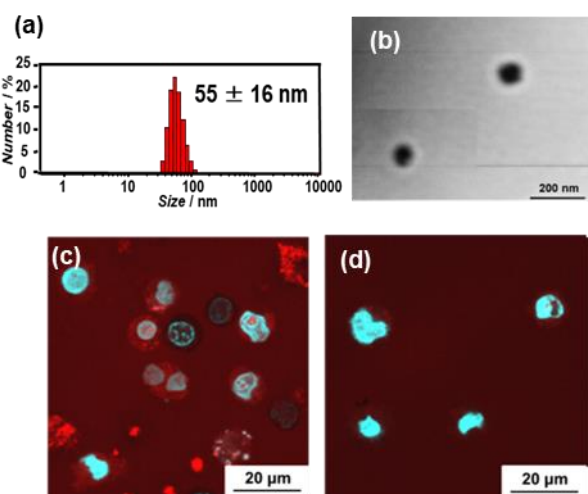


Fig.2 (a) DLS size distribution and (b) TEM image of artificial viral capsid modified with TE02 aptamer at 25 μ M in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0). (c, d) CLSM images of Daudi cells in the presence of TAMRA-labeled artificial viral capsid with (c) or without (d) TE02 aptamer.

- 1) X. Fang and W. Tan, *Acc. Chem. Res.*, **43**, 48 (2010).
- 2) K. Matsuura, *Chem. Commun. (Feature Article)*, **54**, 8944 (2018)
- 3) K. Matsuura, T. Honjo, *Bioconj. Chem.*, **30**, 1636 (2019)
- 4) K. Matsuura, J. Ota, S. Fujita, Y. Shiomi, H. Inaba, *J. Org. Chem.*, **85**, 1668 (2020)
- 5) Z. Tang, D. Shangguan, K. Wang, H. Shi, K. Sefah, P. Mallikratchy, H. W. Chen, Y. Li and W. Tan, *Anal. Chem.*, **79**, 13, 4900 (2007)

構造変化が不明なタンパク質に対する蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーの設計戦略

○田嶋峻介¹・中田栄司¹・坂口怜子²・才村正幸¹・森泰生³・森井孝¹ (¹京大エネ研、²産医大医、³京大院工)

The construction strategy of AFP-based biosensors using the putative structural change (Institute of Advanced Energy, Kyoto University¹, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health², Graduate School of Engineering, Kyoto University³) SHUNSUKE, Tajima¹; Eiji, Nakata¹; REIKO, Sakaguchi²; MASAYUKI, Saimura¹; YASUO, Mori³; Takashi, Morii¹

蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーは、細胞内局在化の容易さや長時間測定への適性などから、生細胞内での生体分子の挙動解明のために広く使われている。検出原理としては、標的と反応・結合によるタンパク質機能構造の構造変化を融合した蛍光タンパク質の構造変化へと伝播させ、蛍光発光変化として検出する方法が一般的である。この際、構造解析等による構造変化の情報が、効率的な蛍光変化での検出のために使用される。しかしながら、より多くの標的に対するバイオセンサーを、蛍光タンパク質を用いて開発するためには、構造情報が得られていないタンパク質を用いて蛍光バイオセンサーを構築する設計法が必要である。

TRPC5 はカルシウム透過型イオンチャネルであり、Cys553 の NO によるニトロソ化および Cys558 とのジスルフィド結合形成に伴う構造変化により開口することが示唆されている¹⁾。しかしながら、ジスルフィド結合形成状態の構造情報しか得られておらず、ジスルフィド結合形成前後での構造変化は明らかになっていない (図 1)²⁾。我々は、構造変化が微小なタンパク質機能構造でも、蛍光タンパク質の蛍光団の近傍に導入することによって、蛍光変化として検出できることを報告している³⁾。また、TRPC5 の構造変化が予想される部位を、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) に導入した EGFP-TRPC5 によって、ジスルフィド結合形成による構造変化を蛍光変化として検出している⁴⁾。しかしながら、その蛍光強度変化は微小であるため、EGFP-TRPC5 を細胞内でセンサーとして使用するためには蛍光強度変化の増幅が必要である。

本研究では、EGFP-TRPC5 の蛍光強度変化を増幅するために、TRPC5 の構造変化部位を短くし、ジスルフィド結合形成部位を蛍光タンパク質に近づけて、より効率的に蛍光変化を誘起できる変異体を探索した (図 2)。*In silico* と *in vitro* による二段階のスクリーニングにより、EGFP-TRPC5⁴⁾ より大きな蛍光変化を示す 3 種類の変異体を得ることができた。スクリーニングの詳細およびその機能評価について発表する。

- 1) Yoshida T, Inoue R, Morii T, et al. Nat. Chem. Biol., 2006;2:596-607.
- 2) Duan J, Li J, Chen GL, Ge Y, et al. Sci. Adv. 2019;5:eaaw7935.
- 3) Sakaguchi R, Endoh T, Yamamoto S, et al. Bioorg. Med. Chem. 2009;17:7381-7386.
- 4) Tajima S, Nakata E, Sakaguchi R, et al. Bioorg. Med. Chem., 2020;28:115430.

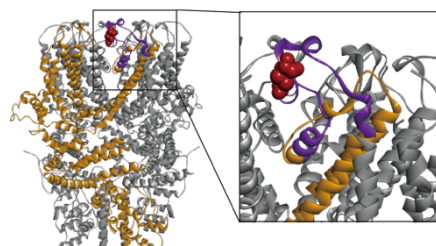


図 1. TRPC5 の Cryo-EM 画像 (PDB ID: 6AEI)。Cys553・Cys558 を CPK 表示で示した。

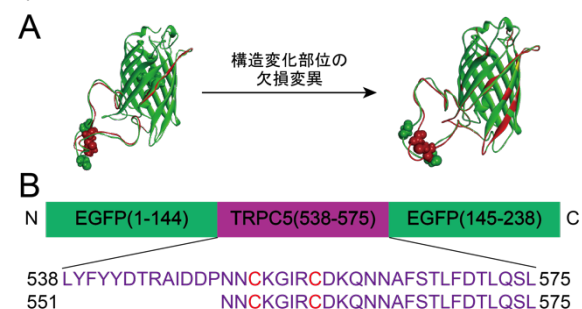


図 2. (A) 欠損変異のシミュレーション (B) EGFP-TRPC5 および欠損変異体の模式図および構造変化部位のアミノ酸配列

酵素反応を用いた両親媒性ペプチド集合体の事後修飾に及ぼす因子探索

○樋口 亜也斗¹・若林 里衣¹・後藤 雅宏^{1,2}・神谷 典穂^{1,2} (¹九大院工、²九大未来化セ)

Investigation on factors that affect post-modification of peptide amphiphile assemblies by enzymatic

reaction. (¹Graduate School of Engineering, Kyusyu University, ²Center for Future Chemistry, Kyushu University) HIGUCHI, Ayato¹; WAKABAYASHI, Rie¹; GOTO, Masahiro^{1,2}; KAMIYA, Noriho^{1,2}

生体内の超分子構造体を構造的・機能的に模倣可能な自己組織化材料への関心が近年高まっている。特に酵素反応性を利用した自己組織化や機能制御が精力的に研究されているが、構造体への事後修飾の方法は確立されていない。我々は、酵素反応を用いて両親媒性ペプチド (PA) が形成する自己組織化材料に様々な機能性分子を事後修飾可能な手法を報告した [1]。ここでは、酵素としてグルタミン (Gln) 残基とリジン (Lys) 残基もしくは一級アミン間を架橋する微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) を用い、MTG 反応性の Gln 残基を有する PA、Fmoc-L_nQG (n=2,3) を設計した。これまでにこれらの PA 集合体に対して MTG 反応により一級アミンを有する蛍光小分子や蛍光タンパク質を事後修飾できることを確認している。また、PA 自己組織化における pH 依存性に着目し、PA 集合体と PA 集合体への酵素反応性における pH の影響を明らかにした。ここでは、荷電状態による MTG と PA 集合体との接近性や PA 集合体上の酵素反応部位の密度が反応性に関与する可能性が示唆されている [2]。この PA 集合体に対する酵素反応性の違いを明らかにするために、今回は酵素反応部位密度に着目し、MTG 反応部位を持たない Fmoc-L_n (n=2,3) を Fmoc-L_nQG と混合させることで、PA 集合体中の酵素反応性 PA 間の距離を変化させ、事後修飾反応に与える影響を調査した (Fig. 1)。

これまでに Fmoc-L₂QG はファイバー状、Fmoc-L₃QG はテープ状の集合体を形成することが確認されている。Fmoc-L_n 単独では、Fmoc-L₂ はテープ状、Fmoc-L₃ はファイバー状の集合体を形成することが確認された。また、テープ状の集合体を形成する PA 同士である Fmoc-L₂ と Fmoc-L₃QG を混合し、一級アミンを有する機能性分子の事後修飾反応を行うと、Fmoc-L₃QG の酵素反応率が向上した。これに対し、集合体形態の異なる Fmoc-L₃ と Fmoc-L₃QG を混合すると、酵素反応率が減少した。これは、Fmoc-L₃QG が Fmoc-L₂ と共集合したことにより、酵素反応部位間にスペースが生まれ、酵素が認識しやすくなったことによるのではないかと考えている。

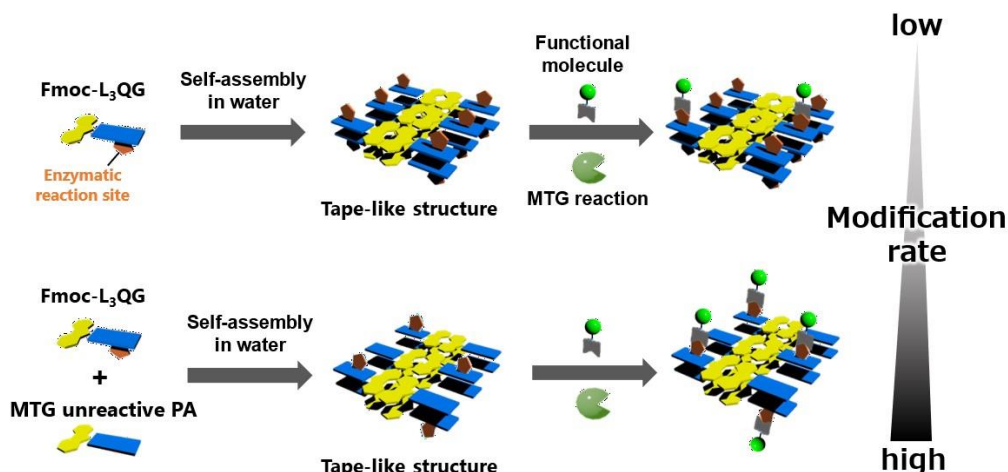


Fig. 1 Conceptual diagram of this study.

[1] R. Wakabayashi, *et. al.*, *Chem. Commun.*, **55**, 640-643 (2019)

[2] R. Wakabayashi, *et. al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 3459 (2021)

PG-Surfactant を用いた合成高分子の哺乳類細胞膜への提示法の検討

○中窪 樹・水野稔久* (名工大院工)

Evaluation of the Method to Present Synthetic Polymers onto Mammalian Cell Membranes by using PG-surfactants (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) NAKAKUBO, Tatsuki; MIZUNO, Toshihisa*

＜緒言＞任意の合成高分子を細胞表面へ提示できる技術、あるいは細胞内部へ取り込ませる技術の開発は、ケミカルバイオロジー、創薬、DDS、細胞工学などの分野における、高分子化学の利用を広げる意味から興味深い。カチオン性の高分子を除き、一般に親水性合成高分子は細胞膜への相互作用は弱く、細胞内には自発的には取り込まれにくい。そこで細胞表面との相互作用を高めるためには、一般に疎水基やリガンド分子の導入、両親媒性を付与するなどの方法が取られるが、本研究では、近年我々の研究室で検討を進めている、長鎖疎水基を2本側鎖に含む両親媒性リポペプチド PG-surfactant (図1(a)) を親水性高分子に付与した場合の、細胞との相互作用、細胞膜・細胞内への分配挙動に関して評価を行っている。これまでに PG-surfactant 部分のペプチド配列として、細胞内への取り込みが比較的起こりにくい DKDKC₁₂K、ほとんど取り込まれない DKDKC₁₂D₃、一方で細胞内に取り込まれやすい DKDKC₁₂K₃ を採用し(図1(b))、これらのC末端側に親水性高分子であるポリアクリルアミド (PA、 $M_n = 1.5$ kDa) を修飾し(図1(c)) 哺乳類細胞である NIH3T3 細胞に添加したところ、DKDKC₁₂K、DKDKC₁₂K₃ を用いた場合については、添加1時間以内であれば細胞表面への選択的な提示が可能であることがわかっている。そこで本発表では、さらなる提示能の向上を目指し、DKDKC₁₂K₃ におけるカチオン残基クラスター(Lys)₃ の位置を N 末端側に移動した場合の効果、さらにリンカー部位(X-部位)における-Asp-Lys-Asp-Lys-の配列への疎水残基の変異導入の効果を評価した。

＜実験と結果＞一連の PG-surfactant 修飾 PA の合成は、PG-surfactant 部分は Fmoc 固相合成法により行い、RAFT 重合により合成された末端にジチオピリジル基を導入した PA ($M_n = 1.5$ kDa) との S-S 結合を介した複合化後、逆相 HPLC を用いて単離精製を行なった。PG-surfactant 修飾 PA が細胞内外でどのように分配されるかは、NIH3T3 細胞を用いて、添加後 1h、24h における分配挙動を共焦点顕微鏡観察により行なった。その結果、以前に最も高い割合で細胞膜への分配が見られた DKDKC₁₂K₃ を用いた場合と比較し、K₃-DKDKC₁₂ ではより高い細胞膜への提示挙動が確認された(図2)。興味深い点としては、添加1時間、24時間後において、過剰な試薬を除きさらに細胞表面を PBS バッファーにて洗浄を行なっても、細胞膜上に分配された分子がそのまま残留していたことから、安定な高分子の細胞膜上への提示が可能となることがわかった。また一部分子に関しては、添加24時間後においては細胞内への導入も見られた。紙面の都合上、PG-surfactant 部分の疎水性を増やした K₃-DWWKC₁₂、K₃-DWWKC₁₂ を用いた場合の結果に関しては、当日発表にて報告を行う。

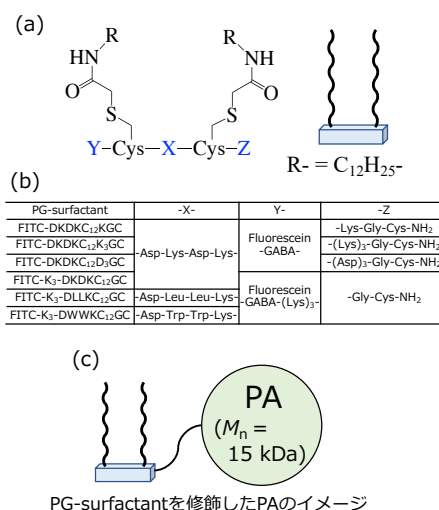


図1 PG-surfactant の基本構造(a)とポリアクリルアミド(PA)への修飾に用いた蛍光ラベル化した PG-surfactant 部分の配列一覧(b)、さらに PG-surfactant を修飾した PA のイメージ図(c)

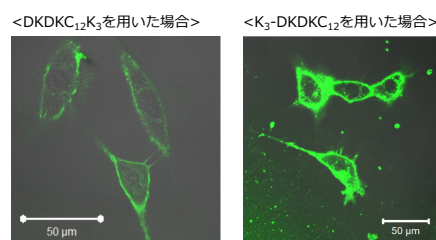


図2 PG-surfactant 修飾 PA の NIH3T3 細胞膜表面への分配挙動の評価 (10 μ M の濃度で添加1時間後に過剰な試薬を除いて、CLSM 測定した画像の比較)

疎水性タグ化合物による神経変性疾患関連タンパク質の分解誘導

○平井 景梧¹、山下 博子²、友重 秀介¹、三島 祐悟¹、佐藤 伸一^{1,3}、
橋本 祐一²、石川 稔¹ (¹東北大院生命、²東大定量研、³東北大学際研)

Targeted degradation of mutant huntingtin mediated by hydrophobic tag (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University¹, IQB, University of Tokyo², Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University³) Keigo, Hirai¹; Hiroko, Yamashita²; Shusuke, Tomoshige¹; Yugo, Mishima¹; Shinichi, Sato^{1,3}; Yuichi, Hashimoto²; Minoru Ishikawa¹.

一部の神経変性疾患では患者の脳組織において凝集性の変性タンパク質が認められ、これが発症原因と考えられている¹。凝集タンパク質は従来の創薬手法では対応が難しいため根治療法が存在せず、これらに対して新しい創薬戦略が求められている。世界に先駆けた成果として、所属研究室では【凝集タンパク質のリガンド】と【ユビキチンリガーゼ (E3) のリガンド】を連結させた小分子 PROTACs が凝集タンパク質を分解へ導くことを過去に見出している²。一方で臨床での実用化を考えると、患者の脳に化合物を作用させるためには、化合物が血液脳関門 (BBB) を透過しなければならない。PROTACs は分子量が大きく水素結合受容体/供与体の数も多いため、BBB 透過性が低いと予想される。【標的タンパク質のリガンド】と【疎水性構造】を連結させた疎水性タグ (HyT) は、標的タンパク質の表面に疎水性構造を人工的に露出させ、これをタンパク質の変性と認識したタンパク質品質管理機構によって分解させることができる³。そこで本研究では、水素結合受容体/供与体の数が少なく、低分子量の疎水性基を持つ HyT 化合物を創製し、より中枢薬らしい構造の凝集タンパク質分解薬への展開を目指す (図 1)。

凝集タンパク質のプローブと疎水性からなる HyT 化合物を 7 種類設計・合成した。凝集タンパク質としてハンチントン病の原因となる変異型ハンチンチンタンパク質 (mHtt) を発現させた細胞に、合成した HyT 化合物を処理したところ、細胞中の mHtt の存在量を選択的に減少させた。特に HyT の疎水性構造が嵩高いほど強い活性が認められ、疎水性構造の嵩高さが mHtt 分解促進活性に影響するという新たな知見が得られた。また、BBB モデルとして固定化人工膜 (IAM) カラムを用い、予備的な脳移行性の評価を行った。その結果、いずれの HyT 化合物も既存の PROTAC よりも脳移行性が高いことが示唆された。さらに、作用機序解析の結果、本研究により見出した HyT 化合物は、シャペロンタンパク質が関与するタンパク質品質管理機構を介してプロテアソームによる分解へと導くことが明らかになった。

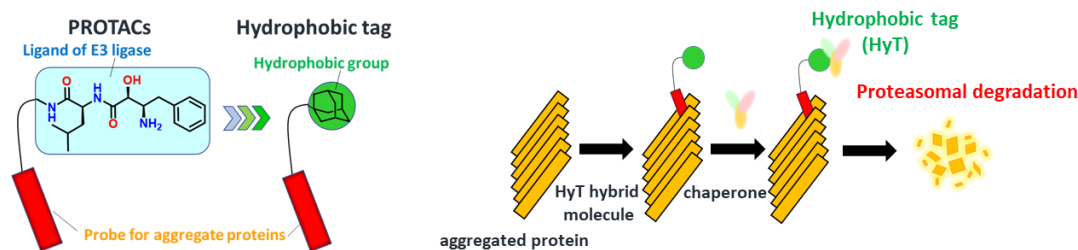


図 1. 疎水性タグ法による凝集タンパク質分解機構

【参考文献】 [1] Gatchel JR.; Zoghbi HY. *Nat Rev Gene.* **2005**, *6*, 743-755. [2] Tomoshige, S.; Nomura, S.; Ohgane, K.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56*, 11530–11533. [3] Neklesa, T. K.; Tae, H. S.; Schneckloth, A. R.; Stulberg, M. J.; Corson, T. W.; Sundberg, T. B.; Raina, K.; Holley, S. A.; Crews, C. M. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 538–543.

酸素感受性イオンチャネル TRPA1 動態の定量解析に向けた

cpHalo-tag 修飾

○杉原佑太郎¹・曾我恭平¹・小島憲人¹・森泰生²・清中茂樹¹ (¹ 名大院工、² 京大院工)

cpHalo-tag labeling to quantify O₂-sensitive ion-channel TRPA1 trafficking. (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Graduate School of Engineering, Kyoto University²) SUGIHARA, Yutaro¹; SOGA, Kyohei¹; OJIMA Kento¹; MORI, Yasuo²; KIYONAKA, Shigeki¹

Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1)は酸素感受性のイオンチャネルであり、ガンの低酸素抵抗性との関連が示唆されている。TRPA1 の活性化と細胞内動態変化が関連するため、細胞表層に発現する TRPA1 を蛍光標識してその動態を定量解析することは、細胞のガン化メカニズムの解明に繋がると考えられる。Halo-tag などの self-labeling タンパク質を細胞外の末端に融合することで細胞膜表層のタンパク質を迅速に蛍光ラベル化することが可能であるが、TRPA1 のように両末端が細胞内に存在するタンパク質の細胞表層選択的なラベル化は困難であった。本研究では、TRPA1 の機能に摂動を与えずに細胞外ループへ Halo-tag を導入し、細胞表層選択的なラベル化法の開発に着手した。具体的には Halo-tag の本来の末端を人工のリンカーで繋ぎ、新たな末端を作り出す circular permutation を施した cpHalo-tag を TRPA1 の細胞外ループに融合した。cpHalo-tag に関しては、Halo-tag 本来の N, C 末端を繋ぐリンカー長及び、新たに作製した末端と TRPA1 を繋ぐリンカー長の最適化を行い、チャネル活性への影響を最小限に抑えた cpHalo-tag 融合 TRPA1 を作製した。この cpHalo-tag 融合 TRPA1 に細胞膜透過性を持たない親水的な Halo-tag ligand で蛍光標識を行ったところ、反応性が低く十分な蛍光強度が得られなかった。そこで第一段階目のラベル化で疎水的なトランスシクロオクテン (TCO) をもつ高反応性の Halo-tag ligand (HTL-TCO) を Halo-tag に修飾し、第二段階目のラベル化で TCO と細胞膜非透過性の蛍光標識テトラジン (Tz probe) との逆電子要請型 Diels-Alder 反応を用いる two-step labeling により細胞膜表層 TRPA1 の迅速な蛍光ラベル化に成功した。

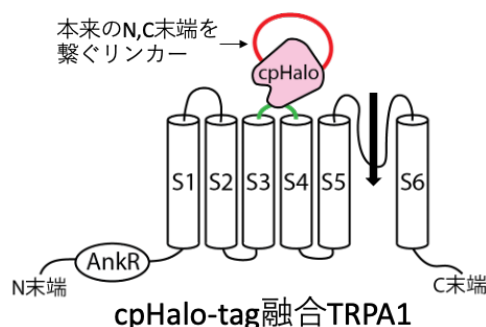


Fig. 1 Design of cpHalo-tag fused TRPA1 (cpHalo-TRPA1).

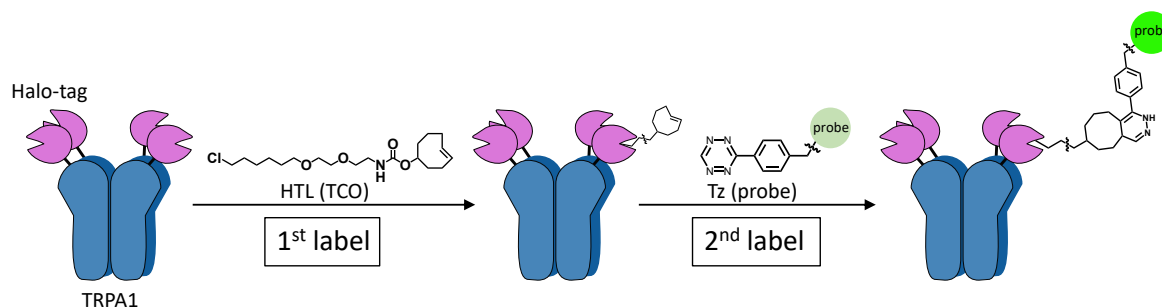


Fig. 2 Schematic illustration of bioorthogonal two-step labeling to cpHalo-TRPA1.

分子中央部へのアルキレン鎖導入によるペプチド集積化と生物学的機能化

○矢口敦也¹・平松弘嗣²・味岡逸樹^{3,4}・村岡貴博^{1,4} (1東京農工大院工、2国立陽明交通大、3東京医歯大 CBIR、4KISTEC)

Biofunctionalization of peptides by insertion of central alkylene chains (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology¹, National Yang Ming Chiao Tung University², Center for Brain Integration Research, Tokyo Medical and Dental University³, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology⁴) YAGUCHI, Atsuya¹; HIRAMATSU, Hirotsugu²; AJIOKA, Itsuki^{3,4}; MURAOKA, Takahiro^{1,4}

疎水性相互作用は、水中における集合体構造と特性を制御する主要な非共有結合である。蛋白質では、疎水性アミノ酸残基間の疎水性相互作用が、フォールディングの駆動力として働く。この時、疎水性ドメインは分子内部に配置される。ここで蛋白質の疎水性ドメインは、一部露出し、基質分子や補因子の取り込み機能を担う¹⁾。このような集合体形成や機能発現に重要な役割を持つ疎水性相互作用は、人工超分子材料でも積極的に組み込まれ、活用されている。例えば、片末端にアルキル基を結合させたペプチド(PA)は、アルキルテールの疎水性により自己集合する。アルキル基の長さに応じ、PA はシリンダー型ミセルや球状ミセルなど、多様な集合構造を形成する²⁾。一方で、蛋白質とは異なり、疎水的なドメインは分子集合体内部に局在し、従って PA 集合体の特性は、主として表面に露出したペプチド部分の親水的なアミノ酸配列により調節される。疎水性相互作用を、分子集合体の形体制御と、表面への露出による機能発現の両方に利用することは、蛋白質に見られる多用かつ高度な分子機能の発現に繋がると考えられるが、それを実現させる分子設計指針については十分には確立されていない。

そこで我々は、疎水性相互作用による集合体形成と機能発現の両立を目指すアプローチとして、アルキレン鎖を自己集合性ペプチドの中央へと導入することを着想した(Fig. 1)。直線状に伸びたコンフォメーションの分子が、一次元的に集合することでナノファイバーを構築し、アルキレン鎖部分が一部表面部へ露出すると考えられる。Arg-Ala-Asp-Ala が4回繰り返された配列からなるナノファイバー形成両親媒性ペプチド RADA16 の、分子中央部(8位)の Ala 残基を長さ C2、C3、C4 のアルキレン鎖に置換した A8βAla、A8Abu、A8Ape を開発した³⁾。電子顕微鏡観察から、いずれも水中で超分子ナノファイバーの形成が示された(Fig. 2)。X線回折測定から、いずれのアルキレン鎖導入ペプチドも、RADA16 と同様の直鎖状コンフォメーションを形成していることが示された。興味深いことに、C2 以上のアルキレン鎖を導入することで、超分子ファイバーの表面疎水性が著しく向上し、細胞接着性が大幅に低下する特徴的な生物学的機能が見られた(Fig. 3)。ペプチド中央部へのアルキレン鎖導入が、集合構造形体を保持したまま、超分子ナノファイバーの表面特性と生物学的機能の制御に有効であることが示された。

1) H. A. Scheraga *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13057–13061.

2) M. P. Hendricks *et al.* *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2440–2448.

3) A. Yaguchi *et al.* *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 9295–9301.

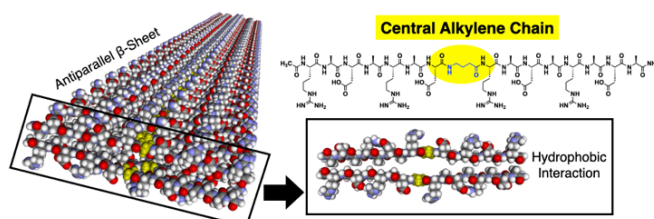


Fig. 1 A schematic image of packing structure of A8Abu.

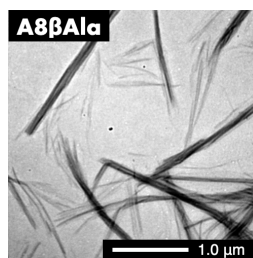


Fig. 2 A transmission electron micrograph of A8βAla.

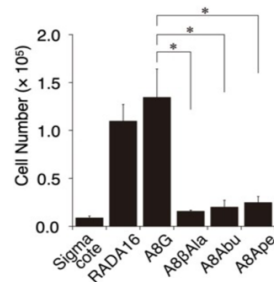


Fig. 3 A histogram displaying the number of fibroblasts attached on glass surfaces coated with SigmaCote and peptides.

維持メチル化機構解明を指向したジユビキチン化 PAF15 タンパク質の化学合成

○高橋侑也¹・郡聡実²・有田恭平²・林剛介¹・村上裕¹ (¹名大院工, ²横浜市大 医)

Synthesis of dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism
(Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University²) TAKAHASHI, Yuya¹; KORI, Satomi²; ARITA, Kyohei²; HAYASHI, Gosuke¹; MURAKAMI, Hiroshi¹

DNA メチル化は遺伝子発現の制御に必須の修飾であり、複製後に新生 DNA 鎖にメチル化を付与するのが維持メチル化機構である。近年、ジユビキチン化された PAF15 タンパク質を介した維持メチル化複合体の存在が生化学実験から推測された¹⁾。この複合体の構造をクライオ電子顕微鏡観察等の構造解析で解析するためには、ユビキチンが 2 箇所に入ったジユビキチン化 PAF15(PAF15Ub2)の調製が必要となるが、通常の遺伝子工学的手法でユビキチン化されたタンパク質の作製は困難である。そこで、本研究では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」を用いて PAF15Ub2 の作製を試みた。タンパク質化学合成法はペプチド固相合成とペプチド連結反応からなり、ペプチド固相合成法で翻訳後修飾を位置選択的に導入できる。ペプチド連結反応で最もよく用いられるものが NCL(Native Chemical Ligation)²⁾であり(Fig. 1)、これまでに 200 種類を超えるタンパク質が化学合成されている。

ユビキチンのようなタンパク質性の翻訳後修飾の場合も分岐ペプチドを用いることで作製が可能となる。PAF15 は 110 残基、ユビキチンは 76 残基からなるタンパクで、PAF15 の N 末端から 14 番目と 23 番目のリシンの側鎖にアミド結合を介してユビキチン C 末端が修飾される。全長 PAF15Ub2 をいくつかのペプチド断片に分割するか、について実際にペプチド断片を合成することで検証した結果、全体を計 5 つの断片に分けて合成を行うこととした(Fig. 2A)。分岐ペプチドは側鎖を Alloc 保護したリシンを導入し、主鎖の合成後に Pd 触媒

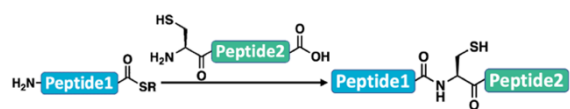


Fig 1. Scheme of native chemical ligation(NCL)

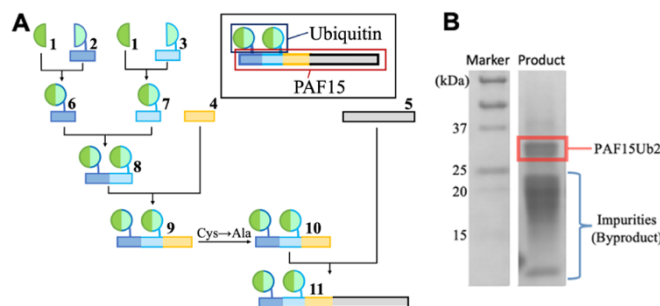


Fig 2. Synthesis of PAF15Ub2. (A) Ligation scheme of PAF15Ub2. (B) Result for SDS-PAGE analysis.

による選択的な脱保護とそれに続くペプチド固相合成法によって作製を行なった。また、NCL でチオエステルとして反応させる断片は C 末端をチオエステル前駆体であるヒドラジドとして合成し、断片 3 の主鎖の C 末端は NCL 後にワンポットで脱保護が可能なシステインの保護体チアゾリジンを導入した。NCL の順序としてはまずユビキチン断片を繋いだのち、N 末端側から C 末端側に向けて、途中脱硫反応を途中に挟んで順に連結した。そして最終的に得られた生成物を SDS-PAGE によって確認すると、純度は高くないものの生成物のバンドが確認された(Fig. 2B)。以上より、5 種類のペプチド断片を、N 末端側から順次に連結させることで、262 アミノ酸からなる PAF15Ub2 の合成ルートを達成した。

- 1) A. Nishiyama, D. B. Mulholland, S. Bultmann, S. Kori, A. Endo, Y. Sacki, W. Qin, C. Trummer, Y. Chiba, H. Yokoyama, S. Kumamoto, T. Kawakami, H. Hojo, G. Nagae, H. Aburatani, K. Tanaka, K. Arita, H. Leonhardt, M. Nakanishi, *Nat. Commun.*, **11**, 1222 (2020)
- 2) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science*, **266**, 776 (1994)

ケトンの不斉水素化反応を触媒する人工金属酵素の開発

○石井俊宏・吉岡紗穂・松本隆聖・丸毛智史・藤枝伸宇（阪府大院生環）

Development of artificial metalloenzymes for stereoselective Asymmetric transfer hydrogenation reaction

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University) ISHII, Toshihiro; YOSHIOKA, Saho; MATSUMOTO, Ryusei; MARUMO, Tomohito; FUJIEDA, Nobutaka

近年、タンパク質に金属錯体を結合させたハイブリッド触媒である人工金属酵素¹の構築が注目を集めている。これは遷移金属の反応性に加えてタンパク質を反応場として用いることで、高効率で、高立体選択的な反応を実現することができるかと期待されている。当研究室では超好熱菌由来の TM1459 タンパク質²を土台タンパク質として用いて（図 1）、このタンパク質が持つ 4 つのヒスチジン残基 (His52, His54, His58, His92) からなる金属結合部位に直接金属イオンを結合させることで、より簡便に人工金属酵素を構築する手法を開発してきた。本研究では、活性点のさらなる多様化を目指して、有機金属錯体を直接ヒスチジン残基に結合させる。第一配位圏にある 4 つのヒスチジン残基のうち 3 つをアラニンに変異させた変異体 (H52A/H54A/H58A, H52A/H54A/H92A, H52A/H58A/H92A, H54A/H58A/H92A) を構築し、3 種類の有機金属錯体 (Ru(p-cymene), RhCp*, IrCp*) を導入することでエナンチオ選択的な不斉水素化反応のスクリーニングを行なった。

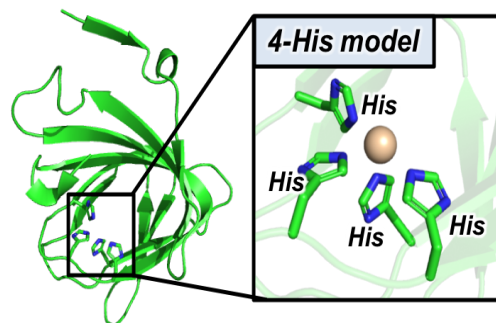


Fig 1. Cupin-type protein (TM1459)

基質としてトリフルオロアセトフェノン、還元剤としてギ酸ナトリウムを用いてケトンの不斉還元を行った（図 2）。有機金属錯体のみを用いた場合には反応がほとんど見られなかったのに対し、構築した変異体を用いたところ、Ru(p-cymene)を結合させた H52A/H54A/H92A では鏡像体過剰率 68%で S 体、Ru(p-cymene)を結合させた H54A/H58A/H92A ではエナンチオ選択性が反転し、鏡像体過剰率 84%で R 体を優先的に生成することが確認できた。また、金属中心近傍にはシステイン残基が存在したため、導入した有機金属錯体の非特異的な結合を防ぐため、このシステインをアラニンに変異させた変異体でも検討を行った。本発表ではこれらの詳細に加え、さらなる変異導入による選択性の向上について議論する。

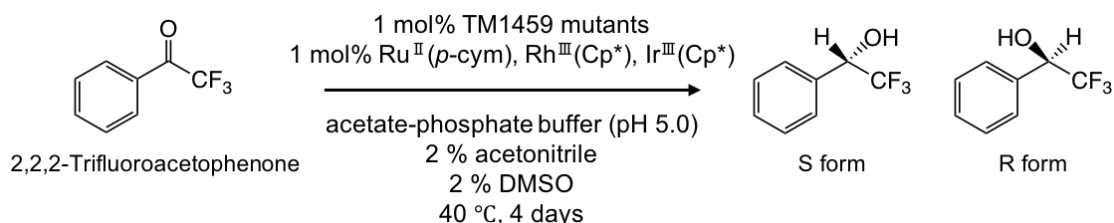


Fig 2. Model reaction employed in this study

- 1) (a) Schwizer, F.; Ward, T. R. et al., *Chem. Rev.* 2018, 118 (1), 142–231. (b) Hoarau, M.; Faller, P. et al., *Coord. Chem. Rev.* 2016, 308, 445–459. (c) Rioz-Martínez, A.; Roelfes, G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015, 25, 80–87.
 2) (a) Fujieda, N.; Itoh, S. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, 139, 5149. (a) Fujieda, N.; Itoh, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2020, 59, 7717.

ペルオキシレドキシシン十量体リング構造を用いた蛋白質の捕捉

○宇津拓実¹・石森浩一郎¹・内田毅^{1,2} (¹ 北大院総化、² 北大院理)

Trapping Proteins Using Peroxiredoxin Decamer Ring Structure (Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido University¹, Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University²) UTSU, Takumi¹; ISHIMORI, Koichiro^{1,2}; UCHIDA, Takeshi^{1,2}

ペルオキシレドキシシン(Prx)は、細胞毒である過酸化水素をチオレドキシシン依存的に分解する抗酸化蛋白質である。PRX1 の十量体は 5 つの二量体からなる特徴的なリング構造を示すことから(Fig. 1)、その中央の細孔を利用した物質輸送が期待される。そこで本研究では、PRX1 による蛋白質の捕捉の制御を試みた。

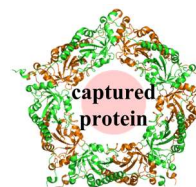


Fig 1. PRX1 and captured protein.

捕捉される蛋白質には、PRX1 の細孔 (直径約 64 Å) よりも小さなシトクロム *c*₅₅₂ (Cyt *c*₅₅₂) (分子直径約 28 Å) とミオグロビン(Mb) (分子直径約 43 Å) を用いた。捕捉による分子量の増加を蛍光異方性の変化として追跡するため、蛍光色素である 1,5-IAEDANS でそ

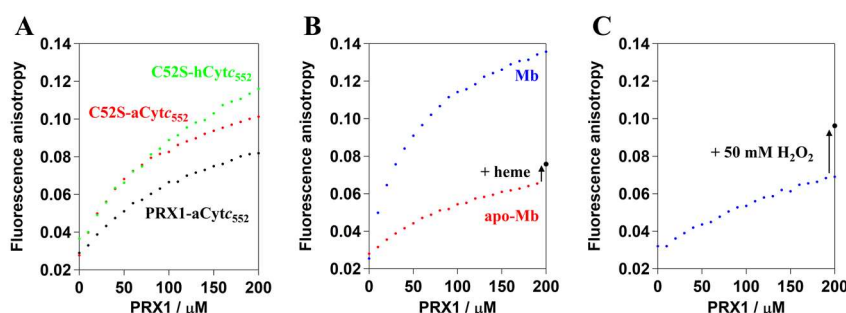


Fig 2. (A) PRX1 (wild-type or C52S)-induced fluorescence anisotropy change of cytochrome *c*₅₅₂. (B) PRX1 (C52S)-induced fluorescence anisotropy change of Mb in the absence and presence of heme (C) PRX1-induced fluorescence anisotropy change of Mb in the absence and presence of H₂O₂

れぞれ標識した。ヘムと共有結合を形成できない変異体 Cyt *c*₅₅₂ を利用することで、ヘムとの結合による、細孔への捕捉の制御を試みた。

まず、ヘムが結合していない 1 μM apo-Cyt *c*₅₅₂(aCyt *c*₅₅₂)に PRX1 を滴下し、蛍光異方性を測定したところ、異方性の値が増大した。見かけの分子量が大きくなったことから、aCyt *c*₅₅₂ の PRX1 への捕捉が確認できた(Fig. 2A 黒)。しかし、20 当量の PRX1 を加えても異方性の値が飽和しなかったことから、その捕捉能は低いと考えられた。そこで、細孔構造の変化により捕捉能を変化させるため、PRX1 の二量体内の単量体間に位置する Cys52 を Ser に置換した変異体(C52S)を作成した。この C52S 変異体では、異方性の値は野生型より大きくなり、捕捉能が上昇した (Fig. 2A 赤)。この C52S 変異体を用いて、aCyt *c*₅₅₂ のヘム結合による PRX1 との捕捉能の変化を検討するため、holo-Cyt *c*₅₅₂ (hCyt *c*₅₅₂)についても同様に検討したところ、aCyt *c*₅₅₂ と同程度の異方性の値であり、aCyt *c*₅₅₂ のヘムの結合に伴う構造変化は捕捉能に影響を与えなかった (Fig. 2A 緑)。一方、より分子直径の大きな Mb に C52S 変異体を加えたところ、Cyt *c*₅₅₂ より異方性の値が大きかった(Fig. 2B 青)。しかし、ヘムを結合していない apo-Mb の異方性の値は小さく、ヘムの結合による捕捉能の違いが顕著であった。そこで、apo-Mb にヘムを添加したところ、異方性値が増大したことから(Fig. 2B 赤、黒)、ヘムの結合により、PRX1 への捕捉の制御が可能になることがわかった。

さらに、Prx の中には過酸化水素との反応により十量体リングが積層した筒状構造を形成することが知られていることから、リング構造の三次元形状の変化により、捕捉の制御が可能か検討した。PRX1 を DTT で還元すると異方性の値は大きく減少したが(Fig. 2C 青)、過酸化水素を添加したところ、異方性の値が増大し、捕捉能が上昇した(Fig. 2C 黒)。

以上の結果から、PRX1 は、ヘムの添加による捕捉蛋白質の構造変化、あるいは PRX1 のリング構造の変化によって蛋白質の捕捉能が制御可能であり、今後は捕捉能の向上やより精密な制御を試みる。

アシル化マクロピノサイトーシス誘導ペプチドによる細胞外小胞の細胞内送達

○中川優奈¹・Jan Vincent V. Arafiles¹・広瀬久昭¹・二木史朗¹ (¹京大化研)

Intracellular delivery of extracellular vesicles using acylated macropinocytosis-inducing peptide (Institute for Chemical Research, Kyoto University¹) Yuna Nakagawa¹; Jan Vincent V. Arafiles¹; Hisaaki Hirose¹; Shiroh Futaki¹

マクロピノサイトーシスはエンドサイトーシスの一種で、外的刺激により誘起される細胞骨格タンパク質アクチンの重合と細胞膜の波打ち状態に引き続いて起こる大規模な液相の取り込みである。マクロピノサイトーシスは他のエンドサイトーシスに較べて、大きな分子を細胞内に取り込むことができるため、これを誘導することで効率的な細胞内送達が行える。我々は以前にマクロピノサイトーシス誘導ペプチド P4A (YRCACRFF-amide) の細胞内送達における有用性を示している¹⁾。P4A は強力なマクロピノサイトーシス誘導能を持つが、その活性は血清を含む培地中でほとんどなくなることが課題であった。血清タンパク質の存在下では、P4A が細胞膜と相互作用しにくくなるのがこの原因であると考え、本研究では、P4A のN末端をアシル化することで、細胞膜との相互作用を高めることにより、血清存在下においてもマクロピノサイトーシスによる取込が誘起できるかについての検討を行った。また、近年、薬物送達キャリアとして注目されている細胞外小胞 (EVs) の細胞内送達促進効果についても評価した。

炭素数 2~18 の長さの異なる飽和脂肪酸で P4A をアシル化し(Fig 1)、血清を含む培地中においてマクロピノサイトーシスのマーカータンパク質である 70kDa デキストランの取り込みを評価することでスクリーニングを行った。その結果、炭素鎖が長いほどより高い活性を示し、C18-P4A で最も高い活性を示すことが明らかになった(Fig 2)。また P4A に含まれる 2 つのシステインが分子内架橋された oxP4A が活性本態であることが報告されており¹⁾、C18-P4A においても酸化型のほうが高い活性を示した。この C18-oxP4A 存在下に、EVs を細胞に投与すると、より効率的に細胞内に送達できることが明らかになった。

1) Arafiles *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.*, 60, 11928 (2021)

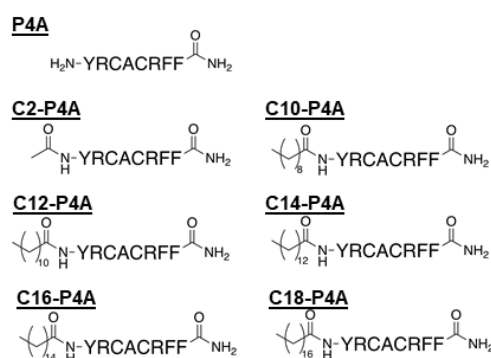


Fig. 1. Peptide sequences

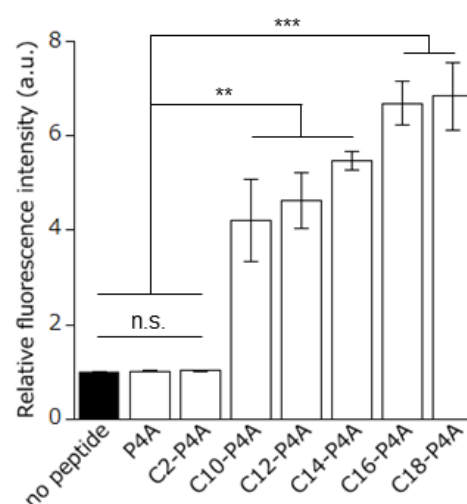


Fig 2. 70 kDa dextran uptake in the presence of serum.

固定化駆動法によるマウス脳内での mGlu1 リガンドの動態解析

○美野 丈晴¹・天池 一真¹・野中 洋^{1,2}・坂本 清志¹・浜地 格^{1,2} (¹京大院工、²JST ERATO)

Exploring the mGlu1 ligand dynamics in mouse brain by fixation-driven chemical crosslinking. (Graduate School of Engineering, Kyoto University¹, JST ERATO²) MINO, Takeharu¹; AMAIKE Kazuma¹; NONAKA Hiroshi^{1,2}; SAKAMOTO Seiji¹; HAMACHI Itaru^{1,2}.

我々動物の組織は、タンパク質や核酸、脂質、糖鎖など様々な生体分子によって構成され、それらの発現や分布が三次元的に厳密に制御されることで、創発的な高次機能を発現している。したがって、組織中に存在する生体分子の三次元分布を、生きた状態のまま維持し解析できる技術は、生物学や医学分野のみならず、創薬や農学、化学分野においても有用である。近年開発された CLARITY、Scale、CUBIC に代表される透明化技術では、組織中に形成されるヒドロゲル網目構造を足場とし、タンパク質や RNA といった生体高分子の組織内分布情報を固定することで、生体高分子の三次元イメージングを可能としている。これら組織透明化技術は強力なツールであるが、ヒドロゲル網目に小分子化合物を固定することが困難なため、薬剤や分子プローブなどの解析に用いられた報告例は無い。

以上の背景をふまえ、当研究室では小分子の生体組織内分布を可視化するための新規ケミカルバイオロジー手法として、パラホルムアルデヒド (PFA) 組織固定法を発展させた固定化駆動法 (fixation-driven chemical crosslinking: FdCC) の開発を行っている。本手法では、小分子リガンドに、PFA ポリマーと反応可能なアミノ基を修飾した固定化駆動化学プローブを動物個体に投与した後、PFA 処理を施す。プローブ上のアミノ基が PFA ポリマーと迅速に共有結合形成し、リガンド-タンパク質間相互作用に基づいた組織内分布が固定される (Fig. a)。この原理で、タンパク質と相互作用した小分子リガンドの生きた状態の組織内分布を解析できると期待される。本研究では、代謝型グルタミン酸受容体 (mGlu1) のリガンドである CNITM を標的とした固定化駆動化学プローブの設計と合成を行い、培養細胞に強制発現させた mGlu1 およびマウス小脳内在性 mGlu1 と CNITM との相互作用を固定化駆動法の原理で可視化できることを明らかにした。さらにマウス全脳における CNITM の三次元分布イメージングと、時間依存的な動態の解析に成功した (Fig. b)。講演では以上の詳細について報告する。

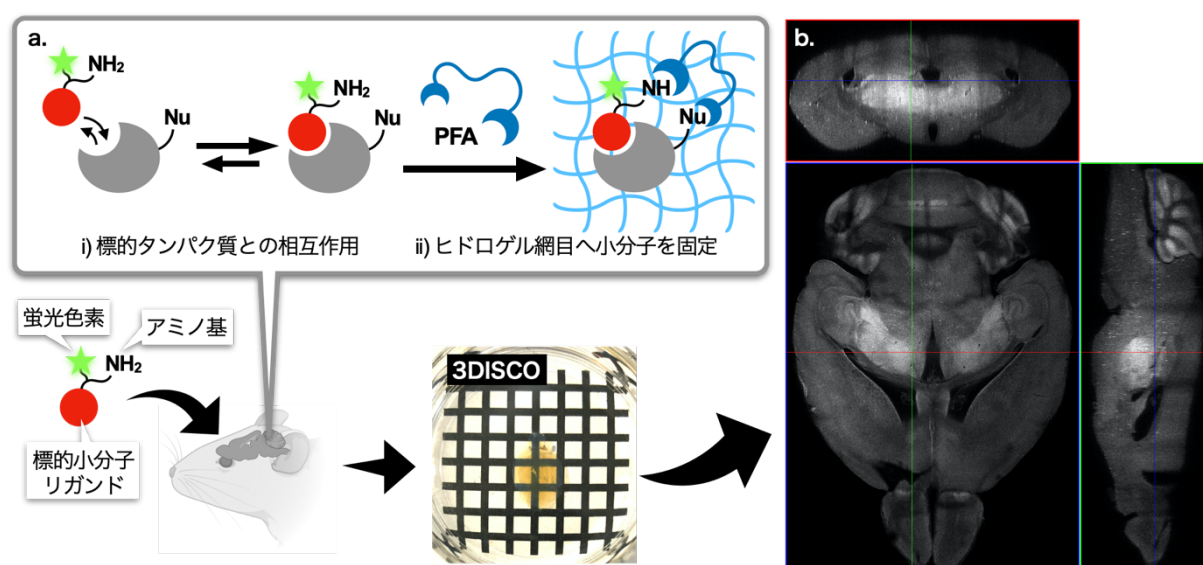


Fig. (a) Strategy of fixation-driven chemical crosslinking. **(b)** 3D CLSM imaging of mGlu1 ligand distribution in mouse whole brain.

リン酸基および細胞認識部位を有するコラーゲンモデルペプチドの合成評価

○堀 雅竜・富崎 欣也 (龍大院理)

Synthesis of Collagen Model Peptides with Phosphate Groups and Cell Recognition Sites.

(Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) OHORI, Garyu; TOMIZAKI, Kin-ya

【緒言】病気や外部からの強い刺激によって骨が欠損した場合の主な治療法として投薬治療、自家骨移植、人工骨の利用がある。人工骨の利用において人工骨の主成分であるヒドロキシアパタイトは高い骨親和性と吸着力をもっている。しかし、ヒドロキシアパタイト(HA)は無機物ゆえに硬く脆いため骨の組織になじみにくいといった課題が挙げられる。そのため、ヒドロキシアパタイトとコラーゲンを複合化することで、強度の増加や骨再生能力の向上を図る研究が行われている。しかし、天然コラーゲンを用いる場合、陸生生物由来の人獣共通感染症のリスクや水生生物由来の変性温度が低いといった課題があり、それらを改善するために感染症のリスクが少なく変性温度にすぐれ機能制御が容易な化学合成されたコラーゲンモデルペプチド(CMP)の利用が効果的と考える。本研究では、HAとの親和性をもつリン酸化セリンをN末端に有するCMP-2及びC末端付近に細胞認識部位(GFOGER)^[1]N末端付近にリン酸化セリンを配置したCMP-3をそれぞれ合成した。

CMP - 2 : Ac-S(OPO(OH)₂)-Ape(5)-(GPO)₁₀-G-NH₂CMP - 3 : Ac-S(OPO(OH)₂)-Ape(5)-(GPO)₈-GFOGER-G-NH₂

Ape(5) = 5-aminopentanoic acid O = hydroxyproline

Fig 1. Amino acid sequences of CMPs

【実験】まず、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-2及びCMP-3を合成し、逆相HPLCにより生成物の分離、得られた画分をMALDI-TOF-MSで同定した。そして、CDスペクトル測定を用いてCMPのトリプルヘリックス構造安定性を評価した。

【結果と考察】HPLCおよびMALDI-TOF-MSの測定の結果、CMP-2については3058(calc. 3055)、CMP-3については3182(calc. 3180)の分子イオンピークが確認されたので、リン酸化セリンのみを有するCMP-2(Fig. 2)および末端に細胞認識部位とリン酸化セリンを有するCMP-3(Fig. 3)の合成に成功したと考えられる。CDスペクトル測定からCMPは安定したトリプルヘリックス構造であることが確認された。

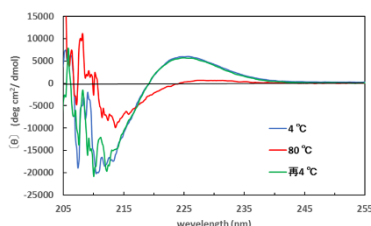


Fig 2. CMP-2 CD による橢円率

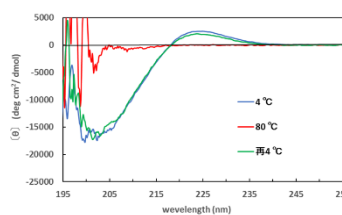


Fig 3. CMP-3 CD による橢円率

[1] Khew S. T. and Tong Y. W. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 3153-3161[2] Xiang Gao.et.al.*ACS Appl.Mater. Interfaces* **2016**, 8, 27594 - 27610

ALDH 由来ミトコンドリア移行シグナルを有するペプチド誘導体の

二次構造と細胞内動態評価

○高山 啓¹・山崎 正幸²・富崎 欣也¹ (¹龍谷大理工、²龍谷大農学)

Secondary Structure and Intracellular Dynamics of Analogs of Mitochondrial-Localization Signals Peptide Derived from ALDH (Department of Materials Chemistry¹, Department of Food Science and Human Nutrition², Ryukoku University) TAKAYAMA, Kei¹; YAMASAKI, Masayuki², TOMIZAKI, Kin-ya¹

ミトコンドリアは、ATP の産生や細胞自死に関与している細胞小器官であり、近年では、ミトコンドリアを標的化したドラッグデリバリーシステムの開発が盛んに行われている。当研究室では、ミトコンドリアへ輸送されるアルデヒド脱水素酵素(ALDH)を由来としたミトコンドリア移行シグナルを有するペプチドを用いて、ドラッグキャリアの細胞内局在について研究を進めている。MTS はカチオン性のペプチドで、中央部のグリシン-プロリン (G-P) 配列部で両端のヘリックスが折れ曲がり、ヘリックス-ヒンジ-ヘリックス構造を形成していると考えられる。本研究では、塩橋形成によるヘリックス安定化、カチオン性を下げることによる細胞毒性の低減、エンドソーム膜破壊を指向して N 末端から 4 残基目のロイシンから 13 残基目のアルギニンまでグルタミン酸に置換したペプチド誘導体を合成し、ペプチドの二次構造及び細胞内局在について評価した。MTS ペプチド誘導体として 10 種類のペプチドを設計した。オリ

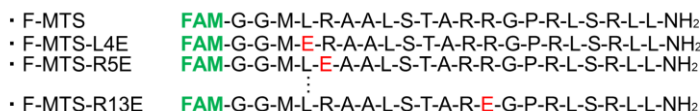


Fig1. MTS誘導体ペプチドのアミノ酸配列

ジナルペプチド (F-MTS) の N 末端から 4 残基目のロイシンをグルタミン酸に置換したペプチド (F-MTS-L4E) 、5 残基目のアルギニンをグルタミン酸に置換したペプチド (F-MTS-R5E) から 13 残基目のアルギニンまでグルタミン酸に置換したペプチド (F-MTS-R13E) をそれぞれ設計した。さらに、すべてのペプチドの N 末端にフルオレセインを用いて蛍光標識した (Fig.1) 。ペプチド濃度を 50 μ M とし、PBS 緩衝液 (pH7.4) 、トリフルオロエタノール (TFE) 、10 mM SDS 含有 PBS 緩衝液の 3 種の溶媒を用いて CD スペクトルによる二次構造評価を行なった。また、ペプチド濃度を 20 μ M に調製し、HeLa 細胞を用いて共焦点レーザー顕微鏡による細胞内局在性を評価した。CD スペクトルの結果、PBS 中ではすべてのペプチドで α -ヘリックス構造特有のピークが確認された。(Fig.1) また、TFE 中及び 10 mM SDS 含有 PBS 中では、すべてのペプチドで α -ヘリックス構造を形成すると考えられる。これらのペプチドを HeLa 細胞に添加したところ、すべてのペプチドにおいてミトコンドリアとリソソームへの局在が確認された。今後は、詳細なペプチドの細胞内局在性と細胞毒性、ペプチドの相電荷について関係を明らかにする予定である。本研究の一部は、2020 年度龍谷大学科学技術共同研究センタープロジェクトの支援を受けたものである。

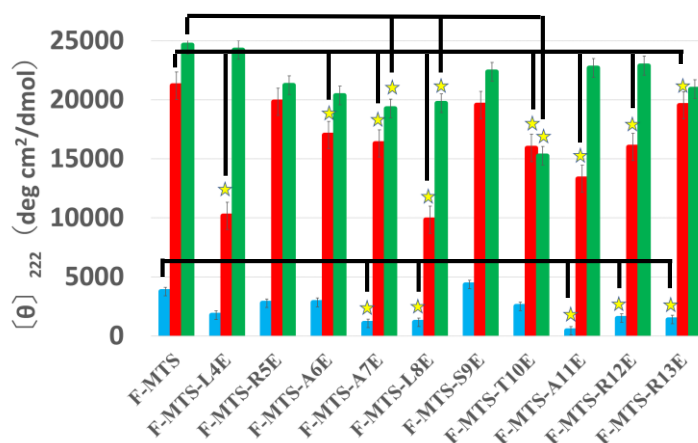


Fig2. MTS 誘導体ペプチドの 222 nm の残基円率。青 ; PBS, 赤 ; 10 mM SDS, 緑 ; TFE
星印は、それぞれ F-MTS を基準として $P < 0.01$ を表している

再構成無細胞翻訳系における4塩基コドンの多重探索法の開発

○渡邊 貴嘉・Novitasari Dian・芳坂 貴弘（北陸先端大マテリアル）

Method for Multiple Exploration of Four-base Codons in a Reconstituted Cell-free Translation System
 (School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology) WATANABE, Takayoshi;
 NOVITASARI, Dian; HOHSAKA, Takahiro

非天然アミノ酸のタンパク質への導入技術によって、タンパク質に様々な人工機能を付与することが可能となっている。これまでに、通常の3塩基からなるコドンに1塩基を付加した4塩基コドンに対して非天然アミノ酸を割り当てる4塩基コドン法を用いることで、複数種類の非天然アミノ酸をタンパク質の特定部位に同時に導入することを可能にしてきた。しかし、細胞内タンパク質発現系あるいは細胞抽出液由来の無細胞翻訳系では、3塩基による天然アミノ酸への翻訳と競合するため、使用頻度の低いコドン由来の4塩基コドンのみが利用されてきた。そこで本研究では、天然アミノ酸を欠如させた再構成無細胞翻訳系（PUREsystem）の使用により、3塩基による天然アミノ酸の翻訳を回避することで、非天然アミノ酸導入に利用可能な4塩基コドンの種類を大きく向上させることを目指した。また、4塩基コドンによる非天然アミノ酸の導入の可否を、質量分析により迅速に多重探索できる手法の構築を行った。

まず、開始コドン-His タグ-4塩基コドン-終止コドンからなる mRNA と、対応する4塩基アンチコドンを有する tRNA を T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により作製した。続いて、それぞれの tRNA に対して化学的アミノアシル化法により異なる種類の非天然アミノ酸を結合させた後に混合し、対応する mRNA 混合物とともにアミノ酸を欠如させた再構成無細胞翻訳系に添加した。その後、翻訳産物を精製し MALDI TOF-MS による質量分析を行うことで、それぞれの非天然アミノ酸導入ペプチドの質量ピークの有無から、翻訳可能な4塩基コドン进行を特定した（図1）。

はじめに、4種類の4塩基コドンについて同時に探索したところ、いずれも非天然アミノ酸の導入を確認することができた。さらに、8種類の4塩基コドンの同時探索も行ったところ、今回調べた8種類の4塩基コドンいずれも非天然アミノ酸の導入が確認された。

本手法により、さらに多くの種類の4塩基コドンについて非天然アミノ酸導入の可否を迅速に評価可能になると期待される。

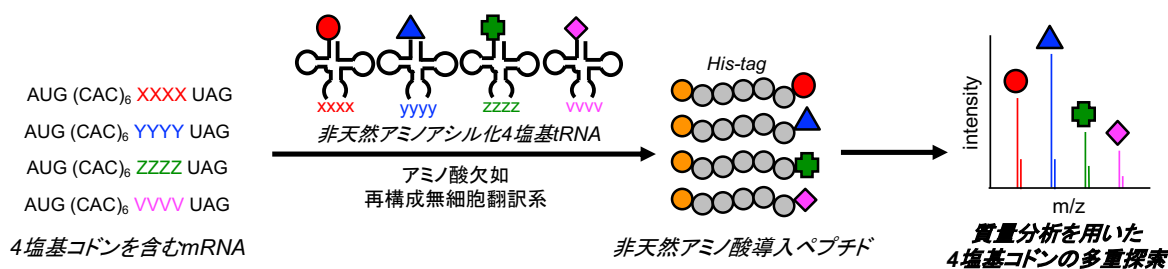


図1. 翻訳可能な4塩基コドンの多重探索法

開環メタセシス重合の基質となるノルボルネン類縁体を提示した アミロイド線維の調製

○植野喬成・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Preparation of Amyloid Fibril Displaying a Norbornene Analog as a Substrate for Ring-opening Metathesis Polymerization (Graduate School of Engineering, Osaka University) UENO, Takanori; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

分子モーターは生体内のシステムに用いられ、化学反応を巧みに制御し、物質輸送などの重要な役割を担っている。生体内の分子モータータンパク質として知られるキネシンやミオシンなどは、ATPの加水分解によるエネルギーを利用して、移動の土台となる微小管上を直線状に移動するため、特にリニア分子モーターと呼ばれている。近年、pH変化や酸化還元反応等を駆動とするリニア分子モーターを人工的に構築する試みが報告されている¹。これらの系には、軸分子が環状分子の輪の中を通っているロタキサンが利用されることが多いが、分子モーターに相当する環状分子の移動の土台となる軸分子を合成により長くする必要があり、長い距離を移動するリニア分子モーターの構築は困難である。我々は、移動の土台となる分子として、自己集合体の形成により自発的に繊維状になるアミロイド線維に注目した。またリニア分子モーターの駆動力となる化学反応として、Grubbs-Hoveyda II 触媒を用いた開環メタセシス重合 (ROMP) に着目した。オレフィンメタセシス反応は平衡反応であるが、ROMPに対して二重結合を有する歪んだ環状アルケンを基質として用いると、Grubbs-Hoveyda II 触媒を成長末端としてリビング重合が不可逆的に進行することが知られている。本研究では、アミロイド線維を形成するペプチドに ROMP の基質であるノルボルネン類縁体を修飾し、自己集合によりリニア分子モーターの移動の土台となる分子を新規に設計した (Fig. 1)。この土台分子に ROMP の触媒である Grubbs-Hoveyda II 触媒を反応させることで、リニア分子モーター系が構築可能であると考えた。

本研究で用いるペプチドは既報²を参考にして設計し、次のように合成した。まず、ノルボルネン類縁体をリジン残基の側鎖に化学修飾した非天然アミノ酸 X を合成し、次にこの残基を含む合計 22 残基のペプチド (KVKKVXVKVKT¹PD²PVKVKVXVKVK) を Fmoc-固相合成法により調製した。得られたペプチドを HPLC により精製し、凍結乾燥させ、150 mM NaCl を含む pH 7.0 の 100 mM リン酸カリウム緩衝液に溶かし、37 °C で一晩静置した。円二色性スペクトル、動的光散乱法により、ノルボルネン類縁体修飾ペプチドが β -sheet を形成し、1 μ m に達する自己集合体を形成していることを確認した。また、原子間力顕微鏡を用いて、大気中で測定したところ約 1 μ m の長さの繊維状構造体が直接的観察された。

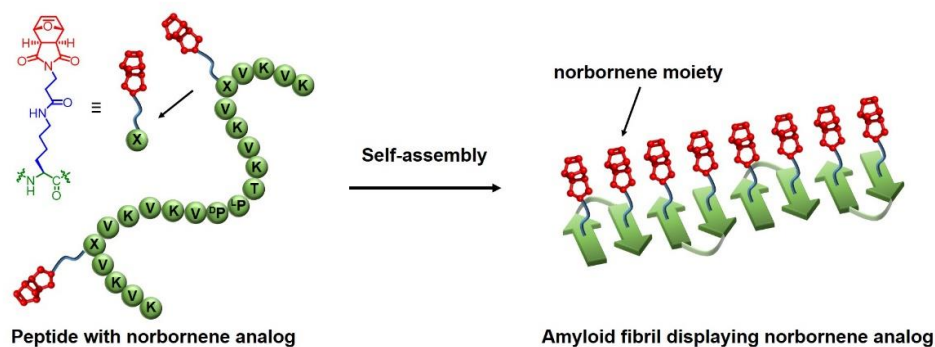


Fig. 1. Schematic representation of preparation for amyloid fibril displaying a norbornene analog.

- 1) J. F. Stoddart *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 18609-18620.
- 2) J. P. Schneider *et al.*, *Macromolecules*, **2010**, 43, 7924-7930.

メッセンジャーRNA のチオ修飾による翻訳開始反応の促進

○阿部奈保子¹・川口大輔¹・児玉亜有実¹・橋谷文貴¹・友池史明²・木村康明¹・清水義宏³・阿部洋^{1,4,5} (¹ 名大院理、 ² 学習院大理、 ³ 理研、 ⁴ JST-CREST、 ⁵ iGCORE)

Promotion of translation initiation of mRNA by phosphorothioate modification (Graduate School of Science, Nagoya University¹, School of Science, Gakushuin University², Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN³, JST-CREST⁴, Institute of Glyco-core Research, iGCORE⁵) ABE, Naoko¹; KAWAGUCHI, Daisuke¹; KODAMA, Ayumi¹; HASHIYA, Fumitaka¹; TOMOIKE, Fumiaki³; KIMURA Yasuaki¹; SHIMIZU Yoshihiro³; ABE, Hiroshi^{1,4,5}

メッセンジャーRNA (mRNA) を細胞内に導入すると、タンパク質合成反応が引き起こされる。これに基づき、mRNA を医薬品として用いることが出来る。実際に、現在、新型コロナウイルス感染症に対する mRNA ワクチンが全世界的に使用されている。しかしながら、mRNA 医薬品には、①mRNA が核酸分解酵素で容易に分解され、生体内では非常に不安定である、②タンパク質発現量が不十分である、という2つの課題がある。一般に、核酸に化学修飾を導入することで、生体内安定性を向上させることが出来る。しかし、多くの場合、mRNA への化学修飾の導入はリボソームをはじめとした種々のタンパク質翻訳因子の認識や働きを阻害してしまい、その結果、タンパク質合成効率を低下させてしまう。我々はタンパク質合成効率を低下させることなく mRNA の安定性を向上させる化学修飾の開発を模索し、リン酸部位の酸素原子を硫黄原子に置換したホスホロチオエート修飾 (PS 修飾) に着目した (図1)。

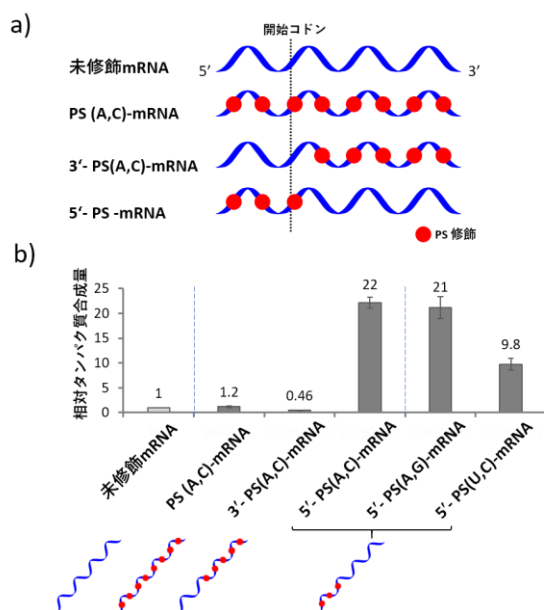


図2 (a) PS 修飾を持つキメラ mRNA の設計。
(b) 5' 非翻訳領域のみに PS 修飾した mRNA (5'-PS-mRNA) が高い翻訳効率を示した。

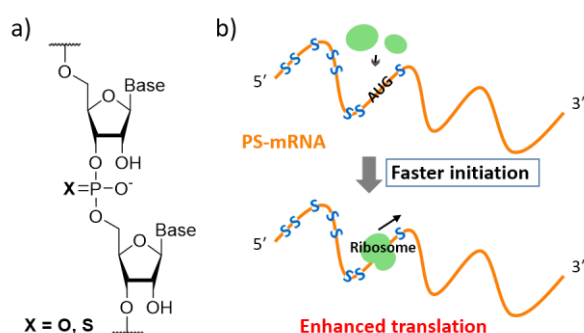


図1. (a) ホスホロチオエート修飾を含む RNA 鎖の化学構造。(b) 本研究の概要。

再構成型大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いてその翻訳効率を評価したところ、未修飾のものと比較し、翻訳産物量の増加が観察された。翻訳反応のシングルターンオーバー条件を作成し、速度論解析実験を実施した結果、PS 修飾 mRNA では未修飾 mRNA に比べて翻訳反応の開始反応が促進されていることが示された。本結果から 5' 非翻訳領域部分にのみ PS 修飾を導入した mRNA の設計・合成を行った。これら位置特異的に PS 修飾を導入した mRNA は約 20 倍のタンパク質合成効率を示した。本実験結果は mRNA に位置特異的に化学修飾を導入することで mRNA の機能を向上させることを示すものである。

蛍光 RNA アプタマー17-3 の 2 次構造解明を目指した生化学解析

○安部 俊輔¹、小山 孝紀¹、松村 茂祥^{1,2}、井川 善也^{1,2} (富山大院理工)

Biochemical analysis of the light-up RNA aptamer 17-3 to elucidate its active secondary structure.

(¹ Graduate School of Science & Engineering, University of Toyama, ² Graduate School of Innovative Life Science, University of Toyama.) ABE, Shunsuke¹; KOYAMA, Takaki¹; MATSUMURA, Shigeyoshi^{1,2}; IKAWA, Yoshiya^{1,2}

蛍光 RNA アプタマーは、単体では蛍光能の低い色素分子と相互作用することで、その蛍光発光を強く増強する RNA アプタマーの総称である。蛍光 RNA アプタマー17-3 (Fig.1) は、GFP の発色団 HBI を改変した DMHBI (Fig.2) と結合し、その蛍光を増強することが報告されているが、構造面の知見はない[1]。本研究では、1) 17-3 RNA の 2 次構造解析を目的とした化学修飾法、2) 蛍光能を維持した、もしくは向上した変異体の獲得を目指した進化分子工学、3) 多数の変異体の次世代シーケンス (NGS) による配列解析などの手法を用いて 17-3 RNA の 2 次構造の解析を試みた。

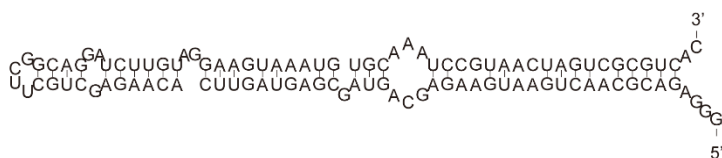


Fig.1: RNA 構造予測プログラムによる 17-3 RNA の 2 次構造モデルの一例

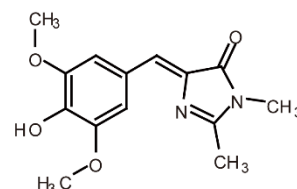
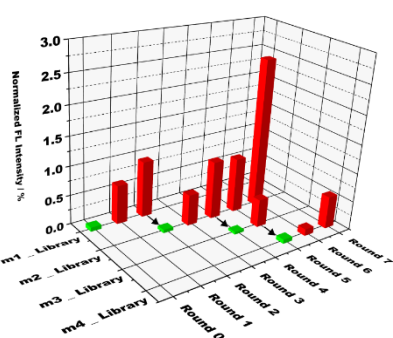


Fig.2: DMHBI 構造式

化学修飾法により、17-3 RNA の修飾部位の同定ができ、NGS による活性変異体の配列解析を総合して、構造形成に関与する塩基が推定できた。進化分子工学から得られた変異体の中には、オリジナルの 17-3 RNA よりも高い蛍光を示したものも存在した (Fig.3,4)。現在は、活性の高い RNA 集団がもつ共通の配列を同定し、化学修飾法の結果と照合することで、17-3 RNA の 2 次構造をより高精度で予測するために、進化実験と NGS 解析を継続中である。



緑 : Error-Prone PCR 赤 : Standard PCR

Fig.3: 各ライブラリーにおける蛍光活性比較

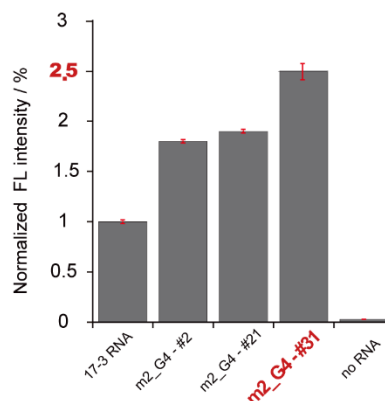


Fig.4: 単離した 17-3 RNA 変異体蛍光活性比較

Reference

[1] J. S. Paige., K.Y. Wu., S. R. Jaffrey, *Science*, **333**, 642-646 (2011)

PCAF 型 PYP タグリガンドを用いた核酸結合色素/タンパク質ハイブリッドプローブの開発

○松木星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 nucleic acid binding dye/protein hybrid probe (Graduate School of Engineering, Osaka University¹, Immunology Frontier Research Center, Osaka University²) MATSUKI, Akari¹; HORI, Yuichiro^{1,2}; KIKUCHI, Kazuya^{1,2}

核酸の機能は、多種の化学修飾によって制御されており、その化学修飾の異常は、神経疾患や免疫疾患、ガンなどの様々な疾患の原因となることが知られている。このため、核酸の化学修飾のメカニズムを解明することは医学・創薬の分野において重要であり、生細胞レベルで検出する技術の開発は、極めて有用である。

生細胞で核酸の化学修飾を検出する既存の技術として、蛍光タンパク質を用いた手法が報告されている。この手法では、修飾核酸を認識し結合するタンパク質と蛍光タンパク質からなる融合タンパク質の局在を可視化するが、標的の修飾核酸に結合していない遊離のタンパク質プローブからも蛍光が観察されることが問題であった。演者らは、この問題を解決するために、核酸結合色素と修飾核酸結合タンパク質を連結したハイブリッドプローブを用いて、生細胞内で修飾核酸を検出する技術の開発に取り組んできた。このハイブリッドプローブを生細胞内で構築するキーとなる技術が、演者らのグループで開発したタンパク質ラベル化法である。この技術を用いることで、Photoactive Yellow Protein (PYP) をタグタンパク質として融合した標的タンパク質と蛍光色素を生細胞内で特異的に連結できる。PYP は紅色硫黄細菌由来の 125 アミノ酸残基からなる小さなタンパク質であり、その 69 番目のシステインが桂皮酸誘導体を天然リガンドとして特異的に共有結合することが知られている (Fig. 1)。これまでの研究で、PYP ラベル化法とメチル化 DNA 結合タンパク質である MBD を利用し、メチル化 DNA に結合することで蛍光強度を上昇させる核酸結合色素/タンパク質ハイブリッドプローブを開発した¹。一方、このとき、PYP リガンドである桂皮酸誘導体を核酸結合色素に繋いだラベル化分子を用いラベル化反応を行ったが、細胞内ラベル化能が低く、その性能の向上が課題となった。

この課題を解決するために、最近になり演者らのグループで開発した高効率 PYP タグラベル化リガンド PCAF に着目した。PCAF はクロロアセチル基を有し、S_N2 反応により PYP の 69 番目のシステインとチオエーテルを形成する (Fig. 1)。そこで、PCAF 型リガンドと核酸結合色素を連結した新規 PYP ラベル化分子を開発した。このラベル化分子は、従来の桂皮酸型ラベル化分子と比べ、優れた細胞内ラベル化能を有することが分かった。本発表では、新規機能性分子によるタンパク質ラベル化反応、及び生細胞イメージング実験の詳細について報告する。

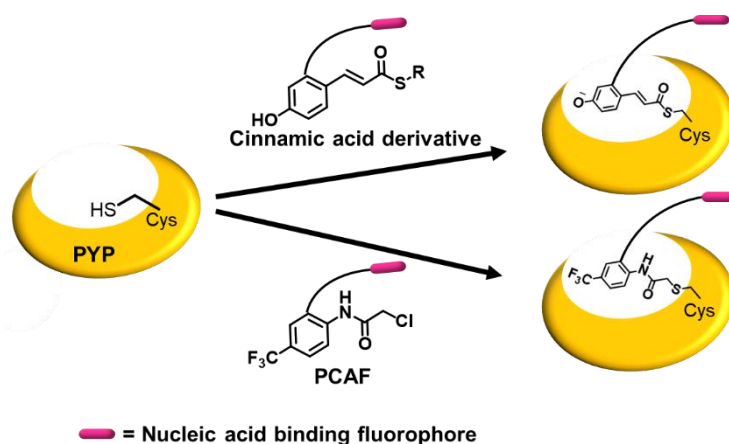


Fig 1. Labeling reaction of PYP with natural and designed ligands

- 1) Hori, Y., Otomura, N., Nishida, A., Nishiura, M., Umeno, M., Suetake, I., Kikuchi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, 1686.