Sat. Sep 10, 2022

Oral Session

9:20 AM - 10:40 AM JST | 12:20 AM - 1:40 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Peptides

Chair: Takayuki Miki (Tokyo Institute of Technology)

9:20 AM - 9:40 AM JST | 12:20 AM - 12:40 AM UTC

[1A-01] In silico screening of a bile acid micelle disruption peptide from edible peptide database

Kento Imai[1], Yuri Takeuchi[1], Hirokazu Akiyama[1], Kazunori Shimizu[1], *Hiroyuki Honda[1] (1. Faculty of Engineering, Nagoya University)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[1A-02] Rational design of protein ligands using peptoids with rigid backbones.

Marin Yokomine[1], Jumpei Morimoto[1], Yasuhiro Fukuda[1], Yota Shiratori[1], Daisuke Kuroda[1], Takumi Ueda[2], Koh Takeuchi[2], Kouhei Tsumoto[1,3], *SANDO SHINSUKE[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Graduate School of Pharmaceutical Science, The University of Tokyo, 3. Institue of Medical Science, The University of Tokyo)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[1A-03] In vitro synthesis of prenylated macrocyclic peptides using a novel His-*C*-geranyltransferase

Yuchen Zhang[1], Keisuke Hamada[2], Dinh Thanh Nguyen[1], Sumika Inoue[1], Masayuki Satake[1], Masahiro Okada[3], Toru Sengoku[2], *Yuki Goto[1], Hiroaki Suga[1] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2. Yokohama City University, 3. Kanagawa University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[1A-04] Luminescence Detection of Peptide:*N*-Glycanase Activity Using Split Intein

*Tsuyoshi Takahashi[1], Tatsuya Uchibayashi[1], Nozomi Ishii[1], Ichiro Matsuo[1], Yukiko Yoshida[2], Tadashi Suzuki[3] (1. Graduate School of Science and Technology, 2. Tokyo Metropolitan Institute of Medial Science, 3. RIKEN)

Oral Session

2:40 PM - 3:40 PM JST | 5:40 AM - 6:40 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Koji Miki (Kyoto University)

2:40 PM - 3:00 PM JST | 5:40 AM - 6:00 AM UTC

[1A-05] Selective Single-cell Retrieval Method using Light-Responsive Gas-Generating Polymer

*Hidetaka Ueno[1,2], Yoshinori Akagi[3], Shohei Yamamura[1] (1. Health and Medical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2. Japan Society of Promotion of Science, 3. R&D Center Corporate Advanced Technology Institute Life Science Development Center, Sekisui Chemical Co., Ltd)

3:00 PM - 3:20 PM JST | 6:00 AM - 6:20 AM UTC

[1A-06] Electrochemical Measurement of Oxygen Consumption Rate of Cell Aggregates to Investigate a Heterogeneity of Patient-Derived Cancer Cells

*Shotaro Shishido[1], Yuji Nashimoto[2], Kosuke Ino[3], Kunishige Onuma[4], Masahiro Inoue[4], Hitoshi Shiku[1,3] (1. Grad. Sch. Env., Tohoku Univ., 2. IBB., TMD Univ., 3. Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., 4. Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

3:20 PM - 3:40 PM JST | 6:20 AM - 6:40 AM UTC

[1A-07] Genetically encoded fluorescent biosensors for L-lactate

*Yusuke NASU[1], Giang LE[1], Saaya HARIO[1], Yuki KAMIJO[1], Robert CAMPBELL[1] (1. School of Science, The University of Tokyo)

Oral Session

3:50 PM - 4:50 PM JST | 6:50 AM - 7:50 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Tasuku Hirayama (Gifu Pharmaceutical University)

3:50 PM - 4:10 PM JST | 6:50 AM - 7:10 AM UTC

[1A-08] CRISPR/Cas12-Based Sensor Array for the Multiplex DNA detection

*Hiroki Shigemori[1,2], Satoshi Fujita[1], Eiichi Tamiya[1,3], Shin-ichi Wakida[1], Hidenori Nagai[1,2] (1. Advanced Photonics and Biosensing Open Innovation Laboratory, AIST-Osaka Unverisity, 2. Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University, 3. The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

4:10 PM - 4:30 PM JST | 7:10 AM - 7:30 AM UTC

[1A-09] Specific detection of odorant on GFET by screening the skatole binding peptide

*Kakeru Saruwatari[1], Tharatorn Rungreungthanapol[1], Chisyu Homma[1], Masayoshi Tanaka[1], Hideyuki Tomizawa[2], Yoshiaki Sugizaki[2], Atunobu Isobayashi[2], Yuhei Hayamizu[1], Mina Okochi[1] (1. Tokyo Institute of Technology, 2. TOSHIBA CORPORATION)

4:30 PM - 4:50 PM JST | 7:30 AM - 7:50 AM UTC

[1A-10] Comprehensively analyzing the regulators of the release processes of extracellular vesicles with RNA barcodes

*Ryosuke Kojima[1], Koki Kunitake[2], Tadahaya Mizuno[2], Yasuteru Urano[1,2] (1. Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo)

Poster Short Talk

5:00 PM - 6:00 PM JST | 8:00 AM - 9:00 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Poster short talks (P1-P20)

[P1] The development of a FRET detection system for elucidation of intracellular mechanisms of SNA modified anti-miRNA oligonucleotide

*Hongyu Zhu[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University.)

[P2] Syntheses of base-labile pseudo-complementary nucleobases of SNA and L-*a*TNA phosphoramidite monomers

*Fuminori Sato[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P3] Chemical modification of tripodal quinone-cyanine fluorescent dye for regulating the recognition of nucleic acids structure

*Yuka Muraoka[1], Yu Yasuhara[2], Marina Iwai[2], Takashi Sakamoto[1,2] (1. Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University, 2. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

[P4] Kinetic analysis of DNA G-quadruplexes folding with structured loop regions

*Minori Nakata[1], Naoki Kosaka[1], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University)

[P5] Evaluation of tripodal quinone-cyanine dies as photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer

*Junya Muramoto[1] (1. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

[P6] The reactivity of Topoisomerase I to G-quadruplex-containing DNA

*Koya Sakamoto[1], Ryoma Yokosawa[1], Maiko Yamanashi[1], Takanori Oyoshi[1] (1. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University)

[P7] Development of functional polypeptides regulating G4-containing promoter

*Yamato Karikome[1], Maiko Yamanashi[1], Akinori Ishihara[1], Takanori Oyoshi[1,2,3] (1. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 2. Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, 3. Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

[P8] Nucleic acid detection using DNA probes that release a ligated product between ruthenium and platinum complexes in a sequence specific manner

*Takeshi Asahina[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University)

[P9] Development of Structural Selective G-Quadruplex Ligand with Novel Ligand Screening

*Yoshiki Hashimoto[1], Takeru Torii[1], Matsuki Kinoshita[1], Keiko Kawauchi[1], Hisae Tateishi-Karimata[2], Naoki Sugimoto[1,2], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University, 2. FIBER, Konan University)

[P10] Development of long-chain elongation reaction based on kinetic analysis of chemical template-directed ligation of L-*a*TNA and SNA

*Hikari Okita[1], Keiji Murayama[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P11] Construction of Highly Diverse Monobody and Macrocyclic Peptide Libraries Based on the Effect of mRNA Sequences on Translation Efficiency and Accuracy

*Shun Umemoto[1], Taishi Kondo[1], Tomoshige Fujino[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P12] Development of fluoregenic synthtic fluorephore/protein hybrid probe for detection of methylated RNA

*Kamikawa Takuya Takuya[1,2], Yuichiro Hori[2], Keisuke Nomura[1], Akari Matsuki[1], Kazuya Kikuchi[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Graduate School of Science, Kyushu University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[P13] Regulation of liquid-liquid phase separation by small molecules targeting RNA G-quadruplex

*Nagisa Takamiya[1] (1. FIRST, Konan University)

[P14] Development of long-chain DNA assembly technology by using 3'-thio-phosphorothiolate oligodeoxynucleotides

*Mikiya Kase[1], Masahito Inagaki[1], Haruka Hiraoka[1], Humitaka Hashiya[1], Naoko Abe[1], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P15] Synthesis and Evaluation of Hoechst-Tethered Oligodeoxynucleotides that Accumulate in Cell Nucleus

*Hiroki Makanai[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University))

[P16] Elucidation of gene function based on RNA Hacking technology by super selectivity Staple oligomer

*Tomoki Tomoki Kida[1], Yousuke Katsuda[1], Takuto Kamura[1], Kotone Lavin[1], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[2], Shin-ichi Sato[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P17] Sequence specific control of liquid droplets composed of RNA G-quadruplex

*Mitsuki Tsuruta[1], Takeru Torii[1], Kazuki Kohata[1], Keiko Kawaichi[1], Hisae Tateishi-Karimata[2], Naoki Sugimoto[1,2], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University, 2. FIBER, Konan University)

[P18] Mechanism of cancer-cell-selective cytotoxicity by dicopper complexes

*Machi Hata[1], Yasuomi Urano[2], Yutaka Hitomi[1], Noriko Noguchi[2], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University, 2. Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University)

[P19] Flexible gene expression increase technology by RNA hacking

*Yua Itsuki[1], Yousuke Katsuda[1], Yusuke Kitamura[1], Hagihara Masaki[2], Sato Shin-ichi[3], Ihara Toshihiro[1] (1. Affiliation Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Advance Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P20] Dynamic control of DNA scaffolded BRET system using strand displacement reaction

*Fumiaki Takano[1], Yuki Minamide[1], Tomoya Niki[1], Shiori Tabana[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University)

Poster Short Talk

6:00 PM - 6:30 PM JST | 9:00 AM - 9:30 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Short talks free discussions (P1-P20)

Oral Session

9:20 AM - 10:40 AM JST | 12:20 AM - 1:40 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Toshihisa Mizuno (Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

9:20 AM - 9:40 AM JST | 12:20 AM - 12:40 AM UTC

[1B-01] Sesamin oxidation mechanism of CYP92B14 related to lignan accumulation in seseme seeds

*Erisa Harada[1], Jun Murata[1], Kei Shiraishi[1], Hiromi Toyonaga[1], Eiichiro Ono[2], Masayuki P. Yamamoto[3], Manabu Horikawa[1] (1. Suntory foundation of Life sciences, 2. Research Institute, Suntory Global Innovation Center Ltd, 3. Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[1B-02] Molecular mechanisms of antibody recognition in immobilized systems and solution systems of FcγRIIIa receptor

*Satoru NAGATOISHI[1,2], Seisho Kinoshita[3], Daisuke Kuroda[3], Hirofumi Kosuge[3], Masato Kiyoshi[4], Akiko Ishii-Watabe[4], Yosuke Terao[5], Teruhiko Ide[5], Kouhei Tsumoto[1,2,3] (1. The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, 3. School of Engineering, The University of Tokyo, 4. National Institute of Health Sciences, 5. Tosoh Corporation)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[1B-03] Analyses and chemical regulation of crosstalk mechanism of ethylene- and jasmonate-related transcription factors

*Yousuke Takaoka[1], Ruiqi Liu[1], Kaho Suzuki[1], Minoru Ueda[1,2] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[1B-04] Identification of protein lipoylation system in hyperthermophilic archaea

*Takaaki Sato[1], Jian-qiang Jin[1], Shin-ichi Hachisuka[1], Tsuyoshi Fujiwara[1], Haruyuki Atomi[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

Invited Lecture

11:00 AM - 12:00 PM JST | 2:00 AM - 3:00 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Mechanistic study of rhodopsins

Chair: Katsutoshi Hori (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

11:00 AM - 12:00 PM JST | 2:00 AM - 3:00 AM UTC

[1IL-01] Mechanistic study of rhodopsins

*Hideki Kandori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

Invited Lecture

1:20 PM - 2:20 PM JST | 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Nano AI Biodevices and Quantum Life Sciences for Future Healthcare

Chair: Hiroshi Murakami (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

1:20 PM - 2:20 PM JST | 4:20 AM - 5:20 AM UTC

[1IL-02] Nano AI Biodevices and Quantum Life Sciences for Future Healthcare

*Yoshinobu Baba[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

Oral Session

2:40 PM - 3:40 PM JST | 5:40 AM - 6:40 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Inaba (Tottori University)

2:40 PM - 3:00 PM JST | 5:40 AM - 6:00 AM UTC

[1B-05] In vivo photoactivated proximity labeling for the identification of neurotransmitter receptor-proximal proteins

*Mikiko Takato[1], Seiji Sakamoto[1,2], Hiroshi Nonaka[1,2], Tomonori Tamura[1,2], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. JST ERATO)

3:00 PM - 3:20 PM JST | 6:00 AM - 6:20 AM UTC

[1B-06] Effect of Hydrophobic Aromatic Group on Amphiphilic Oligo(ethylene glycol)s as Lysozyme Stabilizers

*Wijak Yospanya[1], Kohei Sato[1], Kazushi Kinbara[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

3:20 PM - 3:40 PM JST | 6:20 AM - 6:40 AM UTC

[1B-07] Promotion of Protein Folding by Stepwise Redox Reactions

*Takahiro Muraoka[1,2], Shunsuke Okada[1], Masaki Okumura[3] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, 3. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

Oral Session

3:50 PM - 4:50 PM JST | 6:50 AM - 7:50 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Ayana Yamagishi (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

3:50 PM - 4:10 PM JST | 6:50 AM - 7:10 AM UTC

[1B-08] New assay method for the enzymatic reaction with gaseous substrates by using Raman spectroscopy

*Koji Nishikawa[1], Yuka Nakagawa[2], Syota Inoue[1], Takafumi Chuji[1], Satoru Nakashima[3], Hideaki Ogata[1], Yasuteru Shigeta[4], Katsuyuki Fukutani[5], Yoshiki Higuchi[1] (1. Graduate School of Science, University of Hyogo, 2. Kyoto University, 3. Nara Institute of Science and Technology, 4. Tsukuba University, 5. Institute of Industrial Science, The University of Tokyo)

4:10 PM - 4:30 PM JST | 7:10 AM - 7:30 AM UTC

[1B-09] Construction of in-cell protein crystals encapsulating artificial protein needles

*Satoshi Abe[1], Thuc Toan Pham[1], Takafumi Ueno[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

4:30 PM - 4:50 PM JST | 7:30 AM - 7:50 AM UTC

[1B-10] Monobodies with neutralizing activity against SARS-CoV-2 Omicron

*Taishi Kondo[1], Kazuhiro Matsuoka[2], Tomoshige Fujino[1], Shun Umemoto[1], Gosuke Hayashi[1], Yasumasa Iwatani[2,3], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Naoya University, 2. Department of Infectious Diseases and Immunology, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, 3. Division of Basic Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

Poster Short Talk

5:00 PM - 6:00 PM JST | 8:00 AM - 9:00 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Poster short talks (P21-P40)

[P21] Construction of enzyme complexes for fast degradation of plastics

*Minami Sawada[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P22] Chemoproteomic Identification of Blue Light-Damaged Proteins

*Kohei Toh[1], Motonari Uesugi[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P23] Studies on the association character and structural analysis of tetrameric antibody light chain

*Takahiro Sakai[1], Fitriana Wahyu[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Shohei Yamaguchi[1], Emi Hifumi[2], Taizo Uda[3], Hideaki Ogata[4], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Institute for Research Management, Oita University, 3. Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies, 4. Graduate School of Science, University of Hyogo)

[P24] Analysis of Mechanical Stability of a Cell Surface Protein AtaA_Chead by Molecular Dynamics Simulation

*Jun Sasahara[1], Takayuki Hashimoto[1], Kazushi Fujimoto[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P25] Creation of a bacterial-size liposome with the leaflets of asymmetric protein composition for artificial bacteria.

*Kosaku Noba[1], Shogo Yoshimoto[1], Yoshikazu Tanaka[2], Tomoaki Matsuura[3], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya university, 2. Department of Molecular and Chemical Life Sciences, Tohoku University, 3. Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology)

[P26] Development of small molecule-responsive synthetic protein clustering systems

*Yoko Fukaya[1], Masaru Yoshikawa[1], Sachio Suzuki[1], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P27] Trafficking studies of intracellular and cell surface AMAP-type glutamate receptors using ligand-directed chemistry.

*Yutaro Sugihara[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2,3], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University, 3. ERATO, JST)

[P28] New caged compounds for site-specific activation of AMPA-type glutamate receptors

*Kyohei Soga[1], Toshiaki Furuta[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Department of Biomolecular Science, Toho University)

[P29] Single-molecule toughness analysis of the C-terminal passenger domain of AtaA using AFM

*Amane Kato[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P30] Acceleration of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition induced by antibody-antigen interaction

*Kentaro Nishiyama[1], Hiroki Akiba[1,2], Satoshi Nagata[2], Kouhei Tsumoto[2], Haruhiko Kamada[1,2], Hiroaki Ohno[1,2] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)

[P31] Understanding the catalytic behavior of cross-linking enzyme under crowded condition

*Ryo Sato[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P32] Development of photochromic ligands for quantitative and photo-reversible protein labeling

*Satoshi Hamaguchi[1], Toshiyuki Kowada[1,2,3], Takato Mashita[2], Himadri S. Sarkar[3], Toshitaka Matsui[1,2,3], Shin Mizukami[1,2,3] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Graduate School of Science, Tohoku University, 3. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University)

[P33] Construction and structural analysis of a three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion

*Kodai Fujiwara[1], Haruki Onishi[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Masaru Yamanaka[1], Kento Yonezawa[1], Hironari Kamikubo[1], Takayuki Uchihashi[2], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P34] NMR analysis of transient unfolding/refolding protein structures by encapsulation in a self-assembled cage

*Anouk Rossen[1], Takahiro Nakama[1], Maho Yagi-Utsumi[2], Daishi Fujita[3], Koichi Kato[2], Makoto Fujita[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Molecular Science (IMS), 3. Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University)

[P35] Development of novel fluorescent biosensors for visualizing plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate

*Moeka Ajiki[1], Masaru Yoshikawa[1], Fubito Nakatsu[2], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 2. Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University)

[P36] Construction of Pd(II)-containing Artificial Metalloenzymes Using Scaffolds of Steroid Metabolizing Enzymes and their Application to Intramolecular Hydroarylation

*Haruka Nishiwaki[1], Shunsuke Kato[1], Takashi Hayashi[1] (1. Osaka University)

[P37] Preparation of Hydrogel Containing a Protein Unit Modified by Two Different Fluorophores

*Hiroki Innami[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P38] Development of Artificial Antibody for Antibody-anchored Natural Killer Cell Therapy

*Chihiro Tanaka[1], Tomoshige Fujino[1], Yui Harada[2,3], Yoshikazu Yonemitsu[2,3], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Pharmaceutical Sciences Kyushu University, 3. R&D Laboratory for Innovative Biotherapeutics Science, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P39] Chemogenetic activation of adenosine A_{2A} receptors focusing on structural information.

*Midori Makino[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P40] Exploration of orthogonal activation of mGlu1 using Pd complexes having different ligands.

*Suzuka Kurakake[1], Yuta Miura[1], Akinobu Senoo[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

Poster Short Talk

6:00 PM - 6:30 PM JST | 9:00 AM - 9:30 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Short talks free discussions (P21-P40)

Oral Session

9:40 AM - 10:40 AM JST | 12:40 AM - 1:40 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Molecular recognition/Sugars, Lipids/DDS

Chair: Hiroki Akiba (Kyoto University)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[1C-02] Development of “OFF/ON” fluorescent probe for selective detection of prostate cancer cells

*Hiroaki Nagasaki[1], Naoki Tsutsumi[1], Yosuke Niko[1,2], Seiji Sakamoto[3], Itaru Hamachi[3], Masayuki Izumi[1,2], Rika Ochi[1,2] (1. Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Kochi University, 2. Faculty of Science and Technology, Kochi University, 3. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[1C-03] Fabrication of hexagon nanosheets based on α-helix formation of poly-L-lysine induced by biomolecules containing polyphosphate functionality

*Akihiro Kishimura[1,2,3,5], Ahmad Asmariah[1], Sooyeong Lee[1], Teruki Nii[1], Takeshi Mori[1,3], Yoshiki Katayama[1,2,3,4] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Molecular Systems, Kyushu University, 3. Center for Future Chemistry, Kyushu University, 4. Center for Advanced Medical Open Innovation, Kyushu University, 5. RIKEN Center for Emergent Matter Science)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[1C-04] Ergosterol concentration determined phase separation in liposomes and classification of phase-separation state using by machine learning

*Tsuyoshi Yoda[1] (1. Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, Hachinohe Industrial Research Institute)

Oral Session

2:40 PM - 3:40 PM JST | 5:40 AM - 6:40 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Molecular recognition/Sugars, Lipids/DDS

Chair: Yoshiyuki Manabe (Osaka University, Graduate School of Scinece)

2:40 PM - 3:00 PM JST | 5:40 AM - 6:00 AM UTC

[1C-05] Cell-cell aggregates formation by the ion-pair-enhanced target-directed strained-diyne

*Moeka Yoshinaga[1], Kohei Kitagawa[1], Manami Takeuchi[1], Hiroshi TSUGAWA[1], Hitoshi TAKEMAE[2], Masayuki TERA[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

3:00 PM - 3:20 PM JST | 6:00 AM - 6:20 AM UTC

[1C-06] Thermo-responsive intracellular delivery of polymeric micelle by arginine density switching

*Sota Yamada[1], Eita Sasaki[1], Kenichi Nagase[1], Kenjiro Hanaoka[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University)

3:20 PM - 3:40 PM JST | 6:20 AM - 6:40 AM UTC

[1C-07] Prodrug activation based on the reaction with acrolein in cancer

*Kazuki Terashima[1], Ambara R. Pradipta[1], Katsunori Tanaka[1,2] (1. Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, RIKEN Cluster for Pioneering Research)

Oral Session

3:50 PM - 4:50 PM JST | 6:50 AM - 7:50 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Molecular recognition/Sugars, Lipids/DDS/Medical biology

Chair: Rie Wakabayashi (Faculty of Engineering, Kyushu University)

3:50 PM - 4:10 PM JST | 6:50 AM - 7:10 AM UTC

[1C-08] Effect of functional porphyrin positions against accumulation in cancer cells

*Toshifumi Tojo[1], Koshi Nishida[1], Ayano Niiuchi[1], Takeshi Kondo[1,2], Makoto Yuasa[1,2] (1. Faculty of Science and TEchnology, Tokyo University of Science, 2. Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science)

4:10 PM - 4:30 PM JST | 7:10 AM - 7:30 AM UTC

[1C-09] Design of weakly acidic pH-responsive histidine derivative incorporated liposomes

*Ayumi Kashiwada[1], Narumi Taoka[1], Yukiha Chijimi[1], Misaki Kobayashi[1] (1. College of Industrial Technology, Nihon University)

4:30 PM - 4:50 PM JST | 7:30 AM - 7:50 AM UTC

[1C-10] Induction of Programmed Cell Death in Cancer Cells Induced by Hybrid Compounds of Cyclometalated Iridium Complexes and Triptycenes with Peptides and Mechanistic Study

*Shin Aoki[1,2,3], Kenta Yokoi[1], Kohei Yamaguchi[1], Mayuk Nii[1], Chandrasekar Chandrasekar [2,3] (1. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2. Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science, 3. Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science)

Poster Short Talk

5:00 PM - 6:00 PM JST | 8:00 AM - 9:00 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Poster short talks (P41-P59)

[P41] Selective Recognition of Unprotected Peptides by the Closed Cavity of a Polyaromatic Capsule

*Mayu Shuto[1] (1. Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech)

[P42] A Photoswitchable fluorescent Probe Using a Photochromic Quencher with High Photostability Assisted by Protein-Surface Modification

*Kenji Torii[1], Yuichiro Hori[2], Kazuya Kikuchi[1,3] (1. Graduate School of Engeering, Osaka University, 2. Faculty of Sciences, Kyushu University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[P43] Induction of protein–sugar weak interactions by co-encapsulation within a self-assembled spherical cage

*Miri Tadokoro[1], Takahiro Nakama[1], Makoto Fujita[1,2] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Molecular Science)

[P44] Self-assembly of Imidazolyl Zinc Porphyrins in Lipid Bilayer Membrane

*Yuto Iura[1] (1. Graduate School of Science, Tokyo University of Science)

[P45] Characterization and Reactivity Studies on a Series of Rare Cu(II)-halide Complexes Having Distorted Tetrahedral Geometries as Model Complexes of Type 1 Copper Centers

*Lan Yang[1], Yuma Morimoto[1], Hideki Sugimoto[1], Shinobu Itoh[1] (1. Osaka University)

[P46] Construction of artificial hemoprotein multimers based on metal coordination to recognize biomolecules

*Hiroaki Inaba[1], Yuma Shisaka[1], Garyo Ueda[1], Erika Sakakibara[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Hiroshi Sugimoto[2], Osami Shoji[1] (1. Graduate school of Science, Nagoya University, 2. RIKEN SPring-8)

[P47] Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing photoinduced elimination of axial ligand of metallophthalocyanines

*Kohei Nogita[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P48] Energy-independent lipid-membrane permeation of co-assemblies formed through complementary interaction

*Hiroki Obayashi[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1,2], Masahiro Goto[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P49] Analysis of *O*-glycan type oligosaccharides in prostate cancer cells under hypoxia and elucidation of their functions in cell migration using saccharide primer method

*Daiki Yamamoto[1], Takeo Kosaka[2], Mototsugu Oya[2], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University, 2. Keio University School of Medicine)

[P50] NMR analysis using H/D isotope shifts to explore the hydration behavior of carbohydrates

*Hiroaki Tatsuoka[1], Takumi Yamaguchi[1,2] (1. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University)

[P51] Profiling of glycans in animal cells by the saccharide primer method and correlation analysis with influenza virus susceptibility

*Mayu Okuda[1], Kazuma Ohgata[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P53] Exploration of drug-resistant factors in gastric circulating tumor cells by single-cell transcriptome analysis

*Yoshiko Kano[1], Mayuko Horikawa[1], Fumiaki Koizumi[2], Tatsu Shimoyama[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital)

[P54] Heterogeneous expression of unique genes in magnetotactic bacteria toward morphological control of magnetic nanoparticles

*Chihiro Miura[1], Nanami Shinohara[1], Tadashi Matsunaga[1,2], Atsushi Arakaki[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology)

[P55] Whole-Cell Biocatalysts Harboring P450 Enzymes Triggered by Decoy Molecules for Microbial Degradation of Environmental Pollutants

*Fumiya Ito[1], Shinya Ariyasu[1], Masayuki Karasawa[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P56] Development of perfluorocarbon-encapslated elastic nanoparticles for ^{19}F MRI contrast agents

*Yuki Konishi[1], Fuminori Sugihara[2,3], Masafumi Minoshima[1], Kazuya Kikuchi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ., 3. Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

[P57] Creation of transdermal malaria vaccine and analysis of immune response

*Keisuke Tanaka[1], Kosuke Minamihata[2], Rie Wakabayashi[2], Noriho Kamiya[2,4], Masahiro Goto[2,3,4] (1. Kyushu University Graduate School of Engineering, 2. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 3. Next Generation Transdermal Absorption Center, 4. Center for Future Chemistry and Innovation)

[P58] Development of novel ionic liquid nanoparticle formulations and transdermal delivery of nucleic acid drugs

*Kiyohiro Toyofuku[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1], Masahiro Goto[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University)

[P59] Preparation of the fusion protein of VHH antibody and amphiphilic OLE-ZIP and evaluation of its capsule formation property

*Kousuke Takahashi[1], Taiki Nishiyama, Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

Poster Short Talk

6:00 PM - 6:30 PM JST | 9:00 AM - 9:30 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Short talks free discussions (P41-P59)

Sun. Sep 11, 2022

Oral Session

8:30 AM - 9:30 AM JST | 11:30 PM - 12:30 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Peptides

Chair: Tsuyoshi Takahashi (Gunma University)

8:30 AM - 8:50 AM JST | 11:30 PM - 11:50 PM UTC

[2A-01] Organelle-targeted DNA delivery in plants using cell wall-loosening zwitterionic liquid and peptide-displaying micelle complexes

*Takaaki Miyamoto[1], Keiji Numata[1,2] (1. Biomacromolecules Research Team, RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

8:50 AM - 9:10 AM JST | 11:50 PM - 12:10 AM UTC

[2A-02] N-terminal modification of peptides and proteins via metal-mediated aldol reaction

*Kengo Hanaya[1], Yuki Morimi[1], Kazuaki Taguchi[1], Kazuaki Matsumoto[1], Yuki Wada[2], Masaki Kawano[2], Shuhei Higashibayashi[1], Takeshi Sugai[1] (1. Faculty of Pharmacy, Keio University, 2. Department of Chemistry, Tokyo Institute of Technology)

9:10 AM - 9:30 AM JST | 12:10 AM - 12:30 AM UTC

[2A-03] Intracellular construction of artificial phase-separated liquid droplets by YK peptide tagging

*Takayuki Miki[1], Masahiro Hashimoto[1], Hiroki Takahashi[1], Sae Nakayama[1], Hisakazu Mihara[1] (1. Tokyo Institute of Technology)

Oral Session

9:40 AM - 10:40 AM JST | 12:40 AM - 1:40 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Peptides

Chair: Yuki Goto (Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[2A-04] WYP-rich macrocyclic peptide library

*Tomoshige Fujino[1], Taiga Sumi[1], Hiroshi Murakmai[1,2] (1. Department of Biomolecular Engineering Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[2A-05] Generation of Conformationally Constrained Helix-Loop-Helix Peptides Specifically Inhibit the Intracellular Human Proteome

*Daisuke Fujiwara[1], Masataka Michigami[1], Ikuhiko Nakase[1], Ikuo Fujii[1] (1. Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[2A-06] Development of curvature-sensing peptides for highly sensitive detection of extracellular vesicles

*Kenichi Kawano[1], Yuki Kuzuma[1], Fumiaki Yokoyama[2,3], Kouhei Kamasaka[2], Takuya Ogawa[2], Jun Kawamoto[2], Tatsuo Kurihara[2], Katsumi Matsuzaki[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 2. Institute of Chemical Research, Kyoto University , 3. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

Poster Short Talk

10:50 AM - 11:50 AM JST | 1:50 AM - 2:50 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Poster short talks (P60-P79)

[P60] Creation of an enveloped artificial viral capsid through hydrophobic interaction

*Miu Hirahara[1], Kentarou Sakamoto[1], Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[P61] Development of RaPID system-based library vs. library selection

*Yuto Ohno[1], Alexander Vinogradov[1], Hiroaki Suga[1] (1. School of Science, The University of Tokyo)

[P62] Optical control of microtubule stabilization by spiropyran-modified Tau-derived peptides

*Minamo Sakaguchi[1], Hiroshi Inaba[1], Arif Md. Rashedul Kabir[2], Akira Kakugo[2], Kazuki Sada[2], Kazunori Matuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Science, Hokkaido University)

[P63] Molecular transport from viral replica embedded with gap junction-forming membrane proteins into liposomes and cells

*Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Yoshihiro Sasaki[2], Kazunari Akiyoshi[2], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P64] Direction-Switchable One-Pot Peptide Ligation for Chemical Protein Synthesis

*Koki Nakatsu[1], Akimitsu Okamoto[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University)

[P65] Selection of GM1-mimic Peptides by Phage-display Technology Using Acoustic Levitation

*Akiko Yoshida[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P66] Synthesis and Cancer-Cell-Selective Toxicity of a Dicopper(II) Complex with NLS-Peptide Attached Phenol-2,6-bis(amide-tether-tacn) Ligand

*Ami Kodama[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[P67] Design of peptide interface to expose the cytoplasmic side of the cell membrane on graphene

*Shogo Saito[1], Soichiro Tatematsu[1], Masayoshi Tanaka[1], Mina Okochi[1] (1. Tokyo Institute of Technology)

[P68] Selection of Peptides That Bind to MDM2 Protein Using an Engineered Split Intein

*Yutaro Watanabe[1], Tsuyoshi Takahashi[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Gunma University)

[P69] Development of an efficient chemical synthesis route for dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism

*Yuya Takahashi[1], Satomi Kori[2], Kyohei Arita[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. The university of nagoya, 2. Yokohama City University)

[P70] WYP-rich macrocyclic peptide library as a high quality library for *in vitro* selection

*Taiga Sumi[1], Tomoshige Fujino[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Guraduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P71] Development of the cyclic peptide which inhibit amyloid β aggregation induced by GM1 cluster on lipid raft

*Erika Miyamoto[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P72] Creation of antigen-modified peptide assemblies for activation of immune cells

*Yamaguchi Kyohei[1] (1. Graduate School of Engineering, KyushunUniversity)

[P73] Fabrication of emulsion vaccines based on enzyme reactive self-assembling peptides

*Ayato Higuchi[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P74] Construction of a stimuli-responsive hemoprotein-based hydrogel driven by folding and unfolding behaviors

*Kazuki Kageyama[1], Takahiro Urayama[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka university)

[P75] Development of Cysteine-selective Covalent Drugs Utilizing β-Fluorovinylsulfonamides

*Shunsuke Watanabe[1], Keisuke Tokunaga[1], Yuya Hirose[1], Yudai Tanaka[1], Naoya Shindo[1], Akio Ojida[1] (1. Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyushu university)

[P76] *De novo* chemogenetic approach for subtype selective regulation of dopamine receptor activity

*Shuntaro Kashiwa[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Nagoya University)

[P77] Biosynthesis of prostaglandin by the marine microalga with cyclooxygenase

*Miho Kikuchi[1], Nana Matsumoto[1], Yuki Tsuru[1], Yoshiaki Maeda[2], Tomoko Yoshino[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Faculty of Life and environmental Sciences, Tsukuba University)

[P79] AMPA-type glutamate receptor covalent inhibitor for light control at the synaptic level

*Akihiro Shibata[1], Kyohei Soga[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

Poster Short Talk

11:50 AM - 12:20 PM JST | 2:50 AM - 3:20 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Short talks free discussions (P60-P79)

Oral Session

1:20 PM - 2:20 PM JST | 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Masayasu Taki (Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[2A-07] Development of hyperpolarized MRI molecular probes for detecting aminopeptidase activities based on enzymatic reaction kinetics

*Yutaro Saito[1], Hiroyuki Yatabe[1], Iori Tamura[1], Yohei Kondo[1], Ryo Ishida[2], Tomohiro Seki[2], Keita Hiraga[1], Akihiro Eguchi[1], Yoichi Takakusagi[3], Keisuke Saito[1], Nobu Oshima[2], Hiroshi Ishikita[1], Kazutoshi Yamamoto[2], Murali C. Krishna[2], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. National Institute of Health, 3. National Institute for Quantum Science and Technology)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[2A-08] Biosensing of Immune-Related Protein using Glycopolymer-brush

*Yuhei Terada[1], Hyota Takamatsu[2], Masato Saito[3,4], Eiichi Tamiya[4,5] (1. Environmental Management Research Institute, AIST, 2. Graduate School of Medicine, Osaka University, 3. Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, 4. Advanced Photonics and Biosensing Open Innovation Laboratory, AIST, 5. The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[2A-09] Functional Thin Layer Chromatography for the Metabolites Imaging in Frozen Tissue Slice

*Tatsuya Nishihara[1], Koki Nishida[1], Rika Tsukame[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Aoyama Gakuin University)

Oral Session

2:30 PM - 3:30 PM JST | 5:30 AM - 6:30 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Chikashi Nakamura (Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, AIST)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[2A-10] Effect of pore wall modification on Pt-porphyrin/mesoporous silica nanoparticle composites for oxygen concentration imaging.

*Shunsuke Odai[1], Arisa Yamauchi[1], Hidehiro Ito[1], Masaki Okamoto[2], Toshiaki Kamachi[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Faculty of Letters, Keio University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[2A-11] Development of fluorescent molecular probes for rapid live-cell imaging in plants

*Shuhei Kusano[1], Sakuya Nakamura[1], Izumi Masanori[1], Hagihara Shinya[1] (1. RIKEN CSRS)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[2A-12] Highly sensitive biosensor using electrochemical activity of gold nanoparticles

*Shuto Osaki[1,2], Wilfred Espulgar[1], Saito Masato[1,2], Tamiya Eiichi[1,3] (1. Photo-Bio OIL, AIST, 2. Osaka Univ. Eng., 3. Osaka Univ. SANKEN)

Oral Session

8:30 AM - 9:30 AM JST | 11:30 PM - 12:30 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Nobutaka Fujieda (Osaka Metropolitan University)

8:30 AM - 8:50 AM JST | 11:30 PM - 11:50 PM UTC

[2B-01] Intra Q-body: an antibody-based fluorogenic probe for intracellular proteins that allows live cell imaging and sorting

*Hiroshi Ueda[1], Yancen Dai[2], Yuko Sato[1], Bo Zhu[1], Tetsuya Kitaguchi[1], Hiroshi Kimura[1], Farid J. Ghadessy[3] (1. Institute of Innovative Research, Tokyo Tech, 2. Graduate School of Life Science and Technology, 3. A*STAR, Singapore)

8:50 AM - 9:10 AM JST | 11:50 PM - 12:10 AM UTC

[2B-02] Construction and structural characterization of a dimer of ferredoxin from *Thermotoga maritima*

*Monami Tanaka[1], Nur Afiqah binti Azmi[1], Tsuyoshi Mashima[1], Hideaki Ogata[2], Masaru Yamanaka[1], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, University of Hyogo)

9:10 AM - 9:30 AM JST | 12:10 AM - 12:30 AM UTC

[2B-03] Catalytic C–H bond amination by hemoproteins containing iron porphycene as a cofactor

*Yoshiyuki Kagawa[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

Oral Session

9:40 AM - 10:40 AM JST | 12:40 AM - 1:40 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Nonaka (Graduate School of Engineering, Kyoto Univ.)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[2B-04] Single-cell and single-molecule adhesion analysis of a highly sticky bacterium

*Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[2B-05] Laccase-Catalyzed Tyrosine Click and Tyrosinome Analysis

*Shinichi Sato[1,2], Keita Nakane[2], Tatsuya Niwa[3], Hafumi Nishi[4], Shusuke Tomoshige[2], Hideki Taguchi[3], Minoru Ishikawa[2] (1. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences , Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 4. Graduate School of Information Sciences, Tohoku University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[2B-06] Development of Protein Labeling Method with Exchangeable Fluorescent Probe

*Masafumi Minoshima[1], Shahi Imam Reja[2], Toshikuni Awazu[3], Toshiyasu Sowa[1], Kohei Iijima[1], Taketoshi Kambara[4], Yasushi Okada[4,5], Kazuya Kikuchi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka University, 3. Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, 4. RIKEN, 5. School of Science, The University of Tokyo)

Poster Short Talk

10:50 AM - 11:50 AM JST | 1:50 AM - 2:50 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Poster short talks (P80-P99)

[P80] Coordination Chemogenetics for Selective Inhibition of class A GPCR

*Takuto Sugawara[1], Muneo Tsujikawa[2], Yuta Miura[1], Akinobu Senoo[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate school of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University)

[P81] Artificial palmitoylation of protein controls the raft localization and intracellular delivery

*Kazuki Uchida[1], Hiroki Obayashi[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1], Naofumi Shimokawa[2], Masahiro Takagi[2], Noriho Kamiya[1] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P82] An Artificial Photo-redox Enzyme Constructed by Incorporation of an Organic Photosensitizer into a Protein

*Yuki Uchida[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P83] Hydroxylation of Propane Using Intracellular Cytochrome P450BM3 in Water/Ionic Liquid Biphasic System

*Yuki Sugai[1], Masayuki Karasawa[1], Yusaku Kodama[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P84] Combination of cpHaloTag and bio-orthogonal two-step labeling for trafficking studies of transmembrane proteins.

*Jun Ikeshita[1], Yutaro Sugihara[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P85] Development of artificial metalloenzymes for stereoselective hetero Diels-Alder reaction

*Saho Yoshioka[1], Yoshitsugu Morita[2], Nobutaka Fujieda[2] (1. Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 2. Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University)

[P86] Creation of an Artificial Metalloenzymes toward Stereodivergent Michael Addition Reaction

*Ryusei Matsumoto[1], Saho Yoshioka[1], Tomohito Marumo[1], Yoshitsugu Morita[1], Nobutaka Fujieda[1] (1. Osaka Metro. Univ.)

[P87] Kinetic analysis of the interaction of agonist antibodies targeting OX40.

*Kan Ujiie[1], Aki Tanabe[2], Satoru Nagatoishi[3], Kouhei Tsumoto[1,3,4] (1. Dept. of Bioeng., Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, 2. AIDS Res. Center, NIID, 3. Inst. Med. Sci., The Univ. of Tokyo, 4. Dept. of Chem Biotech., Sch. Eng., The Univ. of Tokyo)

[P88] Synthesis of cyclic oligo (ethylene glycol) for suppression of amyloid insulin fibrillation

*Thirasara Sammani PituwalaKankanamge[1] (1. Life science and technology , Tokyo Institute of Technology)

[P89] Development of opto-chemogenetics tool for reversible reglation of adenosine A_{2A} receptors

*Harufumi Suzuki[1], Doura Tomohiro[1], Kiyonaka Shigeki[1] (1. Engineering)

[P90] Development of technology for selective degradation of proteins in mitochondria matrix

*Wakana Yamada[1], Shinichi Sato[1,2], Minoru Ishikawa[1], Shusuke Tomoshige[1] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[P91] Chemogenetic regulation of adenosine A2A receptor focusing on the action of the subtype-selective antagonists

*Yuma Matsuoka[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P92] DNA Labeling to Target Protein by Photoreaction of Benzophenone and Its Application

*Ryota Hidaka[1], Masaru Mori[2], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 2. Institute for Advanced Bioscience, Keio University)

[P93] TRAP display selection of monobodies for the detection of microinflammation.

*Ryusei Matsuo[1], Tomoshige Fujino[1], Jing-Jing Jiang[2], Murakami Masaaki[2], Hayashi Gosuke[1], Murakami Hiroshi[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Medicine, Hokkaido University, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P94] Novel Chemogenetics for Subunit-selective Inhibition of AMPA Receptor Activity

*Yuta Deen Miura[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P95] Preparation of cytochrome b_{562} oligomers using efficient disulfide bond formation

*Karen Kurihara[1], Julian Wong Soon[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P96] Improving the efficiency of heme incorporation into recombinant cytochrome P450 by co-expression of ferrochelatase

*Eri Akagawa[1], Maki Sawada[1], Masafumi Yohda[1], Nobuhumi Nakamura[1] (1. Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P97] Preparation and functional evaluation of nonwoven fabrics made of crosslinkable polymers using bioorthogonal reaction.

*Ishiguro Taira[1] (1. Nagoya Institute of Technology)

[P98] Tensile characteristics of nestin tail domain by AFM

*Rina Tokuoka[1], Koki Uchida[1], Ayana Yamagishi[1,2], Daijiro Takeshita[3], Chiaki Yoshikawa[4], Tomohiko Yamazaki[4], Taro Q.P. Uyeda[5], Chikashi Nakamura[1,2] (1. Grad. Sch. Eng. TUAT, 2. Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST, 3. Biomed. Res. Inst., AIST, 4. NIMS, 5. Waseda Univ.)

[P99] Development of eco-friendly bromolactone synthase

*Takuya Matsuura[1], Hideyasu China[1], Takashi Nakamura[1], Hidehito Mukai[1] (1. Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

Poster Short Talk

11:50 AM - 12:20 PM JST | 2:50 AM - 3:20 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Short talks free discussions (P80-P99)

Oral Session

1:20 PM - 2:20 PM JST | 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Shohei Uchinomiya (Graduate School of pharmaceutical Sciences, Kyushu University)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[2B-07] Construction of microtubule superstructures by Tau-derived peptide-fused proteins

*Hiroshi Inaba[1], Yurina Sueki[1], Muneyoshi Ichikawa[2], Arif Md. Rashedul Kabir[3], Takashi Iwasaki[4], Akira Kakugo[3], Kazuki Sada[3], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 3. Graduate School of Science, Hokkaido University, 4. Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[2B-08] Development of global single-molecule enzyme activity analysis platform for the identification of activity-based biomarkers in blood samples

*Toru Komatsu[1], Shingo Sakamoto[1], Tadahaya Mizuno[1], Rikiya Watanabe[2], Tohru Koike[3], Kazufumi Honda[4], Yasuteru Urano[1,5] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 2. Riken, 3. Graduate Shool of Biomedical and Health Sciences, Horishima University, 4. Nippon Medical School, 5. Graduate School of Medicine, The University of Tokyo)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[2B-09] Selection for biparatopic antibodies through optimized intein-mediated protein trans-splicing

*Hiroki Akiba[1,2], Satoshi Nagata[2], Tomoko Ise[2], Haruhiko Kamada[1,2], Hiroaki Ohno[1,2], Kouhei Tsumoto[2,3] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, 3. School of Engineering, The University of Tokyo)

Oral Session

2:30 PM - 3:30 PM JST | 5:30 AM - 6:30 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Takanobu Yasuda (Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[2B-10] Development of a Chitin-based Affinity Purification System for Mining of Bacterial Enzymes with a Novel Activity

*Shunsuke Kato[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[2B-11] Mechanosensing mechanism of cancer invasion-related channel Clic1

*Ayana Yamagishi[1,2], Akane Nagata[2], Nakamura Chikashi[1,2] (1. Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[2B-12] Protein Chemical Cleavage using Cysteine Formylation

*Naoki Zenmyo[1], Yuya Matsumoto[1], Akihiro Yasuda[1], Shohei Uchinomiya[1], Naoya Shindo[1], Kaori Tabata[1], Akio Ojida[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyushu University)

Oral Session

3:40 PM - 5:00 PM JST | 6:40 AM - 8:00 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Molecular recognition/Sugars, Lipids/DDS

Chair: Takahiro Muraoka (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[2B-13] Cell membrane permeability of co-assembled supramolecules constructed by complementary hydrogen bonds

*Rie Wakabayashi[1], Hiroki Obayashi[1], Noriho Kamiya[1,2], Masahiro Goto[1,2] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[2B-14] Development of fluorous channels and their transmembrane material transport properties

*Kohei Sato[1], Kazushi Kinbara[1,2] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Living Systems Materialogy Research Group, International Research Frontiers Initiative, Tokyo Institute of Technology)

4:20 PM - 4:40 PM JST | 7:20 AM - 7:40 AM UTC

[2B-15] Analysis of cell surface glycan network by synthetic biology approach

*Yoshiyuki Manabe[1,2], Ayane Miura[1], Shuto Miyake[1], Kenichi Suzuki[3], Kazuya Kabayama[1,2], Koichi Fukase[1,2] (1. Osaka University, Graduate School of Scinece, 2. Osaka University, Forefront Research Center, 3. Gifu University, Institute for Glyco-core Research)

4:40 PM - 5:00 PM JST | 7:40 AM - 8:00 AM UTC

[2B-16] Nucleic acid delivery using cationic perylene

*Kazuma Amaike[1], Erika Kato[2], Miu Fukatsu[2], Dominik Zetschok[2], Atsushi Usami[2], Hayato Yamada[2], Kenichiro Itami[2,3] (1. Research Center for Materials Science, Nagoya University, 2. Graduate School of Science, Nagoya University, 3. Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University)

Oral Session

8:30 AM - 9:30 AM JST | 11:30 PM - 12:30 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Keiji Murayama (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

8:30 AM - 8:50 AM JST | 11:30 PM - 11:50 PM UTC

[2C-01] Novel Design Strategy of DNA-Artificial Nucleic Acid Chimera Toward Enhancement of Target RNA Cleavage Activities: Application for COVID-19 Therapeutics

Nozomu Ishiwata[1], Masahito Inagaki[1,3], Kazutoshi Fujita[1], Yuto Horiuchi[1], Huronori Hayashi[2], Yasuyuki Araki[1], Masaki Nishijima[1], Toshiyuki Sato[1], Akiko Nanba[1], Eiichi Kodama[2], *TAKEHIKO WADA[1] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. IRIDeS, Tohoku University, 3. Grad. Sch. Sci., Nagoya University)

8:50 AM - 9:10 AM JST | 11:50 PM - 12:10 AM UTC

[2C-02] RNA methylation through G-quadruplex structure

*Miki Imanishi[1], Atsuhiro Yoshida[1], Takanori Oyoshi[2], Shiroh Futaki[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University, 2. Faculty of Science, Shizuoka University)

9:10 AM - 9:30 AM JST | 12:10 AM - 12:30 AM UTC

[2C-03] The impact of TRPC6 gene silencing using RNA hacking technology on the phenotype of cardiac hypertrophy model mouse

*Takuto Kamura[1], Yousuke Katsuda[1], Taishi Nakamura[2,3], Kenichi Tsujita[3], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[4], Shin-ichi Sato[5], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University, 2. Department of Medical Information Sciences and Administration Planning, Kumamoto University Hospital, 3. Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, 4. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University, 5. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

Oral Session

9:40 AM - 10:40 AM JST | 12:40 AM - 1:40 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Kunihiko Morihiro (The University of Tokyo)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[2C-04] Construction of E. coli Adaptive to Unnatural Nucleotides

*Koji Hashimoto[1,2], Emil Fischer[2], Hiroshi Abe[1], Floyd Romesberg[2] (1. Nagoya University, 2. The Scripps Research Institute)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[2C-05] Regulation of DNA methylation using stability and topology of G-quadruplex

*Saki Matsumoto[1], Hisae Tateishi-Karimata[1], Naoki Sugimoto[1,2] (1. FIBER, Konan University, 2. FIRST, Konan University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[2C-06] Orthogonal signal amplification circuits composed of acyclic XNAs for detection of RNA

*Keiji Murayama[1], Yanglingzhi Chen[1], Ryuya Nagao[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

Poster Short Talk

10:50 AM - 11:50 AM JST | 1:50 AM - 2:50 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Poster short talks (P100-P116)

[P100] Impact of A-to-I RNA editing in mRNA untranslated regions on the translation process

*Yuki Ogata[1], Masatora Fukuda[1,2] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Fukuoka University, 2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University)

[P101] Intramolecular energy transfer utilized single molecule excitation light source

*Yuki Minamide[1], Fumiaki Takano[1], Koichi Tanimoto[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University)

[P102] Accelerated DNA double-strand break and cancer cell-selective cytotoxicity induced by tetranuclear copper complex

*Takuto Tokunaga[1], Machi Hata[1], Yutaka Hitomi[1], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[P103] Specific capture of circulating tumor cells by anti-EpCAM aptamer-modified filters.

*Haruna Hayashi[1], Yusuke Kitamura[1], Yuta Nakashima[1], Keiichiro Yasuda[2], Masaaki Iwatsuki[3], Seitaro Kumamoto[2], Yousuke Katsuda[1], Yoshitaka Nakanishi[1], Hideo Baba[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, 2. OGIC technologies Co., Ltd, 3. Faculty of Life Sciences, Kumamoto University)

[P104] Preparation of bioelectrodes for creatinine detection using three enzymes

*Maki Haraguchi[1], Nobuhumi Nakamura[1] (1. Graduate school of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P105] Development of heme-selective biomolecule-labeling probes for tissue imaging

*Ryo Kakiuchi[1], Tasuku Hirayama[1], Shohei Tsuji[1], Masamitsu Shimazawa[1], Tomonori Tamura[2], Itaru Hamachi[2], Mieko Tsuji[1], Hideko Nagasawa[1] (1. Gifu Pharmaceutical University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P106] Development of a three-dimensional fluorescence imaging method for hypoxia utilizing Cu-catalyzed click reaction

*Iori Tamura[1], Daichi Sakamoto[1], Bo Yi[1], Yutaro Saito[1], Naoki Yamada[1], Yoichi Takakusagi[2], Shimpei Kubota[3], Kazuki Tainaka[4], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, 3. Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, 4. Brain Research Institute, Niigata University)

[P107] Development of Identification Model for Foodborne Pathogens Based on Colony Fingerprinting Using Colony Morphology and Optical Properties

*Hikaru Tago[1], Yusuke Tanaka[1], Someya Takumi[1], Yoshiaki Maeda[1], Tae-Kyu Lim[2], Manabu Harada[2], Tomoko Yoshino[1], Tadashi Matsunaga[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Division of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Malcom Co. Ltd.)

[P108] Development of system for metabolite analysis using phenylboronic acid modified artificial oligonucleotides

*Yuto Motohashi[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[P109] Glutathione Imaging in Frozen Tissue Slice Using Functional Thin-Layer Chromatography

*Koki Nishida[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[P110] Development of a group of enzymes and substrates of "human cell orthogonal" and its application to multiple colored sensitization analysis of cells

*Ryosuke Kaneko[1], Chuya Tateishi[2], Kenta Tanito[2], Kota Yamanaka[2], Noriho Kamiya[1,4], Kaoru Takekawa[5], Teruki Nii[1], Akihiro Kishimura[1,3], Takeshi Mori[1], Yoshiki Katayama[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, 3. Center for Molecular Systems, Kyushu University, 4. Kyushu University Center of Future Chemistry, 5. Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

[P111] Development of electrospun fibermats, encapsulating the lactate-respondent protein

*Yuna Kato Kato[1], Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P112] Structure-based design of fluorescent immunosensor using anti-cortisol nanobody

*Akihito Inoue[1], Taiga Suzuki[1], Yinghui Yang[1], Yasuda Takanobu[2], Bo ZHU[2], Tetsuya Kitaguchi[2], Hiroshi Ueda[2] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Tech, 2. Laboratory for Chemistry and Life Science Institute of Innovative Research, Tokyo Tech)

[P113] Establishment of a protocol for detection of circulating tumor cells from the blood in canine urothelial carcinoma

*Ryo Miura[1], Tatsuya Usui[2], Haru Yamamoto[2], Daigo Azakami[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Institute of Engineering Division of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Institute of Agriculture Division of Animal Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P114] Organelle-targeted NIR Fluorescent Probe for Real-time Monitoring of Glutathione

*Yuki Moro[1], Wu Qian[2], Masayasu Taki[2], Shigehiro Yamaguchi[1,2] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. ITbM, Nagoya University)

[P115] Multi-functionalization of Phospha-rhodamine Dyes Using a Cross-Coupling Reaction

*Yuichi Asada[1] (1. Faculty of Science, Nagoya University)

[P116] Quantitative single-cell analysis of membrane proteins inside the cells

*Yuki Umeda[1], Satoshi Yamaguchi[1], Shinya Yamahira[2], Motonao Nakamura[3], Akimitsu Okamoto[1] (1. School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Center for Medical Sciences, St. Luke's International University, 3. School of science, Okayama University of Science)

Poster Short Talk

11:50 AM - 12:20 PM JST | 2:50 AM - 3:20 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Short talks free discussions (P100-P116)

Oral Session

1:20 PM - 2:20 PM JST | 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Yusuke Takezawa (Graduate School of Science, The University of Tokyo)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[2C-07] Elucidation of G4 binding activity and function of Fibrillarin

*Tatsuki Masuzawa[1], Yamato Karikome[2], Takanori Oyoshi[1,2,3] (1. Graduate school of Science and Technology, Shizuoka University, 2. Graduate school of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 3. Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[2C-08] Development of Dinuclear Bismuth Complexes as RNA Degraders

*Yutaro Hanatani[1], Takashi Kurohara[1], Yasunobu Yamashita[1], Yuri Takada[1], Yukihiro Itoh[1], Takayoshi Suzuki[1] (1. Osaka University, SANKEN)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[2C-09] Exploring of RNA contact sites on human Dicer-Platform/PAZ by photo-crosslinking

*Yukiko Kamiya[1], Shunya Suzuki[1], Noriko Yokota[1], Koki Tsuda[1], Kenji Yoshida[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

Oral Session

2:30 PM - 3:30 PM JST | 5:30 AM - 6:30 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Miki Imanishi (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[2C-10] Chemoenzymatic synthesis of ligand-modified DNA toward the development of metal-responsive DNAzymes

*Yusuke Takezawa[1], Kohei Sakurai[1], Mitsuhiko Shionoya[1] (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[2C-11] Lab-free RNA testing of SARS-CoV-2 variants using RICCA and PalmPAGE system

*Radhika Biyani[1], Kiyoshi Yasukawa[2], Masahiro Takagi[1], Manish Biyani[3] (1. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Agriculture, Kyoto University, 3. BioSeeds Corporation)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[2C-12] Functional characterization of the noncoding regions in human genome by biallelic and large-scale editing technology

*Yasunori Aizawa[1,2] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

Oral Session

3:40 PM - 5:00 PM JST | 6:40 AM - 8:00 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Masayuki Tera (Faculty of Biotechnology and Life sciences)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[2C-13] Large-scale analysis of RNA-fluorescence indicator interaction and screening for RNA-binding molecules

*Kazumitsu Onizuka[1,2], Ryosuke Nagasawa[1,2], Kaoru R Komatsu[3], Emi Miyashita[3,4], Ryohei Iwata[1,2], Mamiko Ozawa[1], Hirohide Saito[4], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. Graduate school of science, Tohoku University, 3. xFOREST, 4. CiRA, Kyoto University)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[2C-14] Oncolytic hairpin DNA pair: Selective cytotoxic inducer through microRNA-driven DNA self-assembly

*Kunihiko Morihiro[1], Hiraki Osumi[1], Akimitsu Okamoto[1] (1. The University of Tokyo)

4:20 PM - 4:40 PM JST | 7:20 AM - 7:40 AM UTC

[2C-15] Controll of Liquid-liquid phase separation of nucleic acids with peptide nucleic acid (PNA)

*Yuichiro Aiba[1], Rikuto Soma[1], Masanari Shibata[1], Shinya Ariyasu[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

4:40 PM - 5:00 PM JST | 7:40 AM - 8:00 AM UTC

[2C-16] Chemical Synthesis of mRNA by Chemical Capping Reaction

*Yasuaki Kimura[1], Naoko Abe[1], Akihiro Imaeda[1], Masahito Inagaki[1], Fumitaka Hashiya[1], Satoshi Uchida[2], Hiroto Iwai[3], Masakazu Honma[3], Junichiro Yamamoto[3], Hiroshi Abe[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Graduate School of Medicine, Kyoto Prefecture University of Medicine, 3. Kyowa Kirin Co., Ltd)

Mon. Sep 12, 2022

Graduate Student Session

10:00 AM - 12:00 PM JST | 1:00 AM - 3:00 AM UTC | Online Site A Online Streaming

Graduate Student Session

Chair: Yuya Nakajima (Nagoya University), Hiroaki Inaba (Nagoya University), Jun Sasahara (Nagoya University)

10:00 AM - 10:40 AM JST | 1:00 AM - 1:40 AM UTC

[3ONA-01] Next-generation Biological Nano-quantum Sensor Technologies Pioneered by Surface Chemical Modification

*Igarashi Ryuji[1] (1. Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology)

10:40 AM - 11:20 AM JST | 1:40 AM - 2:20 AM UTC

[3ONA-02] Frontier of Structural Studies of Intercellular Junctions Using Cryo-Electron Microscopy

*Atsunori Oshima[1] (1. Cellular and Structural Physiology Institute, Nagoya University)

11:20 AM - 12:00 PM JST | 2:20 AM - 3:00 AM UTC

[3ONA-03] Large-scale Evolution Experiments of Microorganisms ~ Toward Prediction and Control of Evolution ~

*Chikara Furusawa[1] (1. Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN)

Poster Session

1:00 PM - 2:00 PM JST | 4:00 AM - 5:00 AM UTC | Online Site A Online Streaming

Poster Session (P1-P33)

[P1] The development of a FRET detection system for elucidation of intracellular mechanisms of SNA modified anti-miRNA oligonucleotide

*Hongyu Zhu[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University.)

[P2] Syntheses of base-labile pseudo-complementary nucleobases of SNA and L-*a*TNA phosphoramidite monomers

*Fuminori Sato[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P3] Chemical modification of tripodal quinone-cyanine fluorescent dye for regulating the recognition of nucleic acids structure

*Yuka Muraoka[1], Yu Yasuhara[2], Marina Iwai[2], Takashi Sakamoto[1,2] (1. Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University, 2. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

[P4] Kinetic analysis of DNA G-quadruplexes folding with structured loop regions

*Minori Nakata[1], Naoki Kosaka[1], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University)

[P5] Evaluation of tripodal quinone-cyanine dies as photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer

*Junya Muramoto[1] (1. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

[P6] The reactivity of Topoisomerase I to G-quadruplex-containing DNA

*Koya Sakamoto[1], Ryoma Yokosawa[1], Maiko Yamanashi[1], Takanori Oyoshi[1] (1. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University)

[P7] Development of functional polypeptides regulating G4-containing promoter

*Yamato Karikome[1], Maiko Yamanashi[1], Akinori Ishihara[1], Takanori Oyoshi[1,2,3] (1. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 2. Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, 3. Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

[P8] Nucleic acid detection using DNA probes that release a ligated product between ruthenium and platinum complexes in a sequence specific manner

*Takeshi Asahina[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University)

[P9] Development of Structural Selective G-Quadruplex Ligand with Novel Ligand Screening

*Yoshiki Hashimoto[1], Takeru Torii[1], Matsuki Kinoshita[1], Keiko Kawauchi[1], Hisae Tateishi-Karimata[2], Naoki Sugimoto[1,2], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University, 2. FIBER, Konan University)

[P10] Development of long-chain elongation reaction based on kinetic analysis of chemical template-directed ligation of L-*a*TNA and SNA

*Hikari Okita[1], Keiji Murayama[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P11] Construction of Highly Diverse Monobody and Macrocyclic Peptide Libraries Based on the Effect of mRNA Sequences on Translation Efficiency and Accuracy

*Shun Umemoto[1], Taishi Kondo[1], Tomoshige Fujino[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P12] Development of fluoregenic synthtic fluorephore/protein hybrid probe for detection of methylated RNA

*Kamikawa Takuya Takuya[1,2], Yuichiro Hori[2], Keisuke Nomura[1], Akari Matsuki[1], Kazuya Kikuchi[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Graduate School of Science, Kyushu University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[P13] Regulation of liquid-liquid phase separation by small molecules targeting RNA G-quadruplex

*Nagisa Takamiya[1] (1. FIRST, Konan University)

[P14] Development of long-chain DNA assembly technology by using 3'-thio-phosphorothiolate oligodeoxynucleotides

*Mikiya Kase[1], Masahito Inagaki[1], Haruka Hiraoka[1], Humitaka Hashiya[1], Naoko Abe[1], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P15] Synthesis and Evaluation of Hoechst-Tethered Oligodeoxynucleotides that Accumulate in Cell Nucleus

*Hiroki Makanai[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University))

[P16] Elucidation of gene function based on RNA Hacking technology by super selectivity Staple oligomer

*Tomoki Tomoki Kida[1], Yousuke Katsuda[1], Takuto Kamura[1], Kotone Lavin[1], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[2], Shin-ichi Sato[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P17] Sequence specific control of liquid droplets composed of RNA G-quadruplex

*Mitsuki Tsuruta[1], Takeru Torii[1], Kazuki Kohata[1], Keiko Kawaichi[1], Hisae Tateishi-Karimata[2], Naoki Sugimoto[1,2], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University, 2. FIBER, Konan University)

[P18] Mechanism of cancer-cell-selective cytotoxicity by dicopper complexes

*Machi Hata[1], Yasuomi Urano[2], Yutaka Hitomi[1], Noriko Noguchi[2], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University, 2. Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University)

[P19] Flexible gene expression increase technology by RNA hacking

*Yua Itsuki[1], Yousuke Katsuda[1], Yusuke Kitamura[1], Hagihara Masaki[2], Sato Shin-ichi[3], Ihara Toshihiro[1] (1. Affiliation Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Advance Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P20] Dynamic control of DNA scaffolded BRET system using strand displacement reaction

*Fumiaki Takano[1], Yuki Minamide[1], Tomoya Niki[1], Shiori Tabana[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University)

[P21] Construction of enzyme complexes for fast degradation of plastics

*Minami Sawada[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P22] Chemoproteomic Identification of Blue Light-Damaged Proteins

*Kohei Toh[1], Motonari Uesugi[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P23] Studies on the association character and structural analysis of tetrameric antibody light chain

*Takahiro Sakai[1], Fitriana Wahyu[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Shohei Yamaguchi[1], Emi Hifumi[2], Taizo Uda[3], Hideaki Ogata[4], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Institute for Research Management, Oita University, 3. Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies, 4. Graduate School of Science, University of Hyogo)

[P24] Analysis of Mechanical Stability of a Cell Surface Protein AtaA_Chead by Molecular Dynamics Simulation

*Jun Sasahara[1], Takayuki Hashimoto[1], Kazushi Fujimoto[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P25] Creation of a bacterial-size liposome with the leaflets of asymmetric protein composition for artificial bacteria.

*Kosaku Noba[1], Shogo Yoshimoto[1], Yoshikazu Tanaka[2], Tomoaki Matsuura[3], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya university, 2. Department of Molecular and Chemical Life Sciences, Tohoku University, 3. Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology)

[P26] Development of small molecule-responsive synthetic protein clustering systems

*Yoko Fukaya[1], Masaru Yoshikawa[1], Sachio Suzuki[1], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P27] Trafficking studies of intracellular and cell surface AMAP-type glutamate receptors using ligand-directed chemistry.

*Yutaro Sugihara[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2,3], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University, 3. ERATO, JST)

[P28] New caged compounds for site-specific activation of AMPA-type glutamate receptors

*Kyohei Soga[1], Toshiaki Furuta[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Department of Biomolecular Science, Toho University)

[P29] Single-molecule toughness analysis of the C-terminal passenger domain of AtaA using AFM

*Amane Kato[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P30] Acceleration of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition induced by antibody-antigen interaction

*Kentaro Nishiyama[1], Hiroki Akiba[1,2], Satoshi Nagata[2], Kouhei Tsumoto[2], Haruhiko Kamada[1,2], Hiroaki Ohno[1,2] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)

[P31] Understanding the catalytic behavior of cross-linking enzyme under crowded condition

*Ryo Sato[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P32] Development of photochromic ligands for quantitative and photo-reversible protein labeling

*Satoshi Hamaguchi[1], Toshiyuki Kowada[1,2,3], Takato Mashita[2], Himadri S. Sarkar[3], Toshitaka Matsui[1,2,3], Shin Mizukami[1,2,3] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Graduate School of Science, Tohoku University, 3. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University)

[P33] Construction and structural analysis of a three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion

*Kodai Fujiwara[1], Haruki Onishi[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Masaru Yamanaka[1], Kento Yonezawa[1], Hironari Kamikubo[1], Takayuki Uchihashi[2], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, Nagoya University)

Poster Session

2:10 PM - 3:10 PM JST | 5:10 AM - 6:10 AM UTC | Online Site A Online Streaming

Poster Session (P34-P66)

[P34] NMR analysis of transient unfolding/refolding protein structures by encapsulation in a self-assembled cage

*Anouk Rossen[1], Takahiro Nakama[1], Maho Yagi-Utsumi[2], Daishi Fujita[3], Koichi Kato[2], Makoto Fujita[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Molecular Science (IMS), 3. Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University)

[P35] Development of novel fluorescent biosensors for visualizing plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate

*Moeka Ajiki[1], Masaru Yoshikawa[1], Fubito Nakatsu[2], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 2. Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University)

[P36] Construction of Pd(II)-containing Artificial Metalloenzymes Using Scaffolds of Steroid Metabolizing Enzymes and their Application to Intramolecular Hydroarylation

*Haruka Nishiwaki[1], Shunsuke Kato[1], Takashi Hayashi[1] (1. Osaka University)

[P37] Preparation of Hydrogel Containing a Protein Unit Modified by Two Different Fluorophores

*Hiroki Innami[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P38] Development of Artificial Antibody for Antibody-anchored Natural Killer Cell Therapy

*Chihiro Tanaka[1], Tomoshige Fujino[1], Yui Harada[2,3], Yoshikazu Yonemitsu[2,3], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Pharmaceutical Sciences Kyushu University, 3. R&D Laboratory for Innovative Biotherapeutics Science, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P39] Chemogenetic activation of adenosine A_{2A} receptors focusing on structural information.

*Midori Makino[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P40] Exploration of orthogonal activation of mGlu1 using Pd complexes having different ligands.

*Suzuka Kurakake[1], Yuta Miura[1], Akinobu Senoo[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P41] Selective Recognition of Unprotected Peptides by the Closed Cavity of a Polyaromatic Capsule

*Mayu Shuto[1] (1. Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech)

[P42] A Photoswitchable fluorescent Probe Using a Photochromic Quencher with High Photostability Assisted by Protein-Surface Modification

*Kenji Torii[1], Yuichiro Hori[2], Kazuya Kikuchi[1,3] (1. Graduate School of Engeering, Osaka University, 2. Faculty of Sciences, Kyushu University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[P43] Induction of protein–sugar weak interactions by co-encapsulation within a self-assembled spherical cage

*Miri Tadokoro[1], Takahiro Nakama[1], Makoto Fujita[1,2] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Molecular Science)

[P44] Self-assembly of Imidazolyl Zinc Porphyrins in Lipid Bilayer Membrane

*Yuto Iura[1] (1. Graduate School of Science, Tokyo University of Science)

[P45] Characterization and Reactivity Studies on a Series of Rare Cu(II)-halide Complexes Having Distorted Tetrahedral Geometries as Model Complexes of Type 1 Copper Centers

*Lan Yang[1], Yuma Morimoto[1], Hideki Sugimoto[1], Shinobu Itoh[1] (1. Osaka University)

[P46] Construction of artificial hemoprotein multimers based on metal coordination to recognize biomolecules

*Hiroaki Inaba[1], Yuma Shisaka[1], Garyo Ueda[1], Erika Sakakibara[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Hiroshi Sugimoto[2], Osami Shoji[1] (1. Graduate school of Science, Nagoya University, 2. RIKEN SPring-8)

[P47] Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing photoinduced elimination of axial ligand of metallophthalocyanines

*Kohei Nogita[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P48] Energy-independent lipid-membrane permeation of co-assemblies formed through complementary interaction

*Hiroki Obayashi[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1,2], Masahiro Goto[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P49] Analysis of *O*-glycan type oligosaccharides in prostate cancer cells under hypoxia and elucidation of their functions in cell migration using saccharide primer method

*Daiki Yamamoto[1], Takeo Kosaka[2], Mototsugu Oya[2], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University, 2. Keio University School of Medicine)

[P50] NMR analysis using H/D isotope shifts to explore the hydration behavior of carbohydrates

*Hiroaki Tatsuoka[1], Takumi Yamaguchi[1,2] (1. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University)

[P51] Profiling of glycans in animal cells by the saccharide primer method and correlation analysis with influenza virus susceptibility

*Mayu Okuda[1], Kazuma Ohgata[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P52] Organelle-selective phosphatidylinositol labeling

*Takami Kimura[1], Tomonori Tamura[1,2], Itaru Hamachi[1,2] (1. Kyoto University, Graduate school of Engineering and Faculty of Engineering, 2. JST ERATO)

[P53] Exploration of drug-resistant factors in gastric circulating tumor cells by single-cell transcriptome analysis

*Yoshiko Kano[1], Mayuko Horikawa[1], Fumiaki Koizumi[2], Tatsu Shimoyama[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital)

[P54] Heterogeneous expression of unique genes in magnetotactic bacteria toward morphological control of magnetic nanoparticles

*Chihiro Miura[1], Nanami Shinohara[1], Tadashi Matsunaga[1,2], Atsushi Arakaki[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology)

[P55] Whole-Cell Biocatalysts Harboring P450 Enzymes Triggered by Decoy Molecules for Microbial Degradation of Environmental Pollutants

*Fumiya Ito[1], Shinya Ariyasu[1], Masayuki Karasawa[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P56] Development of perfluorocarbon-encapslated elastic nanoparticles for ^{19}F MRI contrast agents

*Yuki Konishi[1], Fuminori Sugihara[2,3], Masafumi Minoshima[1], Kazuya Kikuchi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ., 3. Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

[P57] Creation of transdermal malaria vaccine and analysis of immune response

*Keisuke Tanaka[1], Kosuke Minamihata[2], Rie Wakabayashi[2], Noriho Kamiya[2,4], Masahiro Goto[2,3,4] (1. Kyushu University Graduate School of Engineering, 2. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 3. Next Generation Transdermal Absorption Center, 4. Center for Future Chemistry and Innovation)

[P58] Development of novel ionic liquid nanoparticle formulations and transdermal delivery of nucleic acid drugs

*Kiyohiro Toyofuku[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1], Masahiro Goto[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University)

[P59] Preparation of the fusion protein of VHH antibody and amphiphilic OLE-ZIP and evaluation of its capsule formation property

*Kousuke Takahashi[1], Taiki Nishiyama, Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P60] Creation of an enveloped artificial viral capsid through hydrophobic interaction

*Miu Hirahara[1], Kentarou Sakamoto[1], Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[P61] Development of RaPID system-based library vs. library selection

*Yuto Ohno[1], Alexander Vinogradov[1], Hiroaki Suga[1] (1. School of Science, The University of Tokyo)

[P62] Optical control of microtubule stabilization by spiropyran-modified Tau-derived peptides

*Minamo Sakaguchi[1], Hiroshi Inaba[1], Arif Md. Rashedul Kabir[2], Akira Kakugo[2], Kazuki Sada[2], Kazunori Matuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Science, Hokkaido University)

[P63] Molecular transport from viral replica embedded with gap junction-forming membrane proteins into liposomes and cells

*Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Yoshihiro Sasaki[2], Kazunari Akiyoshi[2], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P64] Direction-Switchable One-Pot Peptide Ligation for Chemical Protein Synthesis

*Koki Nakatsu[1], Akimitsu Okamoto[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University)

[P65] Selection of GM1-mimic Peptides by Phage-display Technology Using Acoustic Levitation

*Akiko Yoshida[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P66] Synthesis and Cancer-Cell-Selective Toxicity of a Dicopper(II) Complex with NLS-Peptide Attached Phenol-2,6-bis(amide-tether-tacn) Ligand

*Ami Kodama[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

Poster Session

3:20 PM - 4:20 PM JST | 6:20 AM - 7:20 AM UTC | Online Site A Online Streaming

Poster Session (P67-P100)

[P67] Design of peptide interface to expose the cytoplasmic side of the cell membrane on graphene

*Shogo Saito[1], Soichiro Tatematsu[1], Masayoshi Tanaka[1], Mina Okochi[1] (1. Tokyo Institute of Technology)

[P68] Selection of Peptides That Bind to MDM2 Protein Using an Engineered Split Intein

*Yutaro Watanabe[1], Tsuyoshi Takahashi[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Gunma University)

[P69] Development of an efficient chemical synthesis route for dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism

*Yuya Takahashi[1], Satomi Kori[2], Kyohei Arita[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. The university of nagoya, 2. Yokohama City University)

[P70] WYP-rich macrocyclic peptide library as a high quality library for *in vitro* selection

*Taiga Sumi[1], Tomoshige Fujino[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Guraduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P71] Development of the cyclic peptide which inhibit amyloid β aggregation induced by GM1 cluster on lipid raft

*Erika Miyamoto[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P72] Creation of antigen-modified peptide assemblies for activation of immune cells

*Yamaguchi Kyohei[1] (1. Graduate School of Engineering, KyushunUniversity)

[P73] Fabrication of emulsion vaccines based on enzyme reactive self-assembling peptides

*Ayato Higuchi[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P74] Construction of a stimuli-responsive hemoprotein-based hydrogel driven by folding and unfolding behaviors

*Kazuki Kageyama[1], Takahiro Urayama[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka university)

[P75] Development of Cysteine-selective Covalent Drugs Utilizing β-Fluorovinylsulfonamides

*Shunsuke Watanabe[1], Keisuke Tokunaga[1], Yuya Hirose[1], Yudai Tanaka[1], Naoya Shindo[1], Akio Ojida[1] (1. Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyushu university)

[P76] *De novo* chemogenetic approach for subtype selective regulation of dopamine receptor activity

*Shuntaro Kashiwa[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Nagoya University)

[P77] Biosynthesis of prostaglandin by the marine microalga with cyclooxygenase

*Miho Kikuchi[1], Nana Matsumoto[1], Yuki Tsuru[1], Yoshiaki Maeda[2], Tomoko Yoshino[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Faculty of Life and environmental Sciences, Tsukuba University)

[P78] Dichlorotriazine as a new electrophilic protein label for gold-nanoparticle affinity labeling probes

*Ayaka Tsuruno[1], Shione Kamoshita[1], Kaori Sakurai[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P79] AMPA-type glutamate receptor covalent inhibitor for light control at the synaptic level

*Akihiro Shibata[1], Kyohei Soga[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P80] Coordination Chemogenetics for Selective Inhibition of class A GPCR

*Takuto Sugawara[1], Muneo Tsujikawa[2], Yuta Miura[1], Akinobu Senoo[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate school of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University)

[P81] Artificial palmitoylation of protein controls the raft localization and intracellular delivery

*Kazuki Uchida[1], Hiroki Obayashi[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1], Naofumi Shimokawa[2], Masahiro Takagi[2], Noriho Kamiya[1] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P82] An Artificial Photo-redox Enzyme Constructed by Incorporation of an Organic Photosensitizer into a Protein

*Yuki Uchida[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P83] Hydroxylation of Propane Using Intracellular Cytochrome P450BM3 in Water/Ionic Liquid Biphasic System

*Yuki Sugai[1], Masayuki Karasawa[1], Yusaku Kodama[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P84] Combination of cpHaloTag and bio-orthogonal two-step labeling for trafficking studies of transmembrane proteins.

*Jun Ikeshita[1], Yutaro Sugihara[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P85] Development of artificial metalloenzymes for stereoselective hetero Diels-Alder reaction

*Saho Yoshioka[1], Yoshitsugu Morita[2], Nobutaka Fujieda[2] (1. Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 2. Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University)

[P86] Creation of an Artificial Metalloenzymes toward Stereodivergent Michael Addition Reaction

*Ryusei Matsumoto[1], Saho Yoshioka[1], Tomohito Marumo[1], Yoshitsugu Morita[1], Nobutaka Fujieda[1] (1. Osaka Metro. Univ.)

[P87] Kinetic analysis of the interaction of agonist antibodies targeting OX40.

*Kan Ujiie[1], Aki Tanabe[2], Satoru Nagatoishi[3], Kouhei Tsumoto[1,3,4] (1. Dept. of Bioeng., Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, 2. AIDS Res. Center, NIID, 3. Inst. Med. Sci., The Univ. of Tokyo, 4. Dept. of Chem Biotech., Sch. Eng., The Univ. of Tokyo)

[P88] Synthesis of cyclic oligo (ethylene glycol) for suppression of amyloid insulin fibrillation

*Thirasara Sammani PituwalaKankanamge[1] (1. Life science and technology , Tokyo Institute of Technology)

[P89] Development of opto-chemogenetics tool for reversible reglation of adenosine A_{2A} receptors

*Harufumi Suzuki[1], Doura Tomohiro[1], Kiyonaka Shigeki[1] (1. Engineering)

[P90] Development of technology for selective degradation of proteins in mitochondria matrix

*Wakana Yamada[1], Shinichi Sato[1,2], Minoru Ishikawa[1], Shusuke Tomoshige[1] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[P91] Chemogenetic regulation of adenosine A2A receptor focusing on the action of the subtype-selective antagonists

*Yuma Matsuoka[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P92] DNA Labeling to Target Protein by Photoreaction of Benzophenone and Its Application

*Ryota Hidaka[1], Masaru Mori[2], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 2. Institute for Advanced Bioscience, Keio University)

[P93] TRAP display selection of monobodies for the detection of microinflammation.

*Ryusei Matsuo[1], Tomoshige Fujino[1], Jing-Jing Jiang[2], Murakami Masaaki[2], Hayashi Gosuke[1], Murakami Hiroshi[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Medicine, Hokkaido University, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P94] Novel Chemogenetics for Subunit-selective Inhibition of AMPA Receptor Activity

*Yuta Deen Miura[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P95] Preparation of cytochrome b_{562} oligomers using efficient disulfide bond formation

*Karen Kurihara[1], Julian Wong Soon[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P96] Improving the efficiency of heme incorporation into recombinant cytochrome P450 by co-expression of ferrochelatase

*Eri Akagawa[1], Maki Sawada[1], Masafumi Yohda[1], Nobuhumi Nakamura[1] (1. Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P97] Preparation and functional evaluation of nonwoven fabrics made of crosslinkable polymers using bioorthogonal reaction.

*Ishiguro Taira[1] (1. Nagoya Institute of Technology)

[P98] Tensile characteristics of nestin tail domain by AFM

*Rina Tokuoka[1], Koki Uchida[1], Ayana Yamagishi[1,2], Daijiro Takeshita[3], Chiaki Yoshikawa[4], Tomohiko Yamazaki[4], Taro Q.P. Uyeda[5], Chikashi Nakamura[1,2] (1. Grad. Sch. Eng. TUAT, 2. Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST, 3. Biomed. Res. Inst., AIST, 4. NIMS, 5. Waseda Univ.)

[P99] Development of eco-friendly bromolactone synthase

*Takuya Matsuura[1], Hideyasu China[1], Takashi Nakamura[1], Hidehito Mukai[1] (1. Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

[P100] Impact of A-to-I RNA editing in mRNA untranslated regions on the translation process

*Yuki Ogata[1], Masatora Fukuda[1,2] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Fukuoka University, 2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University)

Closing Remarks

4:30 PM - 5:30 PM JST | 7:30 AM - 8:30 AM UTC | Online Site A Online Streaming

Closing Remarks

4:30 PM - 5:30 PM JST | 7:30 AM - 8:30 AM UTC

[3E-1630-1add] Closing Remarks

Oral Session

10:00 AM - 12:00 PM JST | 1:00 AM - 3:00 AM UTC | Online Site B Online Streaming

Online Session

Chair: Hiromu Kashida (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[3ONB-01] Design of fluorescent probes based on triplex-forming PNAs targeting the influenza A virus RNA promoter region

*Yusuke Sato[1], Hiromasa Miura[1], Takaaki Tanabe[1], Seiichi Nishizawa[1] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[3ONB-02] Formation of double-stranded DNA assemblies and their properties under crowded conditions

Tetsunao Makino[1], Yuuki Yamaguchi[1], *Makiko Tanaka[1] (1. The University of Electro-Communications)

10:40 AM - 11:00 AM JST | 1:40 AM - 2:00 AM UTC

[3ONB-03] Development of new membrane permeable oligonucleotides for therapeutics

*Fangjie Lyu[1] (1. Graduate School of Science ; School of Science, Nagoya University)

11:00 AM - 11:20 AM JST | 2:00 AM - 2:20 AM UTC

[3ONB-04] Novel non-aqueous solvents in life sciences

*Kosuke Kuroda[1], Yui Kato[1], Tetsuo Komori[1], Kenji Takahashi[1], Kazuaki Ninomiya[1], Kojiro Ishibashi[1], Eishu Hirata[1] (1. Kanazawa University)

11:20 AM - 11:40 AM JST | 2:20 AM - 2:40 AM UTC

[3ONB-05] Studies on the new method for an antibody to be converted to its catalytic antibody

*Emi Hifumi[1,2], Tamami Nonaka[1], Hiroaki Taguchi[3], Taizo Uda[4] (1. Institute for Research Management, Oita University , 2. Research Center for GLOBAL/LOCAL Infectious Diseases, Oita University, 3. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science, 4. Institute of Systems, Information Technologies, and Nanotechnologies)

11:40 AM - 12:00 PM JST | 2:40 AM - 3:00 AM UTC

[3ONB-06] Immunostimulatory Effect of Phosphodiester-based CpG Oligodeoxynucleotides using an Antiparallel Guanine-Quadruplex Structure as a Scaffold

*TOMOHIKO YAMAZAKI[1,2], Fika Ayu SAFITRI[1,3], Anh Thi Tram TU[1,2], Nguyen Bui Thao LE[1,2], Soumitra PATHAK[1,2], Kaori TSUKAKOSHI[4], Kazunori IKEBUKURO[4] (1. Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, 2. Graduate School of Life Science, Hokkaido University, 3. Bandung Institute of Technology , 4. Graduate School of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Poster Session

1:00 PM - 2:00 PM JST | 4:00 AM - 5:00 AM UTC | Online Site B Online Streaming

Poster Session (P101-P134)

[P101] Intramolecular energy transfer utilized single molecule excitation light source

*Yuki Minamide[1], Fumiaki Takano[1], Koichi Tanimoto[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University)

[P102] Accelerated DNA double-strand break and cancer cell-selective cytotoxicity induced by tetranuclear copper complex

*Takuto Tokunaga[1], Machi Hata[1], Yutaka Hitomi[1], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[P103] Specific capture of circulating tumor cells by anti-EpCAM aptamer-modified filters.

*Haruna Hayashi[1], Yusuke Kitamura[1], Yuta Nakashima[1], Keiichiro Yasuda[2], Masaaki Iwatsuki[3], Seitaro Kumamoto[2], Yousuke Katsuda[1], Yoshitaka Nakanishi[1], Hideo Baba[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, 2. OGIC technologies Co., Ltd, 3. Faculty of Life Sciences, Kumamoto University)

[P104] Preparation of bioelectrodes for creatinine detection using three enzymes

*Maki Haraguchi[1], Nobuhumi Nakamura[1] (1. Graduate school of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P105] Development of heme-selective biomolecule-labeling probes for tissue imaging

*Ryo Kakiuchi[1], Tasuku Hirayama[1], Shohei Tsuji[1], Masamitsu Shimazawa[1], Tomonori Tamura[2], Itaru Hamachi[2], Mieko Tsuji[1], Hideko Nagasawa[1] (1. Gifu Pharmaceutical University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P106] Development of a three-dimensional fluorescence imaging method for hypoxia utilizing Cu-catalyzed click reaction

*Iori Tamura[1], Daichi Sakamoto[1], Bo Yi[1], Yutaro Saito[1], Naoki Yamada[1], Yoichi Takakusagi[2], Shimpei Kubota[3], Kazuki Tainaka[4], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, 3. Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, 4. Brain Research Institute, Niigata University)

[P107] Development of Identification Model for Foodborne Pathogens Based on Colony Fingerprinting Using Colony Morphology and Optical Properties

*Hikaru Tago[1], Yusuke Tanaka[1], Someya Takumi[1], Yoshiaki Maeda[1], Tae-Kyu Lim[2], Manabu Harada[2], Tomoko Yoshino[1], Tadashi Matsunaga[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Division of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Malcom Co. Ltd.)

[P108] Development of system for metabolite analysis using phenylboronic acid modified artificial oligonucleotides

*Yuto Motohashi[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[P109] Glutathione Imaging in Frozen Tissue Slice Using Functional Thin-Layer Chromatography

*Koki Nishida[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[P110] Development of a group of enzymes and substrates of "human cell orthogonal" and its application to multiple colored sensitization analysis of cells

*Ryosuke Kaneko[1], Chuya Tateishi[2], Kenta Tanito[2], Kota Yamanaka[2], Noriho Kamiya[1,4], Kaoru Takekawa[5], Teruki Nii[1], Akihiro Kishimura[1,3], Takeshi Mori[1], Yoshiki Katayama[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, 3. Center for Molecular Systems, Kyushu University, 4. Kyushu University Center of Future Chemistry, 5. Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

[P111] Development of electrospun fibermats, encapsulating the lactate-respondent protein

*Yuna Kato Kato[1], Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P112] Structure-based design of fluorescent immunosensor using anti-cortisol nanobody

*Akihito Inoue[1], Taiga Suzuki[1], Yinghui Yang[1], Yasuda Takanobu[2], Bo ZHU[2], Tetsuya Kitaguchi[2], Hiroshi Ueda[2] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Tech, 2. Laboratory for Chemistry and Life Science Institute of Innovative Research, Tokyo Tech)

[P113] Establishment of a protocol for detection of circulating tumor cells from the blood in canine urothelial carcinoma

*Ryo Miura[1], Tatsuya Usui[2], Haru Yamamoto[2], Daigo Azakami[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Institute of Engineering Division of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Institute of Agriculture Division of Animal Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P114] Organelle-targeted NIR Fluorescent Probe for Real-time Monitoring of Glutathione

*Yuki Moro[1], Wu Qian[2], Masayasu Taki[2], Shigehiro Yamaguchi[1,2] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. ITbM, Nagoya University)

[P115] Multi-functionalization of Phospha-rhodamine Dyes Using a Cross-Coupling Reaction

*Yuichi Asada[1] (1. Faculty of Science, Nagoya University)

[P116] Quantitative single-cell analysis of membrane proteins inside the cells

*Yuki Umeda[1], Satoshi Yamaguchi[1], Shinya Yamahira[2], Motonao Nakamura[3], Akimitsu Okamoto[1] (1. School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Center for Medical Sciences, St. Luke's International University, 3. School of science, Okayama University of Science)

[P117] Effects of Axial Ligand on Cyclohexane Hydroxylation by Compound I Model Complex

*Toshiya Higashi[1], Yuma Morimoto[1], Hiroshi Fujii[2], Shinobu Itoh[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Nara Women's University)

[P118] Characterization of biochemical property of β-carboxysome shell protein CcmO toward the development of novel nanomaterials

*Eiichiro Okubo[1], Yuka Sugiyama[1], Masaya Ohata[1], Ryutaro Nakamura[1], Hirotoshi Matsumura[1], Keiichi Noguchi[2], Masafumi Yohda[2], Masafumi Odaka[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Akita University, 2. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P119] Preparation and applications of agarose gel beads carrying carbohydrate-appendages

*Keisuke Yoshida[1] (1. Graduate School of Life Sciences, Toyo University)

[P120] A comprehensive analysis of lipid-specific proteins with lipid-immobilized beads

*Masayuki Morito[1], Masanao Kinoshita[1], Takayuki Kawai[1], Nobuaki Matsumori[1] (1. Graduate School of Science, Kyushu University)

[P121] Synthesis and applications of bacteria cellulose hydrogels having pendent carbohydrates units.

*Mizuki Tobito[1], Teruaki Hasegawa[2] (1. Graduate School of Life Sciences, Toyo University, 2. Faculty of Life Sciences, Toyo University)

[P122] Inhibition of quorum sensing by capturing *Staphylococcus aureus* intercellular communication molecules

*Ruki Inagaki[1], Naoya Tatsumi[1], Eri Nasuno[2], Norihiro Kato[2] (1. Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya University, 2. School of Engineering, Utsunomiya University)

[P123] Contribution of water-insoluble glucan to the stability of biofilms formed by *Streptococcus mutans*

*Narumi Ushijima[1], Eri Nasuno[1], Hidenobu Senpuku[2], Norihiro Kato[1] (1. School of Engineering, Utsunomiya University, 2. School of Department of Dentistry, Dentistry at Matsudo)

[P124] Development of a novel photo-induced cyclization reaction based on the unique reactivity of photo-sensitive oxime structures

*Hidenori Okamura[1,2], Momoka Iida[1,2], Yui Kaneyama[1,2], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University)

[P125] Development of GSH-responsive PAI/PTT Theranostic Agent

*Takaya Sugahara[1], Kohei Nogita[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P126] Isolation of Useful Microorganisms Using Artificial Siderophore-iron Complex Modified Substrates

*Ririka Sugita[1], Suguru Endo[1], Tomohiro Ozawa[1], Hideki Masuda[1,2], Tomohiko Inomata[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 2. Faculty of Engineering, Aichi Institute of Technology)

[P127] Exploring Target Proteins of Novel Plant Growth Promoters

*Yuma Shisaka[1], Shuhei Kusano[1], Sakuya Nakamura[1], Masanori Izumi[1], Shinya Hagihara[1] (1. RIKEN Center for Sustainable Resource Science)

[P128] Synthesis and Cellular Delivery of Nano-Sized Ribbon-Shaped Gold Crystals Using Nuclear Localization Signal-Tethering Peptide as A Template

*Kazutoshi Ishida[1], Takahito Imai[1], Masayuki Yamasaki[2], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Graduate School of Advanced Science and Technology, Ryukoku University, 2. Graduate School of Food Sciences and Human Nutrition, Ryukoku University)

[P129] Synthesis of Cationic Peptides Toward Boron Delivery into Cells

*Takahiro Kayashita[1] (1. Graduate School of advanced Science and Technology)

[P130] Efficient Gene Suppression by the Novel Ligand Conjugated siRNA in the Skeletal Muscle and Central Nervous System

*Kei Takiyama[1], Shinnichi Yokota[1], Motoki Sawamura[1], Keisaku Wakabayashi[1], Mado Nakajima[1], Norikazu Kuroda[1], Takashi Nakamura[2], Hiroko Morino[2], Takahiro Fujiwara[1], Takeshi Kasuya[1], Yasuo Sasaki[1], Shin-ichiro Hori[1], Akira Kugimiya[1] (1. Shionogi & Co., Ltd., 2. Shionogi TechnoAdvance Research CO., LTD.)

[P131] Light-dependent induction of apoptosis using pre-miR-664a-loaded Lactsomes

*Mai Miyamoto[1] (1. Graduate School of Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama University)

[P132] pDNA delivery by an iminoboronate-functionalized dendrimer

*Akira Matsumoto[1], Tsuyoshi Minami[1] (1. Institute of Industrial Science, The University of Tokyo)

[P133] Modification of Titanium Surface with Collagen Model Peptides Containing both Titanium Binding and Cell Recognition Sites

*Shun TANAKA Tanaka[1], Yoshifumi Aoi[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. ryukoku University)

[P134] Structural stability and calcium ion responsibility of a collagen model peptide with a carboxy group

*Naoki Takemura[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

Poster Session

2:10 PM - 3:10 PM JST | 5:10 AM - 6:10 AM UTC | Online Site B Online Streaming

Poster Session (P135-P168)

[P135] Synthesis of tandem homodimers that inhibit structural transition of their monomer peptide

*Naoki Takemura[1], Tomomi Iori[1], Hideyasu Fukushima[1], Yasuhiro Nakabayashi[1], Yoshiki Matsumoto[1], Masayuki Yamasaki[2], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Department of Materials Chemistry, Ryukoku University, 2. Food Science and Human Nutrition, Ryukoku University)

[P136] Development of peptide carriers suitable for intracellular delivery

*Rika Fujisawa[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Ryukoku university graduate school)

[P137] Secondary structure of Peptides Conjugated with a Mitochondria Localization Signal Sequence

*Katsuya Kishine[1] (1. Department of Material Chemistry, Ryukoku University)

[P138] Synthesis of Aromatic Compounds with Selective Gold Recovery Mechanism

*Ryo Okuda[1], Takahito Imai[1], Masahiro Asano[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Advanced Science and Technology)

[P139] Surface modification of gold nanorods with mitochondria – targeting peptide.

*Shoya Nakamura[1], Takahito Imai[1], Masayuki Yamasaki[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[P140] Chemical synthesis and functional evaluation of monobody by one-pot peptide ligation reaction

*Eichi Ozawa[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P141] Directed evolution to produce an improved chemigenetic Photoactive Yellow Protein (PYP)-based Ca^{2+} biosensor

*Takuya Terai[1], Marcio Marinho[1], Hayato Kadoya[1], Saaya Hario[1], Yusuke Nasu[1], Robert E. Campbell[1,2] (1. Department of Chemistry, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, The University of Alberta)

[P142] Chemical Oxidation and Photo-oxidation of Bacteriochlorophyll *a* in LH2 Protein from the Purple Photosynthetic Bacterium *Thermochromatium tepidum*

*Haruna Hirao[1], Yukihiro Kimura[2], Zheng-Yu Wang-Otomo[3], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Agriculture, Kobe University, 3. Faculty of Science, Ibaraki University)

[P143] Effects of oxidation of B800 bacteriochlorophyll *a* in the LH3 protein of the purple photosynthetic bacterium on excitation energy transfer

*Kohei Hamanishi[1], Yusuke Takashima[1], Tetsuya Yamamoto[2], Kazuki Hinago[2], Yutaka Nagasawa[2], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University)

[P144] Mirror Image Selection for Anti-MCP-1 Artificial Antibody

*Sayaka Miura[1], Taishi Kondo[1], Yusuke Usui[2], Shinya Ooishi[3], Tomoshige Fujino[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 3. Kyoto Pharmaceutical University, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society)

[P145] Development of a fluorescent probe for visualizing phase-separated cellular bodies in DNA repair processes

*Airi Watanabe[1], Risako Fukata[1], Yuki Tashiro[1], Hidenori Kaneoka[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering)

[P146] Structural analysis of pH-responsive piston protein assembly

*Koki DATE[1], Thuc Toan PHAM[1], Takayuki UCHIHASHI[2], Hironari KAMIKUBO[3], Chihong SONG[4], Kazuyoshi MURATA[4], Takafumi UENO[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Graduate School of Science, Nagoya University, 3. School of Science and Technology, NAIST, MS, 4. ExCELLS/NIPS)

[P147] Observation of protein structure network involved in modulation of cytokine activity of macrophage migration inhibitory factor by neutron crystallography

*Toshinori Ezawa[1], Yumi Kariya[2], Yu Hirano[3], Katsuhiro Kusaka[4], Taro Tamada[3], Hideki Wakui[1], Masafumi Odaka[1], Hirotoshi Matsumura[1] (1. Graduate School of Engineering Science, Akita University, 2. Cooperative Research Center, Akita University, 3. Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology, 4. Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University)

[P148] Shell-type microdroplets containing proteins generated within aqueous two-phase systems

*Yumeno Hayashi[1], Yusuke Fujise[1], Yuki Suzuki[1], Kanta Tsumoto[1] (1. Division of Chemistry for Materials, Graduate School of Engineering, Mie University)

[P149] Covalent inhibitors for drug-resistant BTK mutant using novel electrophilic warhead

*Masaharu Kawano[1], Tomonori Tamura[1], Shunsuke Murakawa[1], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. ERATO JST)

[P150] Development of the Detection for the Interaction between Lectins and Saccharides using Fluorescent Magnetic Nanoparticles

*Yoshio Suzuki[1] (1. AIST)

[P151] Structure activity relationship of new NASA derivative warhead for *in vivo* application

*Shunsuke Murakawa[1], Masaharu Kawano[1], Tomonori Tamura[1], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. JST ERATO)

[P152] Full-length structure analysis of Cry1Aa from Bt bacteria for designing in-cell protein crystal template.

*Junko Tanaka[1], Satoshi Abe[1], Tohru Hayakawa[2], Takafumi Ueno[1] (1. Life-Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama University)

[P153] Fluorescent detection of peroxisomal fatty acid degradation activity in cultured cells using a chemical probe

*Yuya Matsuo[1], Shohei Uchinomiya[1], Tomoki Nagaura[1], Akio Ojida[1] (1. Pharmaceutical sciense, Kyushu University)

[P154] Rapid Photoaffinity Labeling of Receptor Proteins on Cell Surface and Its Application of Interactome Analysis

*Haruka Suetsugu[1], Takuya Imamura[1], Naoki Zenmyo[1], Kaori Tabata[1], Shohei Uchinomiya[1], Akio Ojida[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical sciences, Kyushu University)

[P155] Catalytic photochirogenesis mediated by serum albumins: Mechanistic studies on enantiodifferentiating hetero-photocyclodimerization of anthracene derivatives

*Masaki Nishijima[1], Misaki Kawai[1], Sota Toyooka[1], Yuya Fujishiro[1], Yasuyuki Araki[1], Tadashi Mori[2], Yoshihisa Inoue[2], Takehiko Wada[1] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. Osaka University)

[P156] Research on enzyme activity of Peroxidase on clay nanosheets

*Katsuya Sato[1], Yuta Oiwake[1], Kyosuke Arakawa[1], Tetsuya Shimada[1], Tamao Ishida[1,2], Shinsuke Takagi[1,2] (1. Graduate School of Urban Environmental Sciences, Tokyo Metropolitan University, 2. ReHES of Tokyo Metropolitan University)

[P157] DNA-modified FRET-based cathepsin probes for simultaneous detection of cathepsin B and D activities

*Yuya Shibano[1], Zhengxiao Zhang[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of advanced energy, Kyoto University)

[P158] Discovery of a 14-3-3 Inhibitor and Chemical Regulation of Stomatal Movement

*Kotaro Nishiyama[1], Yusuke Aihara[2], Sakuya Nakamura[1], Takehiro Suzuki[1], Koji Takahashi[2,3], Toshinori Kinoshita[2,3], Naoshi Dohmae[1], Ayato Sato[3], Shinya Hagihara[1,3] (1. RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 2. Graduate School of Science, Nagoya University, 3. WPI-ITbM, Nagoya University)

[P159] Highly Sensitive Detection and Identification of SARS-CoV-2 Variants by A Novel Quantitative PCR Completely Discriminating Single Point Mutation of *KRAS*

*Masayuki Fujii[1], Ryosuke Fujita[1], Mai Ohishi[1] (1. Kindai University)

[P160] Membrane permeable oligonucleotide (MPON) modified with disulfide units induces efficient exon skipping through enhanced membrane permeability and nucleus transfer

*Haruka Hiraoka[1], Zhaoma Shu[1], Bao Tri Le[2], Keiko Masuda[3], Kosuke Nakamoto[1], Kotaro Hayashi[4], Naoko Abe[1], Yasuaki Kimura[1], Rakesh N. Veedu[2], Yoshihiro Shimizu[3], Satoshi Uchida[5], Hiroshi Abe[1,3,6] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Murdoch University, 3. RIKEN, 4. Innovation Center of NanoMedicine, 5. Graduate School of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, 6. iGCORE)

[P161] Development of a coupled *in vitro* transcription/translation system for highly efficient eukaryotic gene expression in supergiant artificial cells

*Hajime TAKAHASHI[1], Atsushi OGAWA[1] (1. Proteo-Science Center, Ehime University)

[P162] Development of ribosomal RNA imaging probe based on cationic oligo peptides

*Michiyuki Suzuki[1], Yusuke Sato[1], Nao Togashi[1], Seiichi Nishizawa[1] (1. Graduate school of science, Tohoku university)

[P163] Photo-Labeling of Nucleic Acid by Photo-Catalyst Tethered DNA Probe

*Yuuhei Yamano[1], Kazumitsu Onizuka[1,2], Madoka Sasaki[2], Shinichi Sato[3], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Graduate School of Science, Tohoku University, 3. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[P164] Validity evaluation of nearest-neighbor model in stem region of RNA pseudoknots

*Tamaki Endoh[1], Sagar Satpathi[1], Naoki Sugimoto[1] (1. Konan University)

[P165] Effect of guanine quadruplex and its regulation in replication reaction of RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2

*Shuntaro Takahashi[1], Saki Matsumoto[1], Hisae Tateishi-Karimata[1], Byeang Hyean Kim[2], Naoki Sugimoto[1,3] (1. FIBER, Konan University, 2. POSTECH, 3. FIRST, Konan University)

[P166] Development of lumazine derivative-cyanine dye conjugates for detection of thymine glycol containing DNA duplex.

*Yoshihide Takaku[1], Yusuke Sato[1], Ken Akamatsu[2], Seiiti Nishizawa[1] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. National Institutes for Quantum Science and Technology)

[P167] Development of long dsDNA penetration method using oligodeoxynucleotide containing ultrafast photo-cross-linking nucleoside for genome manipulation.

*Ami Shimabara[1], Yasuha Watanabe[1], Siddhant Sethi[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. Bioscience, Biotechnology, and Biomedical Engineering Research Area , Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P168] Development of novel artificial nucleic acids specifically recognizing and sequencing the oxidatively damaged base 2-oxoadenine in DNA

*Ryo Miyahara[1], Yosuke Taniguchi[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University)

Poster Session

3:20 PM - 4:20 PM JST | 6:20 AM - 7:20 AM UTC | Online Site B Online Streaming

Poster Session (P169-P202)

[P169] Development of α-TFOs capable of recognizing C-G and T-A base pairs

*Yuya Okawara[1], Gaohang Tu[1], Jijun Liang[1], Akihiro Ohkubo[1] (1. Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[P170] Development of identification method of Chemical modification in mRNA

*Sana Ohashi[1], Fumitaka Hashiya[2,3], Hiroshi Abe[1,2,3,4] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Material Science, Nagoya University, 3. CREST, Japan Science and Technology Agency, 4. Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya University)

[P171] Development of uracil specific ultrafast photo-cross-linking reactions for RNA FISH in cell

*Eita Satonaka[1], Yasuyuki Narita[1], Jun-ichi Mihara[1], Siddhant Sethi[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P172] In situ detection of point mutation in tumor cell block specimens by monitoring single-molecule fluorescence blinking

*Shuya FAN[1], Jie XU[1], Yasuko OSAKADA[1,2], Katsunori HASHIMOTO[3], Kazuya TAKAYAMA[4], Atsushi NATSUME[4,5,6], Masaki HIRANO[4,7], Atsushi MARUYAMA[8], Mamoru FUJITSUKA[1], Kumi KAWAI[9], Kiyohiko KAWAI[1] (1. SANKEN, Osaka University, 2. IACS, Osaka University, 3. Dept. of Med. Sci., Shubun University, 4. Craif. Inc., 5. Institute of Innovation for Future Society, Nagoya University, 6. Dept. of Neurosurgery, Kawamura Medical Associate Hospital, 7. Div. of Molecular Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute, 8. Dept. of Life Sci. and Technol, Tokyo Institute of Technology, 9. Dept. of Health and Nutrition, Shubun University)

[P173] Novel mothod of DNA ligation and library construction using chemically modified primers

*Kohei Nomura[1], Kaoru Onda[1], Daisuke Suzuki[1], Hirotaka Murase[1], Masahito Inagaki[1], Haruka Hiraoka[1], Naoko Abe[1], Fumitaka Hashiya[2,3], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,2,3,4] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Material Science, Nagoya University, 3. CREST, Japan Science and Technology Agency, 4. Institute for Glyco-core Research (iGCORE))

[P174] Development of Novel Phosphate Prodrugs with Fluorophosphoramidate Group

*Yuki Yoshida[1], Ti Zheng[1], Wataru Tanabe[1], Fumiaki Tomoike[2,3], Fumitaka Hashiya[2], Shuto Hirota[4,5], Yuriko Saiki[4,5,6], Akira Horii[4], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,7,8] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Materials Science, Nagoya University, 3. Department of Life Science, Gakushuin University, 4. Tohoku University School of Medicine, Department of Molecular Pathology, 5. Tohoku University School of Medicine, Department of Investigative Pathology, 6. Tohoku University School of Medicine, Office of Medical Education, 7. JST CREST, 8. Institute for Glyco-core Research)

[P175] The system to release a small drug responding to miRNA

*Yasuhiro Tomida[1], Akimitsu Okamoto[1], Kunihiko Morihiro[1] (1. Faculty of Engineering, University of Tokyo)

[P176] Site-specific C->U deamination using photo-cross-linkable probe for RNA editing applications

*Siddhant Sethi[1], Eita Satonaka[1], Kei Sakuma[1], Shu Kawazoe[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P177] Ultrafast photo-cross-linkabe oligodeoxynucleotides probes for quantitative detection of RNA detection

*Yuki Hirano[1] (1. Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P178] Regulation of ligation and amplification of oligonucleotides using 3' exonuclease III

*Koki Maruyama[1], Aoma Yoshida[1], Saaya Akazawa[1], Yu Miyazaki[1], Akihiro Ohkubo[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[P179] A Modified Photo-induced Memory System Using Ultrafast Photo-cross-linker

*ZUMILA HAILILI[1], SETHI SIDDHANT[1], SHIGETAKA NAKAMURA[1], KENZO FUJIMOTO[1] (1. Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P180] Simultaneous fluorescence detection of multiple microRNAs

*Yunsong Xu[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

[P181] Synthesis and evaluation of tetraphosphate nucleoside analogs for polymerase substrate

*Mayu Nakamura[1], Masahito Inagaki[1], Fumitaka Hashiya[2,3], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,2,3,4] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Material Science, Nagoya University, 3. CREST, Japan Science and Technology Agency, 4. Institute for Glyco-core Research, Tokai National Higher Education and Research System)

[P182] Protein Modification with solvatochromic fluorophore using reactive oligodeoxynucleotides-Effects of substituents on modification and properties of fluorophores-

*Mariko Aso[1], Yixuan Liu[1], Takuma Dozono[1], Kaori Tabata[1], Yukiko Abe[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyusyu University)

[P183] A study on energy transfer between a fluorophore and a metal complex by using DNA.

*Azuma Hidenori[1], Hiroyuki Asanuma[1], Hiromu Kashida[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P184] Mechanistic aspects for the modulation of scaffolded enzyme activity on DNA scaffold

*Peng Lin[1], Eiji Nakata[1], Masahiro Kinoshita[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

[P185] Development of methods to control the interactions between C9orf72-derived repeat RNA and peptides

*Hisae Tateishi-Karimata[1], Tatsuya Ohyama[1], Saki Matsumoto[1], Shigenori Tanaka[2], Naoki Sugimoto[1,3] (1. Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER) Konan University, 2. epartment of Computational Science, Graduate School of System Informatics, Kobe University, 3. Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University)

[P186] Chemically Enhanced Stability of 2D and 3D DNA Origami Nanostructures

*KiranKumar Krishnamurthy[1], Arivazhagan Rajendran[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

[P187] Construction of the packed state of enzymes in 3D DNA scaffold

*Mei Nakabayashi[1], Peng Lin[2], Eiji Nakata[2], Takashi Morii[2] (1. Graduate School of Energy Science, Kyoto University, 2. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

[P188] Cancer-Selective Cytotoxicity through RNA Hairpin Technology

*Shunto Morita[1], Kunihiko Morihiro[1], Akimitsu Okamoto[1] (1. School of Engineering, The University of Tokyo)

[P189] Kinetic analysis of a *trans*-acting VS ribozyme affected by spermine and metal ions

*Yuki Miyazaki[1], Shigeyoshi Matsumura[1,2], Yoshiya Ikawa[1,2] (1. Graduate School of Pharma-Medical Science, University of Toyama, 2. Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama)

[P190] Functional analysis of the parental ribozyme-related RNAs obtained during experimental evolution

*Sho Noguchi[1], Kaishu Terada[2], Motochika Ehara[2], Yoshiya Ikawa[1,2], Shigeyoshi Matsumura[1,2] (1. Graduate School of Pharma-Medical Sciences, University of Toyama, 2. Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama)

[P191] DNA Origami as a scaffold to assemble membrane proteins on an artifical compartment

*Shiwei Zhang[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Kyoto university)

[P192] Development of multidrug-integrated mini-nucleic acid drugs for effective chemotherapy of refractory cancer

*Ryosei Komiyama[1], Kunihiko Morihiro[1], Akimitsu Okamoto[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

[P193] Rapid HPLC electrochemical detection of labelled Leu and Ile

Uehara Akuri[1], Taiki Mori[1], Midori Nagase[1], *Kenji Yokoyama[1] (1. School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology)

[P194] Characterization of Lysozyme Aggregation by monitoring Forward Static and Dynamic Light Scattering

*Takashi Wakamatsu[1], Makoto Ogata[2], Hidenori Ue[3] (1. Ibaraki KOSEN, 2. Faculty of Food and Agricultural Sciences, Fukushima University, 3. Fukushima KOSEN)

[P195] Subcellular localization of avermectin during morphological differentiation in *Streptomyces avermitilis* using Raman microspectroscopy

*Shumpei Horii[1,2], Mahiro Ando[3], Takuji Nakashima[3], Ashok Zachariah Samuel[3], Yoko Takahashi[3], Haruko Takeyama[1,2,3,4] (1. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 2. Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory, AIST-Waseda University, 3. Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University, 4. nstitute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

[P196] Raman spectroscopic analysis of Soybean related microbes for metabolite based screening

*Shunnosuke Suwa[1], Masahiro Ando[2], Nakashima Takuji[2], Shumpei Horii[1,3], Atsuko Matsumoto[2], Toyoaki Anai[4], Haruko Takeyama[1,2,3,5] (1. Graduate school of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 2. Research organization for Nano and Life Innovation, 3. Waseda University Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory, 4. Graduate school of Agriculture, Kyushu University, 5. Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

[P197] Development of envelope-binding fluorescent probes for virus detection

*Yusaku Hatanaka[1], Yusuke Sato[1], Shion Osana[2], Ryoichi Nagatomi[2], Seiichi Nishizawa[1] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. Graduate School of biomedical engineering, Tohoku University)

[P198] Measurement of microbial degradation of biodegradable polymer by QCM and electrochemistry

*Takuma Otsuki[1], Yasumasa Takenaka[2], Tomohiro Hiraishi[2], Hideki Abe[2], Noriyuki Asakura[1] (1. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. RIKEN CSRS)

[P199] 9-Cyano-10-tellurium-pyronin derivative as red light activatable Raman probe

*Minoru Kawatani[1], Spencer JOHN Spratt[2], Hiroyoshi Fujioka[3], Yasuteru Urano[3,4], Yasuyuki Ozeki[2], Mako Kamiya[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institution of Technology, 2. Graduate School of Engineering, University of Tokyo, 3. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 4. Graduate School of Medicine, University of Tokyo)

[P200] Encapsulation and Release of Lipid Vesicles into and from Pores of Anodized Aluminum Oxide toward Development of Exosome Analysis

*Masahiro Okada[1], Yusuke Sato[1,2], Tetsuji Itoh[3], Seiichi Nishizawa[1] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. JST PRESTO, 3. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[P201] Development of activity-based fluorescent probes for tissue-clearing-based imaging

*Bo Yi[1], Daichi Sakamoto[1], Iori Tamura[1], Yutaro Saito[1], Naoki Yamada[1], Shimpei Kubota[2], Kazuki Tainaka[3], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, 3. Brain Research Institute, Niigata University)

[P202] Construction and evaluation of Quenchbody made with a pro-parallel coiled-coil peptide pair

*Takanobu Yasuda[1], Kana Sasamoto[2], Tetsuya Kitaguchi[1], Hiroshi Ueda[1] (1. Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 2. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

Oral Session

Sat. Sep 10, 2022 9:20 AM - 10:40 AM JST | Sat. Sep 10, 2022 12:20 AM - 1:40 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Peptides

Chair: Takayuki Miki (Tokyo Institute of Technology)

9:20 AM - 9:40 AM JST | 12:20 AM - 12:40 AM UTC

[1A-01] In silico screening of a bile acid micelle disruption peptide from edible peptide database

Kento Imai[1], Yuri Takeuchi[1], Hirokazu Akiyama[1], Kazunori Shimizu[1], *Hiroyuki Honda[1] (1. Faculty of Engineering, Nagoya University)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[1A-02] Rational design of protein ligands using peptoids with rigid backbones.

Marin Yokomine[1], Jumpei Morimoto[1], Yasuhiro Fukuda[1], Yota Shiratori[1], Daisuke Kuroda[1], Takumi Ueda[2], Koh Takeuchi[2], Kouhei Tsumoto[1,3], *SANDO SHINSUKE[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Graduate School of Pharmaceutical Science, The University of Tokyo, 3. Institue of Medical Science, The University of Tokyo)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[1A-03] In vitro synthesis of prenylated macrocyclic peptides using a novel His-*C*-geranyltransferase

Yuchen Zhang[1], Keisuke Hamada[2], Dinh Thanh Nguyen[1], Sumika Inoue[1], Masayuki Satake[1], Masahiro Okada[3], Toru Sengoku[2], *Yuki Goto[1], Hiroaki Suga[1] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo, 2. Yokohama City University, 3. Kanagawa University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[1A-04] Luminescence Detection of Peptide:*N*-Glycanase Activity Using Split Intein

*Tsuyoshi Takahashi[1], Tatsuya Uchibayashi[1], Nozomi Ishii[1], Ichiro Matsuo[1], Yukiko Yoshida[2], Tadashi Suzuki[3] (1. Graduate School of Science and Technology, 2. Tokyo Metropolitan Institute of Medial Science, 3. RIKEN)

可食性蛋白質由来生理活性ペプチドのインシリコスクリーニング

今井健人・竹内友里・秋山裕和・清水一憲・○本多裕之（名古屋大院工）

In silico screening of a bile acid micelle disruption peptide from edible peptide database (Graduate School of Engineering, Nagoya University) IMAI, Kento; TAKEUCHI, Yuri; AKIYAMA, Hirokazu; SHIMIZU, Kazunori; HONDA, Hiroyuki

食品や化粧品分野で、身体機能向上や恒常性維持に影響を与える生理活性ペプチドが注目されている。我々は、ペプチドの物理化学的性質と生理活性との間の関係に着目しており、ペプチドアレイ固相合成法で作製したランダムペプチドライブラリーを用いてペプチド配列と生理活性の相関を調べている。また、近年、食品タンパク質加水分解物の中から特定の物理化学的性質をもつ生理活性ペプチドを容易に分離可能な焼成多孔性シリカゲルを開発した。この担体を活用して、塩基性疎水性を示す苦味ペプチドの選択的除去[1]や、塩基性疎水性を示す抗菌ペプチドの選択的分離に成功してきた[2]。またこの担体に対して様々な物理化学的性質を持つペプチドを評価したところ、強酸性条件下で吸着し中性条件下で放出されるペプチドがあり、これは、胃で酵素消化に抵抗性を示し、分解されることなく腸送達が可能になることを見出した[3]。

コレステロールは消化管で胆汁酸ミセルに埋包され腸管から吸収される。胆汁酸結合ペプチドはこのミセルを崩壊させ、吸収を阻害するという機能を持ち、脂質代謝異常症改善効果が期待されている[4]。上記の開発担体を用い、従来の生理活性ペプチドを残基置換した類縁体を評価したところ、活性を保ったまま腸送達可能なペプチドが設計できることも明らかにした[5]。しかし探索したペプチドはいずれも可食性タンパク質中には存在しなかった。

そこで本研究では、まず 700 種以上の可食性タンパク質のデータベースから、可食性タンパク質由来のペプチドデータベースを構築した。生理活性ペプチドを探索するためにランダムライブラリーのデータから構築した機械学習モデルを構築し、DB を探索することで、in silico で、①天然タンパク質由来で②腸送達可能、かつ③酵素で切り出し可能な④胆汁酸結合ペプチドの探索を行った(Fig.1)。この性質を示すペプチドがギンナンに含まれていることを発見したので報告する。

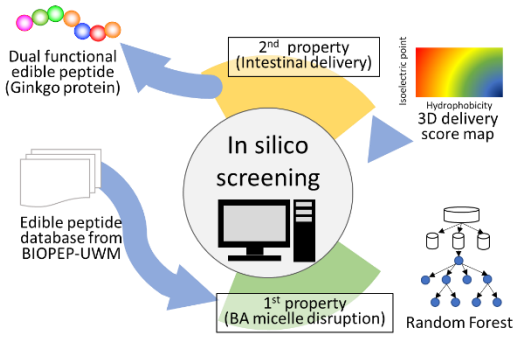


Fig.1　Concept of in silico screening

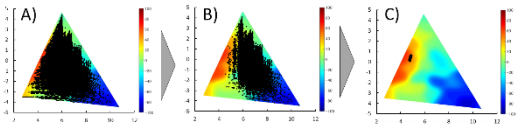


Fig.2　Screening from 6-mer DB

まず、約 35 万種類を収載した可食性ペプチドデータベース（Edible protein database; EPDB）を作成した。次にランダムペプチドライブラリーで生理活性ペプチドの特性を調べた。等電点、極性、疎水度、二次構造の取りやすさなど 7 項目のアミノ酸の物性値を使い、N 末端からの位置での変数とペプチド全体の平均値などを算出した 84 項目の説明変数を定義し、Random Forest (RF)モデルを構築した。このモデルを用いて、EPDB を評価した結果、活性ありと推定される 3 万 3 千種類のペプチドに絞れ（Fig.2B）、さらにその中から腸送達活性の高いペプチド 5 種類を見出した(Fig.2C)。これらのペプチドはいずれも胆汁酸ミセル崩壊活性を保持していた。5 種類のペプチドのうち、VEEFYCS というペプチドはギンナン由来 11S グロブリンタンパク質に存在し、Thermolysin を作用させることで取得できることがわかった。実際に、ギンナン種子からタンパク質をアルカリ抽出し、Thermolysin を作用させて得た加水分解物を LC-MS/MS 分析したところ、VEEFYCS と同じ m/z 値にピークが検出でき、ミセル崩壊活性、腸送達量とも十分高かった。提案法で生理活性ペプチドが取得できることを実証した。

1) Imai *et al.*, *Food Sci. Technol. Res.*, 25, 179-186 (2019) 2) Hagawa *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 133, 161-167 (2022) 3) Imai *et al.*, *Sci. Rep.*, 8, 10971 (2018) 4) Ito *et al.*, J. Biosci. Bioeng.,130, 514-519 (2020) 5) Imai *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, 128, 44-49 (2019)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

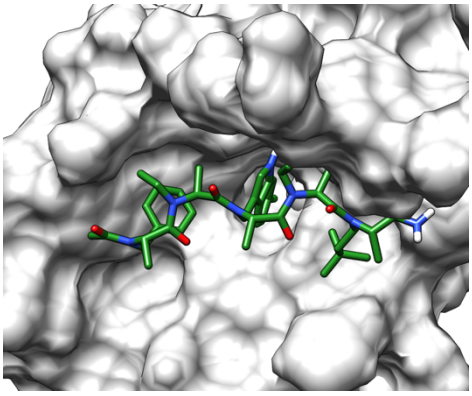
主鎖剛直ペプトイドを用いたタンパク質リガンドの合理的デザイン

横峰 真琳[1]・森本 淳平[1]・福田 泰啓[1]・白鳥 陽太[1]・黒田 大佑[1]・上田 卓見[2]・竹内 恒[2]・津本 浩平[1,3]・○山東 信介[1]（[1]東大院工、[2]東大院薬、[3]東大医科研）

Rational design of protein ligands using peptoids with rigid backbones

(Graduate School of Engineering[1], Graduate School of Pharmaceutical Science[2], Institute of Medical Science[3], The University of Tokyo)
Marin Yokomine[1]; Jumpei Morimoto[1]; Yasuhiro Fukuda[1]; Yota Shiratori[1]; Daisuke Kuroda[1]; Takumi Ueda[2]; Koh Takeuchi[2]; Kouhei Tsumoto[1,3]; and ○Shinsuke Sando[1]

受動的膜透過能を持ち、PPI（Protein-Protein Interaction）阻害を実現するペプチドリガンド分子は、次世代中分子創薬研究において注目を集めている。一方、ペプチドは、シクロスポリンのように動的な構造変化が期待できるものを除き、本質的に受動的膜透過を許容しない生体中分子である。これは、分子内に多くのドナー・アクセプター分子を持ち、水和構造を形成することが要因の 1 つであると考えられる。この膜透過性の問題を克服する分子として、オリゴグリシンを主鎖骨格とし、N 上に置換基を有するオリゴ N 置換グリシンが「ペプトイド」として提唱されている。一方、このペプトイドは高い膜透過性が示唆されていたものの、構造柔軟性のため、標的タンパク質に対して強く結合するリガンドが取得できないという問題点があった。我々はこれらの背景をもとに、剛直な主鎖構造をもつペプトイドとしてオリゴ N 置換アラニン（Oligo-NSA）に着目し、このペプトイドが水中でも剛直な構造を持つこと、MDM2 に対するリガンドを設計できることを示した[1]。さらに、MDM2 に対する Oligo-NSA 型リガンドが細胞膜を透過し、細胞内の MDM2–p53 PPI を阻害する機能をもつことを示している[2]。



一方、現在までに報告した Oligo-NSA 型リガンドは、N 上に置換基を有するもののみである。剛直な主鎖構造は残基単位で規定されるが、その最小構造は N-メチルアラニンであると考えると、N 上のみでなく Cα上にも様々な置換基を導入し、サブナノメーターの空間的精密さで置換基を提示することが可能となる。そこで、N-メチルアラニンを足場骨格として N, Cαにホットスポット側鎖を導入したペプトイドライブラリを構築し、RMSD を指標としたバーチャルスクリーニングから、MDM2 に結合するペプトイドを合理的に選択することを試みた。その結果、標的タンパク質に結合するペプトイドリガンドの探索に成功した[3]。本発表では、主鎖の剛直性を活用したペプトイドリガンドの合理的設計について報告するとともに、その結合様式のデータに関しても同時に発表し、議論したい。

1) Jumpei Morimoto *et al*. *J. Am. Chem. Soc*. **2019**, *141*, 14612–14623.
2) Yasuhiro Fukuda *et al*. *Chem. Sci*. **2021**, *12*, 13292–13300.
3) Marin Yokomine *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2022**, *61*, e202200119.

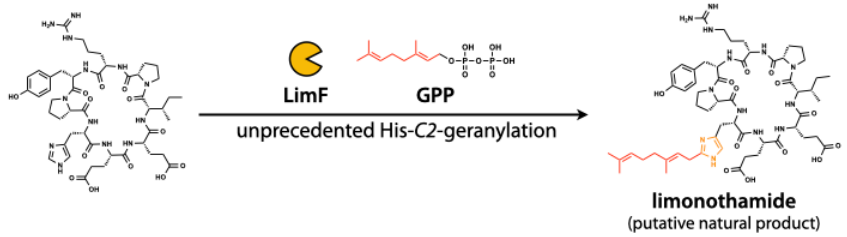
新規 His-*C*-ゲラニル化酵素による人工プレニル化環状ペプチド生産

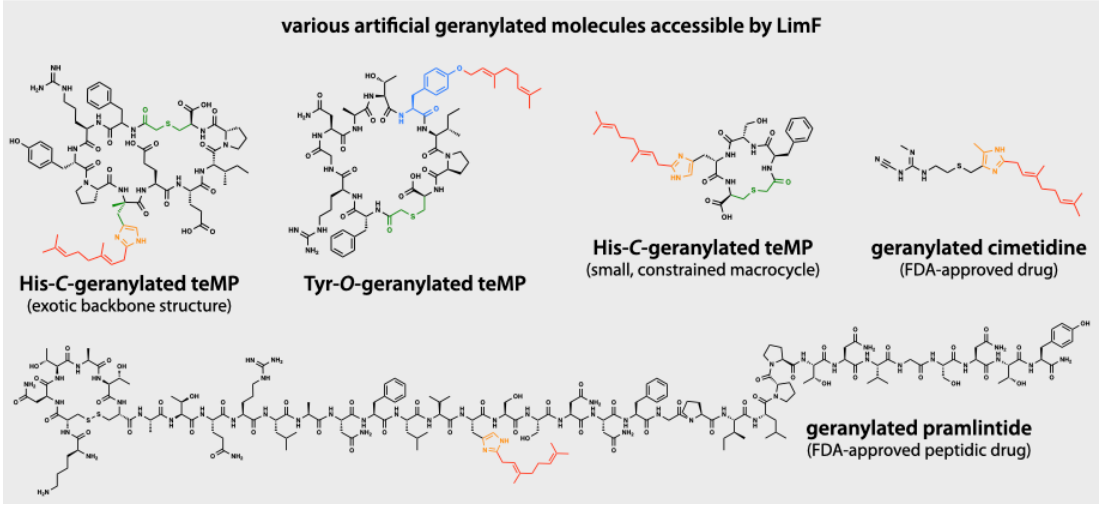
Yuchen Zhang[1]・濱田恵輔[2]・Dinh Thanh Nguyen[1]・井上澄香[1]・佐竹真幸[1]・岡田正弘[3]・仙石徹[2]・○後藤佑樹[1]・菅裕明[1]（[1]東大院理、[2]横浜市大院医、[3]神奈川大工）

In vitro synthesis of prenylated macrocyclic peptides using a novel His-*C*-geranyltransferase (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1], Graduate School of Medicine, Yokohama City University[2], Department of Material and Life Chemistry, Kanagawa University[3]) Yuchen Zhang[1]; Keisuke Hamada[2]; Dinh Thanh Nguyen[1]; Sumika Inoue[1]; Masayuki Satake[1]; Masahiro Okada[3]; Toru Sengoku[2]; Yuki Goto[1]; Hiroaki Suga[1]

ペプチド上のプレニル基は、ペプチダーゼへの分解耐性・細胞膜との相互作用・薬物動態性能への寄与などが期待されることから、部位選択的なプレニル化法は生物活性ペプチドや生化学的プローブを開発する上で重要である。実際、微生物が産生する生物活性ペプチドには、各種プレニル化構造を有するものが多い。例えば、シアノバクテリア由来の天然物であるシアノバクチン類の生合成遺伝子クラスターの多くにプレニル基転移酵素（PTase）が含まれており、最終生成物のヘプレニル基導入を担っている。これまでに、多種多様なシアノバクチン PTase が同定されてきたが、そのほとんどが電子豊富なヘテロ原子上へのプレニル化を行う酵素であり、炭素–炭素結合を介した *C*-プレニル化を行う方法論は非常に限られている。

本研究において我々は、既存のシアノバクチン PTase 配列情報を基にしたゲノムマイニングにより、His 側鎖の C2 炭素を特異的にゲラニル化する新規酵素 LimF を発見・同定することに成功した。さらに、改変翻訳系を用いた人工環状ペプチド生産システムと組み合わせることで、LimF が非常に広い基質許容性を示し、多種多様なプレニル化人工ペプチドの生産に活用できることも実証した。本講演では、LimF-GSPP-ペプチド基質の三者複合体の結晶構造解析の結果を元に、LimF の類い稀な基質許容性の分子基盤を議論すると共に、多彩な人工プレニル化ペプチドの簡便生産を可能にする生体触媒としての活用例についても紹介する。





分割インテインを用いたペプチド:*N*-グリカナーゼ活性の発光検出

○高橋剛[1]・内林達也[1]・石井希実[1]・松尾一郎[1]・吉田雪子[2]・鈴木匡[3]（[1]群大理工、[2]東京都医総研、[3]理研）

Luminescence Detection of Peptide:*N*-Glycanase Activity Using Split Intein (Graduate School of Science and Technology, Gunma University[1], Tokyo Metropolitan Institute of Medial Science[2], RIKEN[3]) TAKAHASHI, Tsuyoshi[1]; UCHIBAYASHI, Tatsuya[1]; ISHII, Nozomi[1]; MATSUO, Ichiro[1]; YOSHIDA, Yukiko[2]; SUZUKI, Tadashi[3]

N 結合型糖鎖は、タンパク質の翻訳後修飾の一つであり、タンパク質の安定性や機能の発現などに重要である。細胞質ペプチド:*N*-グリカナーゼ（PNGase、NGLY1）は、糖タンパク質から N 結合型糖鎖を切り出す脱糖鎖酵素であり、糖とアスパラギン側鎖の結合を切断する。PNGase は、小胞体関連分解において、異常糖タンパク質から糖鎖を切り出すことで、プロテアソームでの分解を補助していると考えられている。近年、*NGLY1* 遺伝子の変異に起因する希少疾患、NGLY1 欠損症が報告され、遺伝子治療などを含めた治療法の開発が求められている。

一方、当研究室ではタンパク質トランススプライシング（PTS）活性をもつ分割インテインを改変する研究を行っている。これまでに改変型 *Npu* DnaE と NanoLuc ルシフェラーゼを組み合わせることで、PTS 反応により活性型 NanoLuc ルシフェラーゼが生成する系を構築した(1)。このとき、11 アミノ酸からなる N インテイン配列中に、N 結合型糖鎖を導入することで、C インテインとの親和性が減少し、PTS 活性が低下すると期待した。PNGase により糖鎖が除去されることで、PTS 活性が回復し、PNGase 活性をルシフェラーゼ発光により検出できると考えた。本研究では、*N*,*N*'-ジアセチルキトビオース（$GlcNAc_2$）を導入した分割インテインを用いた PNGase 活性の発光検出系の開発を試みた。

Asn($GlcNAc_2$)を導入した 2 種類のペプチド（3GN2、5GN2）および Asn($GlcNAc_2$)の位置に Asp を配置したペプチド（3Asp、5Asp）を設計・合成した（図 A）。合成したペプチドと NanoLuc 断片をもつ C インテイン変異体（IntCm-NLlg）との PTS 反応について発光測定により検討した。PTS 反応 1 時間では、$GlcNAc_2$ をもつペプチドは、Asp ペプチドと比較して発光強度が顕著に減少した。特に、3GN2 は、3Asp と比較して約 40 倍低下した。次に、$GlcNAc_2$ をもつペプチドを酵母由来 PNGase（yPNGase）で処理した後、PTS 反応 1 時間で発光測定した。yPNGase の処理時間の増加により発光強度が顕著に増加した。特に 3GN2 では、酵素反応 1 時間で、不活性型 yPNGase 変異体と比較して発光強度が 30 倍に増加した（図 B）。これらの結果から、PNGase 活性を発光測定により検出できることが分かった。また、哺乳類 PNGase（NGLY1）活性の発光検出についても検討した。

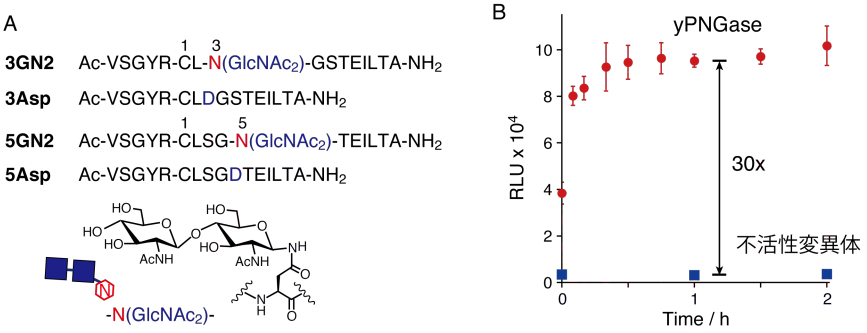


図 (A) 設計したペプチドのアミノ酸配列配列 . (B) 3GN2 を用いた yPNGase 活性の発光検出 .

1) M. Kawase, M. Fujioka, T. Takahashi, *ChemBioChem*, **22**, 577-584 (2021).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Oral Session

Sat. Sep 10, 2022 2:40 PM - 3:40 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 5:40 AM - 6:40 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Koji Miki (Kyoto University)

2:40 PM - 3:00 PM JST | 5:40 AM - 6:00 AM UTC

[1A-05] Selective Single-cell Retrieval Method using Light-Responsive Gas-Generating Polymer

*Hidetaka Ueno[1,2], Yoshinori Akagi[3], Shohei Yamamura[1] (1. Health and Medical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2. Japan Society of Promotion of Science, 3. R&D Center Corporate Advanced Technology Institute Life Science Development Center, Sekisui Chemical Co., Ltd)

3:00 PM - 3:20 PM JST | 6:00 AM - 6:20 AM UTC

[1A-06] Electrochemical Measurement of Oxygen Consumption Rate of Cell Aggregates to Investigate a Heterogeneity of Patient-Derived Cancer Cells

*Shotaro Shishido[1], Yuji Nashimoto[2], Kosuke Ino[3], Kunishige Onuma[4], Masahiro Inoue[4], Hitoshi Shiku[1,3] (1. Grad. Sch. Env., Tohoku Univ., 2. IBB., TMD Univ., 3. Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., 4. Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.)

3:20 PM - 3:40 PM JST | 6:20 AM - 6:40 AM UTC

[1A-07] Genetically encoded fluorescent biosensors for L-lactate

*Yusuke NASU[1], Giang LE[1], Saaya HARIO[1], Yuki KAMIJO[1], Robert CAMPBELL[1] (1. School of Science, The University of Tokyo)

光応答性ガス発生ポリマーを用いた 1 細胞選択的回収技術

○上野秀貴[1,2]・赤木良則[3]・山村昌平[1]（[1]産総研 健康医工学、[2]学振特別研究員、[3]積水化学工業）

Selective Single-cell Retrieval Method using Light-Responsive Gas-Generating Polymer (Health and Medical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)[1], Japan Society of Promotion of Science[2], R&D Center Corporate Advanced Technology Institute Life Science Development Center, Sekisui Chemical Co., Ltd [3]) UENO, Hidetaka[1,2]; AKAGI, Yoshinori[3], YAMAMURA Shohei[1]

細胞集団内から 1 細胞を選択的に回収する技術は、血中循環がん細胞などの希少な細胞の解析といった医療診断技術や薬剤探索技術の向上に不可欠である。従来の 1 細胞の回収技術では、マイクロマニピュレーターや光応答性の細胞接着材料等を用いた方法が提案されているが、操作の煩雑さや回収効率の低さが課題となっている[1]。本研究では、特定の波長の光に反応して窒素ガスを発生する光応答性ガス発生ポリマー（LGP）を用いた 1 細胞回収技術を提案し、その回収効率を評価した[2,3]。

LGP は一般的な核染色等の蛍光観察に用いられる波長 365 nm の光を受光した際に、その体積の 10 倍以上の窒素ガスを瞬時に発生するアジド化合物である。予め凹形状を有するポリスチレン基板を、LGP を塗布したガラス基板上に押し付け、ポリスチレン基板の形状を転写することで複数の凸型の LGP 構造を有する LGP アレイ基板を作製した。一般的な倒立蛍光顕微鏡と作製した LGP アレイ基板を用いて、1 細胞の分離、検出、回収を行った。まず、LGP アレイ基板上に GFP 発現したヒト子宮頸がん細胞(HeLa)を播種し、波長 488 nm の励起光を用いた蛍光観察により、標的となる HeLa 細胞が接着した LGP 構造を特定した（Fig. 1A）。倒立蛍光顕微鏡のフィルタを切り替え、特定した LGP 構造に対して波長 365 nm の励起光を照射すると LGP 構造から窒素ガスが発生し、接着していた HeLa 細胞がリリースされた（Fig. 1B）。特定した HeLa 細胞のみがリリースされたことを蛍光顕微鏡のフィルタを元に戻して確認した（Fig. 1C）。1 細胞回収前後の LGP 構造の蛍光画像を Fig. 2 に示す。本手法で、合計 28 個の単一 HeLa 細胞をリリースし、ピペット等を用いて回収率 100%で回収できた。回収された HeLa 細胞を 96 well plate 内のチャンバ内で培養したところ、約 90%の HeLa 細胞が増殖した。よって、提案手法は接着細胞を簡易かつ確実にリリースでき、かつ細胞に対して低負荷な細胞回収手法と考えられる。

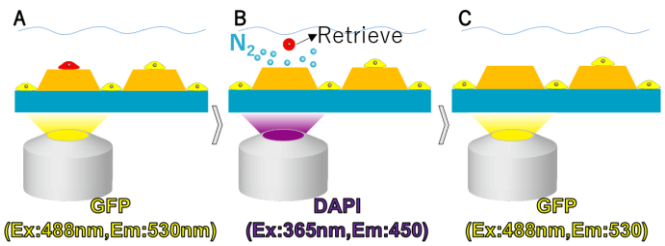


Fig 1. Schematic images of proposed single-cell retrieval method.

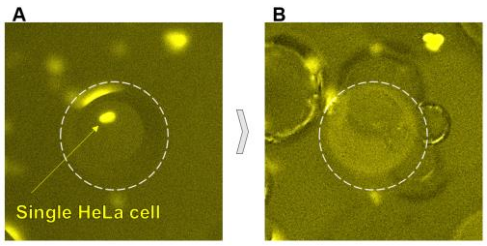


Fig 2. Fluorescence images of single HeLa cells released from the LGP microarray structure.

1) S. Yamamura, E. Yamada, F. Kimura, K. Miyajima, H. Shigeto, *Sensors*, **17**, 2410 (2017)
2) H. Ueno, Y. Akagi and S. Yamamura, *Lab Chip*, **22**, 1498-1507 (2022)
3) H. Ueno, Y. Akagi and S. Yamamura, *micromachines*, **13**, 2 (2022)

患者由来がん細胞凝集塊の電気化学測定による酸素消費量不均一性の調査

○宍戸昌太郎[1]・梨本裕司[2]・伊野浩介[3]・小沼邦重[4]・井上正宏[4]・珠玖仁[1,3]（[1]東北大院環境、[2]東京医科歯科大生材研、[3]東北大院工、[4]京都大院医）

Electrochemical Measurement of Oxygen Consumption Rate of Cell Aggregates to Investigate a Heterogeneity of Patient-Derived Cancer Cells (Grad. Sch. Env., Tohoku Univ[1], IBB., TMD Univ[2], Grad. Sch. Eng, Tohoku Univ[3], Grad. Sch. Med., Kyoto Univ.[4]) Shishido, Shotaro[1]; Nashimoto, Yuji[2]; Ino, Kosuke[3]; Onuma Kunishige[4]; Inoue, Masahiro[4]; Shiku, Hitoshi[1,3]

1.目的

がんは不均一な細胞集団で形成されており、患者間あるいは同一患者由来のがん細胞においても細胞間で代謝や薬剤感受性等の違いが存在する。したがって、この不均一性の理解は、がんの性質の解明、ひいてはがん治療において重要となる。我々がこれまで行ってきた走査型電気化学顕微鏡（SECM）による測定では、非侵襲かつリアルタイムな細胞の代謝測定ができ[1]、シングルポイントでの測定により細胞塊の個別評価も可能である。本研究では、患者由来大腸がん細胞塊の酸素消費量（OCR）を SECM で継時的に測定し、酸素消費量の変化やその不均一性に関して考察した。また、大腸がん由来細胞株についても酸素消費量を測定し、患者由来大腸がん細胞塊との比較を行った。

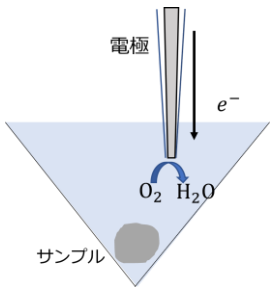


Fig. 1 測定模式図

2.実験

本研究では「Cancer tissue-originated spheroid (CTOS)」法[2]で樹立された大腸がん由来の KUC16 オルガノイドを測定対象とした。CTOS 法は、細胞-細胞間接着を維持したまま、腫瘍組織からがん細胞を調製・培養する手法である。細胞分散酵素を用いた処理による継代後、4 日後に半径 75~90 μm のオルガノイドを分取し、SECM での OCR 測定を行った。オルガノイドを測定用培地で満たした逆円錐ウェルプレートに導入し、オルガノイド近傍に Pt ディスク電極（φ < 10 μm）をセットした（Fig. 1）。− 0.5 V vs. Ag/AgCl の電位を印加し、酸素還元電流をモニタリングしながら、Pt ディスク電極を三回上下動させた。オルガノイド近傍とバルクにかけての電流値の勾配から球面拡散理論[1]に従って酸素濃度勾配を計算し、OCR を求めた。比較対象である大腸がん由来細胞株（HCT116、HT29）は Hanging Drop 法で KUC16 オルガノイドと類似の形状・サイズを有する凝集塊を作製し、同様の方法で SECM による OCR 計測を行った。

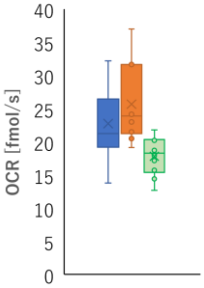


Fig. 2 OCR の比較（KUC16 （青）: n=9、HCT116（橙）, HT29（緑）: n=10）

3.結果および考察

半径 75～90 μm の各種がん細胞凝集塊の OCR を評価したところ、KUC16 オルガノイド及び HCT116 は、HT29 に比べ OCR のばらつきが大きくなった（Fig. 2）。HT29 は比較的均一な性質を有する株である一方で、HCT116 はより不均一な株であることを踏まえると、本測定で KUC16 オルガノイドに見られたばらつきはがん細胞の有する不均一性を反映していることが示唆された。患者由来がん細胞の OCR の不均一性評価を通し、将来的にはがんの代謝と活動状態の多様性との関連を解明したい。

4.参考文献

(1) H. Shiku et al., *Anal. Chim. Acta*, 2004, Vol. 522, 51-58.
(2) J. Kondo et al., *PNAS*, 2011, Vol. 108, 6235-6240.

乳酸バイオセンサーの開発

○那須雄介・Giang Le・針尾紗彩・上條由貴・Robert Campbell（東大院理）

Genetically encoded fluorescent biosensors for L-lactate (School of Science, The University of Tokyo) NASU, Yusuke; LE, Giang; HARIO, Saaya; KAMIJO, Yuki; CAMPBELL, Robert

我々ヒトを含む多細胞生物は，食物など外部から得られたエネルギーを細胞間で伝達することで各細胞（筋細胞，神経細胞 etc.）の活動に必要なエネルギーを供給し，細胞の集合体である個体としての活動を維持している．これまで長い間，細胞間で伝達されるエネルギー物質はグルコースだとされてきた．しかし近年，グルコースの単なる代謝副産物とされていた「乳酸」が真のエネルギー伝達物質である，という考えが相次いで提唱された．乳酸による細胞間エネルギー伝達を実証するためには細胞内外の乳酸動態を直接観察することが必要である．申請者はこれまでの蛍光センサー開発で培ったタンパク質工学技術を駆使して緑色蛍光細胞外乳酸センサーeLACCO1.1 を開発した [1) 2)]．ここでは，eLACCO1.1 をさらに発展させ，細胞間でやりとりされる乳酸の新たな役割の検証を可能とする蛍光乳酸バイオセンサー（LACCO シリーズ，図）を報告する．

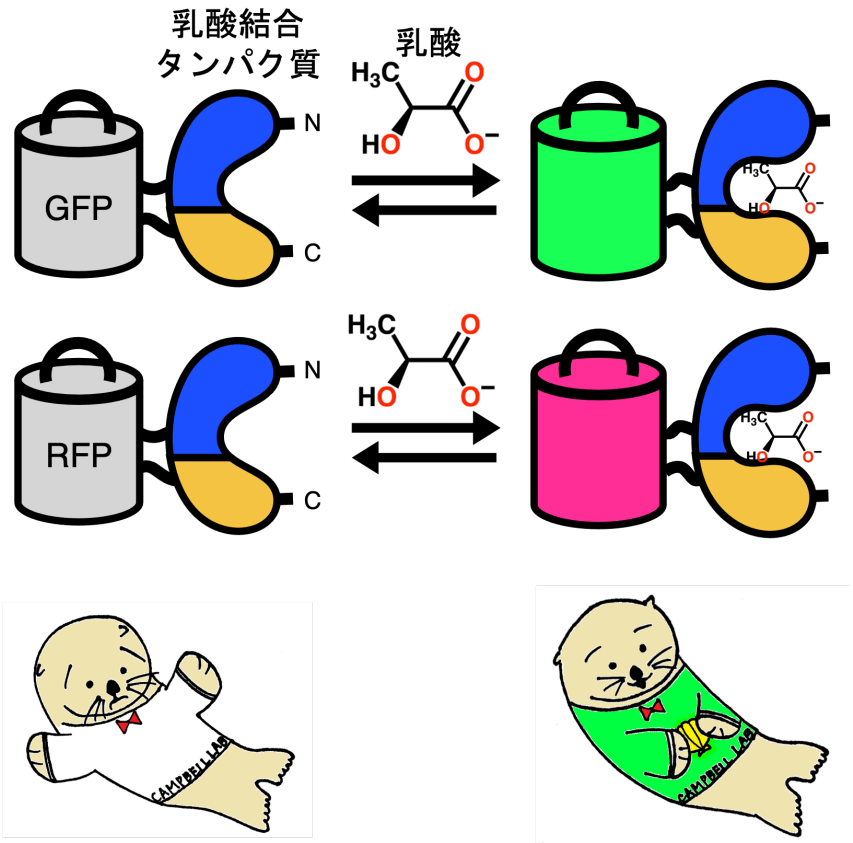


図. LACCO シリーズ
乳酸濃度依存的に蛍光強度が変化する乳酸バイオセンサー．
GFP: 緑色蛍光タンパク質, RFP: 赤色蛍光タンパク質．

1) **Nasu Y.**, Shen Y., Kramer L., Campbell R. E., “Structure- and mechanism-guided design of single fluorescent protein-based biosensors”, *Nature Chemical Biology*, **17**, 509−518 (2021).
2) **Nasu Y.**, et al. “A genetically encoded fluorescent biosensor for extracellular L-lactate”, *Nature Communications*, **12**, 7058 (2021).

Oral Session

Sat. Sep 10, 2022 3:50 PM - 4:50 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 6:50 AM - 7:50 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Tasuku Hirayama (Gifu Pharmaceutical University)

3:50 PM - 4:10 PM JST | 6:50 AM - 7:10 AM UTC

[1A-08] CRISPR/Cas12-Based Sensor Array for the Multiplex DNA detection

*Hiroki Shigemori[1,2], Satoshi Fujita[1], Eiichi Tamiya[1,3], Shin-ichi Wakida[1], Hidenori Nagai[1,2] (1. Advanced Photonics and Biosensing Open Innovation Laboratory, AIST-Osaka Unverisity, 2. Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University, 3. The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

4:10 PM - 4:30 PM JST | 7:10 AM - 7:30 AM UTC

[1A-09] Specific detection of odorant on GFET by screening the skatole binding peptide

*Kakeru Saruwatari[1], Tharatorn Rungreungthanapol[1], Chisyu Homma[1], Masayoshi Tanaka[1], Hideyuki Tomizawa[2], Yoshiaki Sugizaki[2], Atunobu Isobayashi[2], Yuhei Hayamizu[1], Mina Okochi[1] (1. Tokyo Institute of Technology, 2. TOSHIBA CORPORATION)

4:30 PM - 4:50 PM JST | 7:30 AM - 7:50 AM UTC

[1A-10] Comprehensively analyzing the regulators of the release processes of extracellular vesicles with RNA barcodes

*Ryosuke Kojima[1], Koki Kunitake[2], Tadahaya Mizuno[2], Yasuteru Urano[1,2] (1. Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo)

多項目 DNA 検出を指向した CRISPR/Cas12 センサアレイの開発

○繁森弘基[1,2]・藤田聡史[1]・民谷栄一[1,3]・脇田慎一[1]・永井秀典[1,2]（[1]産総研・先端フォトバイオ、[2]神戸大院人間発達環境、[3]阪大産研）

CRISPR/Cas12-based Sensor Array for Multiplex DNA detection (AIST PhotoBIO-OIL[1], Graduate School of Human Development and Environment, Kobe University [2], SANKEN, Osaka University[3]) Hiroki Shigemori[1,2], Satoshi Fujita[1], Eiichi Tamiya[1,3], Shin-ichi Wakida[1], Hidenori Nagai[1,2]

【Introduction】 Rapid and multiplex detection of nucleic acid in pathogenic bacteria and viruses that are highly infectious is crucial to achieving effective quality health care. Moreover, high specific target sequence recognition for genetic mutations which often cause drug resistance is equally important for administering proper treatment.

In recent years, the diagnostic technology based on Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein 12 (CRISPR/Cas12) system is regarded as an attractive tool to meet the above requirements. According to CRISPR/Cas12-based diagnostics, the target double-strand DNA (dsDNA) sequence is recognized by Cas12-guide RNA (gRNA) complex and transduced as signal (fluorescence etc.) by target-induced single-strand deoxyribonuclease activation of Cas12[1]. While CRISPR/Cas12 systems are able to rapidly (<15 min) recognize the target sequence with single-base difference[1], the indiscriminate single-strand DNA (ssDNA) cleavage activity of Cas12 makes it difficult for multiplex detection in a single reaction [2].

【Concept】 To achieve the one-pot multiplex dsDNA detection by CRISPR/Cas12a system, we developed a DNA sensor array by integrating the sensing spots immobilized with both Cas12-gRNA and fluorescent-labeled ssDNA reporter.

The detection mechanism is shown in Fig. 1. When the target dsDNA is applied on the sensor array, it is captured by the Cas12 spot with complementary gRNA sequence. At the spot, ssDNA reporter is cleaved by the activated Cas12 and the target dsDNA is identified as the spot with decreased in fluorescence intensity.

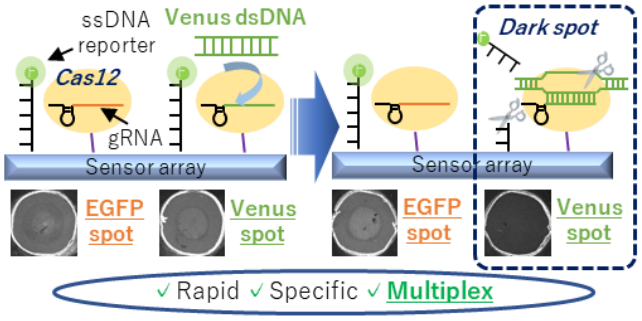


Fig. 1 CRISPR/Cas12-Based Sensor Array

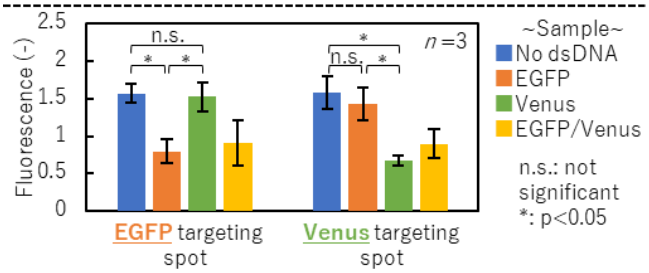


Fig. 2 Fluorescence intensity of each spot

【Result】 In this report, we fabricated the two-plex CRISPR/Cas12 sensor array on the bottom of a 96-well to identify the two-base mismatch between pEGFP-N1 (EGFP) dsDNA and pVenus-N1 (Venus) dsDNA. Fig. 2 shows the fluorescence intensity of the EGFP and the Venus targeting spots after the dsDNA samples were incubated in the well and washed away. When 100 nM target dsDNA was included in the sample, the fluorescence signal significantly decreased (41.9~57.7%) than that of no dsDNA condition. On the other hand, the fluorescence signal between no dsDNA and the two-base difference condition showed no significant differences. This confirms that the CRISPR/Cas12-based sensor array was able to identify the target dsDNA with high specificity.

【Ref.】 [1] S.-Y. Li et al., Cell Discov. 2018, 4, 20. [2] Y. Li et al, Trends in Biotechnol. 2019, 37, 792‐795.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

スカトール結合性ペプチドの探索による匂い分子の特異的 GFET 検出

○猿渡 翔[1]、ルンルヤンタナポン タラトン[1]、本間 千柊[1]、田中 祐圭[1]、富澤 英之[2]、
杉崎 吉昭[2]、磯林 厚伸[2]、早水 裕平[1]、大河内 美奈[1]
(1. 東京工業大学物質理工学院、2. 株式会社東芝)

1. 目的

国際旅客数や物流の増加に伴い、植物及び食品防疫の観点から空港などでの検疫の重要性が増している。特に、生肉等に含まれる揮発性有機化合物は多く存在し、これを高感度に検出するセンサの開発に資する標的認識プローブが求められている。本研究では、生肉に含まれる匂い分子としてスカトールに着目し、ファージディスプレイ法によりスカトール結合性ペプチドを選抜し、これをプローブとして修飾したグラフェン電解効果トランジスタ（GFET）センサを用いて、高感度なスカトール検出技術の開発を目的とした。

2. 実験

ファージディスプレイ法には、標的分子としてスカトールと類似構造をもつトリプトファンに着目し、これを基板上に修飾することで、スカトール結合配列の探索を行った。この基板に鎖状 7 残基ペプチドのファージライブラリー液を滴下し、洗浄後、溶出した。これを 2 回繰り返すことで、高結合性を示すファージを選抜し、その可変領域の DNA 配列を解析することで、候補ペプチドを選抜した。

候補ペプチドをセルロースメンブレン上にスポット合成後、異なる濃度のスカトール（1 nM～10 μM）を結合させた。これを溶出し、GC-MS による分析を行うことで、結合量と解離定数 K_D を算出した。

標的匂い分子結合性ペプチドとグラフェン結合性ペプチド[1]を連結させた二機能性ペプチドを GFET に通水させ、自己組織的にペプチド修飾した後、スカトール濃度（1 pM～1 nM）に対する電流値変化を測定した。また選抜ペプチドのプローブとしての選択性を評価するために、スカトールと類似構造をもつ化合物や果物の匂い成分においても同様に測定した。

3. 結果および考察

ファージディスプレイにより計 21 種の候補ペプチドが選抜され、そのうちの 12 配列において類似アミノ酸 3 残基からなる配列が含まれていた。これら 21 配列のペプチドアレイを作製し、GC-MS を用いた結合能評価の結果から、高結合性を示すペプチド 4 種類が選抜された。また、この 4 種の配列は過剰量の夾雑物存在下でもスカトール結合能の低下はみられなかったことから、プローブとしてスカトール選択性があることが示唆された。

選抜ペプチドを GFET に修飾し、スカトール溶液に対するセンサ応答を検討した結果、その解離定数が 1.39 ppt であることが示された。さらに、ナフタレン・インドール・リモネンに対するセンサ応答を検出したところ、スカトールと比較して応答が小さく、特異性がみられた。選抜されたペプチドは、スカトールに対して結合性が高く、選択性を発揮するセンサプローブとして利用できることが示された。本研究により、標的分子をオンサイトで安定的かつ迅速に検出できることから、検疫センサへの利用が期待できる。

(1) Yuhei H. *et al.*, *ACS. Appl. Mater. Interfaces,* 11, 20670-20677 (2019)

本成果は、内閣府が進める「戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）第 2 期／フィジカル空間デジタルデータ処理基盤」（研究推進法人：NEDO）における研究開発によるものです。

RNA バーコードを利用した細胞外小胞放出制御因子の網羅的解析

○小嶋良輔[1]・國武厚貴[2]・水野忠快[2]・浦野泰照[1,2]（[1]東大院医、[2]東大院薬）

Comprehensively analyzing the regulators of the release processes of extracellular vesicles with RNA barcodes (Graduate School of Medicine, the University of Tokyo[1], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, the University of Tokyo[2]) KOJIMA, Ryosuke[1]; KUNITAKE, Koki[2]; MIZUNO, Tadahaya[2]; URANO, Yasuteru[2]

エクソソームをはじめとした細胞外小胞(EV)は、表面に提示された分子や、内包されたタンパク質、RNA 等を通じて、種々の細胞間コミュニケーションを媒介する重要な役割を果たしている。また、このような基礎生物学的な知見に加えて、がん細胞から放出される EV が前転移ニッチの形成などを通じてがん細胞の悪性化に寄与しているといった報告があることから、特定の細胞からの EV の放出プロセスが創薬ターゲットになり得るといったことも考えられており、EV の放出過程を包括的かつ詳細に理解することは基礎・応用の両面の観点から極めて重要である。しかしながら、EV の放出を制御する要因は多岐にわたるため、各遺伝子の発現が EV の放出に与える影響を、siRNA などを用いて一つ一つ精査する古典的な手法は、多大な時間・費用・手間を必要とする。さらに、EV が均一な集団ではなく、ヘテロな集団であることや、細胞ごとに EV 放出を制御する因子が異なる場合もあることが示唆されていることから、上記のようなスループットの低い古典的な解析手法を用いて、EV の放出機構を包括的に理解するのは困難であった。

このような背景において、我々は、独自に開発してきた EV 内に任意の RNA を封入する合成生物学的手法[1]と CRISPR-Cas9 を用いた pooled screen system を組み合わせることで、EV の放出を制御する因子を網羅的に解析する新たな計測系を構築した。具体的には、Cas9 と様々な遺伝子をターゲットとした guide RNA (gRNA) library を用いて異なる遺伝子の発現に摂動をかけた細胞群を用意し、これに用いた gRNA を、EV マーカーに融合した dead Cas9 (dCas9)との相互作用により EV 内に積極的に封入した。EV 内に封入した gRNA は、その産生細胞中でどの遺伝子発現に摂動がかかっていたかという情報を引き出すための”バーコード”として利用でき、EV 内と細胞内のバーコード gRNA の構成比を比較することで、どのような因子が EV の放出に影響を与えているかをハイスループットに解析することが可能になった(図 1)。さらに、gRNA のローディングに使用する EV のマーカータンパク質を複数利用することで、異なる EV のサブポピュレーションの放出制御メカニズムの違いを見出すことも可能であることを見出した。

本計測技術は、未だ不明な点が多い EV の放出過程を包括的に理解するのに極めて有用であると期待される。

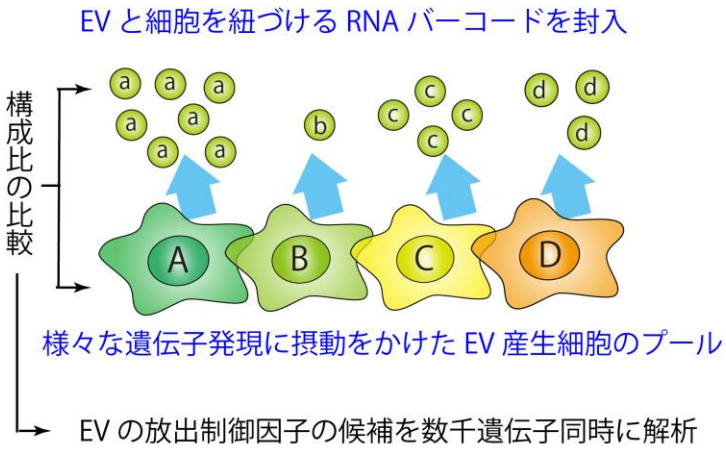


図 1: 本研究の概略

【参考文献】 1. Kojima, R. *et al*. *Nat. Commun.* **9**, 1305 (2018).

Poster Short Talk

Sat. Sep 10, 2022 5:00 PM - 6:00 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 8:00 AM - 9:00 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Poster short talks (P1-P20)

[P1] The development of a FRET detection system for elucidation of intracellular mechanisms of SNA modified anti-miRNA oligonucleotide

*Hongyu Zhu[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University.)

[P2] Syntheses of base-labile pseudo-complementary nucleobases of SNA and L-*a*TNA phosphoramidite monomers

*Fuminori Sato[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P3] Chemical modification of tripodal quinone-cyanine fluorescent dye for regulating the recognition of nucleic acids structure

*Yuka Muraoka[1], Yu Yasuhara[2], Marina Iwai[2], Takashi Sakamoto[1,2] (1. Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University, 2. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

[P4] Kinetic analysis of DNA G-quadruplexes folding with structured loop regions

*Minori Nakata[1], Naoki Kosaka[1], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University)

[P5] Evaluation of tripodal quinone-cyanine dies as photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer

*Junya Muramoto[1] (1. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

[P6] The reactivity of Topoisomerase I to G-quadruplex-containing DNA

*Koya Sakamoto[1], Ryoma Yokosawa[1], Maiko Yamanashi[1], Takanori Oyoshi[1] (1. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University)

[P7] Development of functional polypeptides regulating G4-containing promoter

*Yamato Karikome[1], Maiko Yamanashi[1], Akinori Ishihara[1], Takanori Oyoshi[1,2,3] (1. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 2. Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, 3. Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

[P8] Nucleic acid detection using DNA probes that release a ligated product between ruthenium and platinum complexes in a sequence specific manner

*Takeshi Asahina[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University)

[P9] Development of Structural Selective G-Quadruplex Ligand with Novel Ligand Screening

*Yoshiki Hashimoto[1], Takeru Torii[1], Matsuki Kinoshita[1], Keiko Kawauchi[1], Hisae Tateishi-Karimata[2], Naoki Sugimoto[1,2], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University, 2. FIBER, Konan University)

[P10] Development of long-chain elongation reaction based on kinetic analysis of chemical template-directed ligation of L-*a*TNA and SNA

*Hikari Okita[1], Keiji Murayama[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P11] Construction of Highly Diverse Monobody and Macrocyclic Peptide Libraries Based on the Effect of mRNA Sequences on Translation Efficiency and Accuracy

*Shun Umemoto[1], Taishi Kondo[1], Tomoshige Fujino[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P12] Development of fluoregenic synthtic fluorephore/protein hybrid probe for detection of methylated RNA

*Kamikawa Takuya Takuya[1,2], Yuichiro Hori[2], Keisuke Nomura[1], Akari Matsuki[1], Kazuya Kikuchi[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Graduate School of Science, Kyushu University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[P13] Regulation of liquid-liquid phase separation by small molecules targeting RNA G-quadruplex

*Nagisa Takamiya[1] (1. FIRST, Konan University)

[P14] Development of long-chain DNA assembly technology by using 3'-thio-phosphorothiolate oligodeoxynucleotides

*Mikiya Kase[1], Masahito Inagaki[1], Haruka Hiraoka[1], Humitaka Hashiya[1], Naoko Abe[1], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P15] Synthesis and Evaluation of Hoechst-Tethered Oligodeoxynucleotides that Accumulate in Cell Nucleus

*Hiroki Makanai[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University))

[P16] Elucidation of gene function based on RNA Hacking technology by super selectivity Staple oligomer

*Tomoki Tomoki Kida[1], Yousuke Katsuda[1], Takuto Kamura[1], Kotone Lavin[1], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[2], Shin-ichi Sato[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P17] Sequence specific control of liquid droplets composed of RNA G-quadruplex

*Mitsuki Tsuruta[1], Takeru Torii[1], Kazuki Kohata[1], Keiko Kawaichi[1], Hisae Tateishi-Karimata[2], Naoki Sugimoto[1,2], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University, 2. FIBER, Konan University)

[P18] Mechanism of cancer-cell-selective cytotoxicity by dicopper complexes

*Machi Hata[1], Yasuomi Urano[2], Yutaka Hitomi[1], Noriko Noguchi[2], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University, 2. Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University)

[P19] Flexible gene expression increase technology by RNA hacking

*Yua Itsuki[1], Yousuke Katsuda[1], Yusuke Kitamura[1], Hagihara Masaki[2], Sato Shin-ichi[3], Ihara Toshihiro[1] (1. Affiliation Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Advance Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P20] Dynamic control of DNA scaffolded BRET system using strand displacement reaction

*Fumiaki Takano[1], Yuki Minamide[1], Tomoya Niki[1], Shiori Tabana[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University)

SNA 型抗アンチセンス核酸の細胞内作用機構解明に向けた FRET 検出システムの開発

○朱紅宇[1]・神谷由紀子[1]・浅沼浩之[1]（[1]名大院工）

The development of a FRET detection system for elucidation of intracellular mechanisms of SNA modified anti-miRNA oligonucleotide (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1].) Hongyu Zhu[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1]

MicroRNA (miRNA) は遺伝子発現を抑制する Non-coding RNA の一種である。miRNA は miRISC (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)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]。しがしながら、開発した SNA-AMO による miRNA 阻害機構の詳細は明らかになっていない。特に、AMO は miRISC と結合して、miRNA の機能を阻害することが一般的に考えるが、これまでに、AMO は miRISC と結合している様子を、直接的に観察した例は、報告されていない。そこで、本研究では、開発した SNA-AMO の miRNA 阻害機構の解明を目指し、miRNA が発現するまでの過程で、SNA-AMO がどの段階で阻害効果を発揮しているか明らかにする。

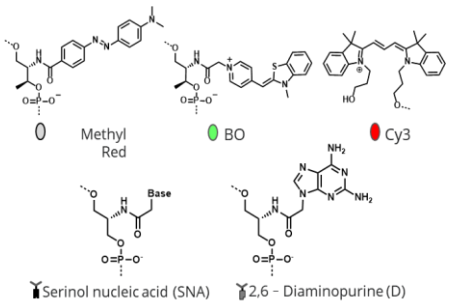


Fig1. Chemical structure of fluorophores, SNA and 2,6-

そのため、蛍光共鳴エネルギー移動 FRET 技術を用いて、細胞内における SNA-AMO と miRISC の相互作用解析することを試みた(図 1、2)。具体的には、細胞内で miRISC を選択的に可視化するため、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、活性を妨げない特定の部位に導入した。また鎖選択性を制御することで、miRNA 特異的な miRISC 形成も可能にした。そこに Cy3 を導入した SNA-AMO を作用させ、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)を検出することにより、生細胞内における miRNA と AMO の相互作用の観察に成功した。さらに、これらの蛍光シグナルと miRISC タンパク質である AGO2 を同時に可視化したところ、SNA-AMO と miRISC が細胞内共局在している様子が観察された。このことから、AMO は miRISC に作用するものと考えられた。

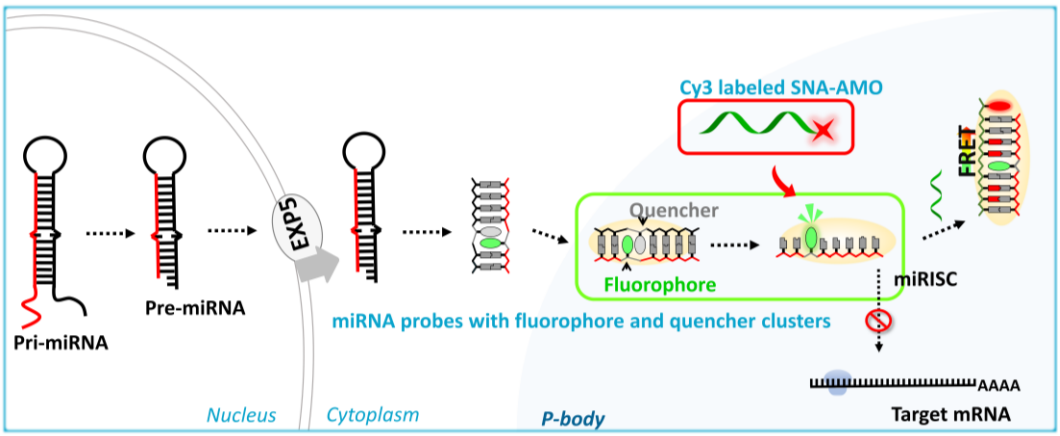


Fig2. Schematic illustration of SNA-AMO mechanism of action

[1] Kamiya, et al., *ChemBioChem*, **2017**, 18, 1917-1922.

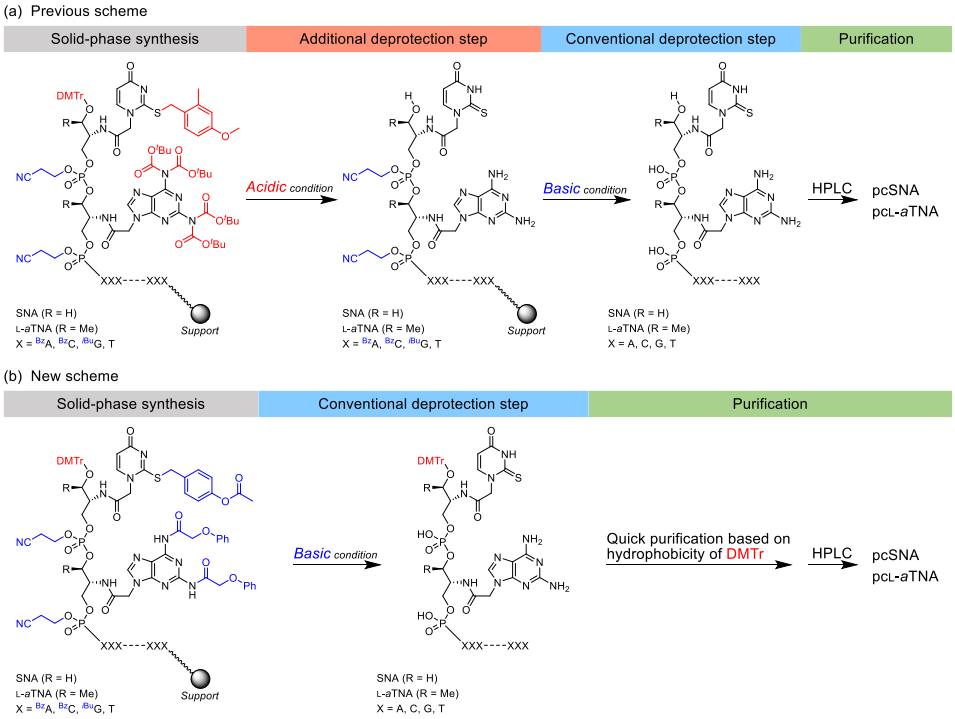
塩基性条件下で脱保護可能な Pseudo-complementary 核酸塩基の SNA/L-*a*TNA ホスホロアミダイトモノマーの合成

○佐藤史経[1]・神谷由紀子[1]・浅沼浩之[1]（[1]名大院工）

Syntheses of base-labile pseudo-complementary nucleobases of SNA and L-*a*TNA phosphoramidite monomers (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]) SATO, Fuminori[1]; KAMIYA Yukiko[1]; ASANUMA Hiroyuki[1]

Pseudo-complementary 塩基対として知られる 2,6-Diaminopurine（D）と 2-Thiouracil（sU）の導入は、オリゴヌクレオチドの自身の自己相補領域を介した二重鎖形成を抑制し、相補的な DNA または RNA との二重鎖形成を促進する。非環状型人工核酸: SNA または L-*a*TNA は相補的な DNA や RNA と配列特異的な二重鎖形成が可能であるが、自身と非常に安定な二重鎖を形成する特徴をもつ[1]。そのため、SNA や L-*a*TNA に対する D-sU の導入は、SNA や L-*a*TNA の自己相互作用を回避するための有効な手法である。これまでに私たちは、Boc 保護 D または、2-Methyl-4-methoxybenzyl (MMPM) 保護 sU を有する SNA ホスホロアミダイトモノマーの合成を報告した[2]。D, sU を含む SNA オリゴヌクレオチドの合成には、従来のホスホロアミダイト法のプロトコルにくわえて、酸による Boc および MMPM の脱保護ステップが必要であった（Scheme 1a）。また、酸による脱保護の過程で DMTr 基が除去されてしまうため、逆相カラムによる簡易精製が行えず、精製工程に手間がかかっていた。そこで、本研究では、塩基で除去可能な Pac 保護 D および 4-Acetoxybenzyl 保護 sU を使用した新たな SNA および L-*a*TNA ホスホロアミダイトモノマーを開発した。これらのモノマーにより、追加の工程を必要としない、一般的なオリゴヌクレオチド合成スキームを用い、D, sU を含む SNA(pcSNA)および L-*a*TNA(pcL-*a*TNA)を調製することに成功した（Scheme 1b）。

Scheme 1. Preparation of pcSNA or pcL-*a*TNA by using (a) our previous scheme with acid-labile D and sU phosphoramidite monomers or (b) new scheme with base-labile D and sU phosphoramidite monomers.



[1] (a) H. Kashida *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 1285-1288, (b) K. Murayama, *et al.*, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 6500-6503. [2] Y. Kamiya, F. Sato, *et al.*, *Chem. Asian J.*, **2020**, *15*, 1266-1271.

３脚型キノン-シアニン蛍光色素の核酸構造認識を制御するための化学修飾

○村岡優香[1]・安原優[2]・岩井まり奈[2]・坂本隆[1,2]（[1]和歌山大院シス工、[2]和歌山大シス工）

Chemical modification of tripodal quinone-cyanine fluorescent dye for regulating the recognition of nucleic acids structure (Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University[1], Faculty of Systems Engineering, Wakayama University[2]) MURAOKA, Yuka[1]; YASUHARA,Yu[2]; IWAI, Marina[2]; SAKAMOTO, Takashi[1,2]

４重鎖（G4）核酸の蛍光イメージング技術は、細胞内における G4 核酸の働きを理解する上で有効であり、これまでにさまざまな G4 核酸検出用の蛍光プローブが開発されてきている。最近我々は３つの *N*-メチルベンゾチアゾリウムカチオン（MeBT）を持つ３脚型キノン-シアニン色素（QCy(MeBT)$_3$）が、dsDNA および G4 DNA に対して異なる波長の蛍光で OFF/ON 応答し、生細胞内の dsDNA と G4 DNA を色分けイメージングできるユニークな蛍光プローブであることを見出した[1)]。しかし、その構造と蛍光プローブとしての機能の相関は明らかではなく、プローブの化学構造の最適化には至っていなかった。

本研究では、この QCy(MeBT)$_3$ の構造と機能の相関を明らかにし、その核酸構造認識能を制御することを目的に、ベンゾチアゾリウムカチオンの N３位に種々の官能基を導入した３脚型キノン-シアニン色素の誘導体（図１、QCy(RBT)$_3$）を設計・合成した。また、QCy(RBT)$_3$ の dsDNA と G4 DNA に対する蛍光応答を評価することで、化学修飾による核酸構造認識制御効果を検証した。

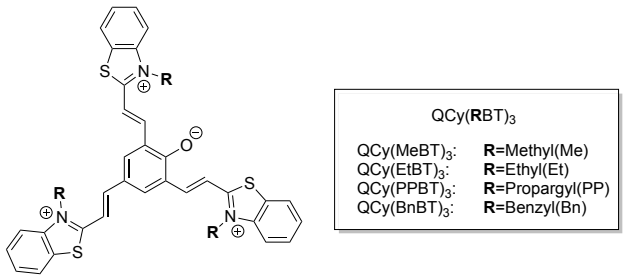


図 1. 合成した３脚型キノン-シアニン蛍光色素の構造

結果、N３位に導入した官能基のサイズの増大とともに、dsDNA に対する蛍光強度増加倍率の低下および、G4 DNA に対する蛍光強度増加倍率の増加が見られ、この位置にバルキーな官能基を導入することで dsDNA に対する結合親和性を抑制でき、G4 DNA に対する結合選択性を制御できる可能性が示された。蛍光滴定により各 DNA に対する相互作用の強さを比較した結果、導入した官能基のサイズの増大とともに、dsDNA に対する結合親和性の低下、および G4 DNA に対する結合親和性の増大がみられた。このことから、ベンゾチアゾリウムカチオンの N３位近傍の化学構造が、dsDNA との結合に大きく影響することが示唆され、この位置への官能基修飾により G4 DNA への結合の選択性を制御できることが明らかとなった。また、N３位にベンジル基を導入した QCy(BnBT)$_3$ では、G4 DNA 添加時に 790 nm 付近にピークトップを持つ蛍光が顕著に増加し、QCy(MeBT)$_3$ の蛍光応答に比べて大幅なレッドシフト（$\Delta\lambda \sim 70$ nm）が観測され、N３位への官能基導入により蛍光波長の制御が可能であることが示された。さらに QCy(BnBT)$_3$ は大幅な蛍光増強が見られたため、有望な G4 DNA 検出プローブであることが示唆された。そこで、細胞内 G4 核酸検出蛍光プローブとして機能するかを検証するために、HeLa 細胞に QCy(BnBT)$_3$ を添加し蛍光顕微鏡観察を行なった結果、生細胞内でも G4 DNA のみに対し蛍光を示したことから、生細胞内 G4 核酸検出プローブとして機能することが明らかとなった。

1) T. Sakamoto, Z. Yu, Y. Otani, *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(10), 4269–4276.

グアニン四重らせん構造のループ領域に着目したフォールディング機構の解明

○中田実紀・小坂直暉・三好大輔（甲南大 FIRST）

Kinetic analysis of DNA G-quadruplexes folding with structured loop regions (Graduate school of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University) NAKATA, Minori; KOSAKA, Naoki; MIYOSHI, Daisuke

グアニンに富む核酸鎖は、グアニン四重らせん構造(G4)を形成する。G4 は 4 つのグアニンが Hoogsteen 塩基対によって結合したもの(G-quartet)が積層することで形成される。G4 形成には中心部分にカチオンの配位が必須であり、K^+や Na^+存在下で高い熱安定性を示す。G4 が同定されて以降、主にヒトテロメアで形成される G4 配列を用いて、立体構造やその熱安定性、さらには低分子化合物との相互作用に関する研究が行われてきた。これらの研究により、G4 は塩基配列、共存するカチオン種類、小分子の結合などによって鎖の配向性が変化し、複製・転写における調節的役割を果たすことが明らかになりつつある。[1,2] このように、G4 の構造および熱力学的側面における研究は多く行われている。一方で G4 のフォールディング機構については、速度論的な検討が行われているものの、未だ統一的な見解は得られていない。

G4 のフォールディング機構を速度論的に検討することは、G4 の複雑な形成経路に生じる中間体の存在を明らかにすることができる。さらに、フォールディングに必要なタイムスケールを決定することは、小分子やタンパク質などによって G4 のフォールディングがどのように調節されているか、また生物学的反応のスケールに相当しているかを明らかにするためにも重要である。これまでの速度論的な研究は主にヒトテロメア配列を用い、高速反応装置や分光器を使用して行われてきた。MD シミュレーションにより、G ヘアピン→G トリプレックス→G4 の順に形成されることが提唱された。[3] (Fig. 1) 現在までの研究からは、G4 は G ヘアピンを核とし、様々な中間体を経由してミリ秒から数分単位でフォールディングすることが示唆されている。さらに近年、ループ領域が構造化されている G4（ヘアピン G4）が、構造化されていない G4 よりも速くフォールディングすることが示された。[4] ヘアピン G4 は遺伝子のプロモーター領域に局在しているため、生物学的にも意義のある要素である。

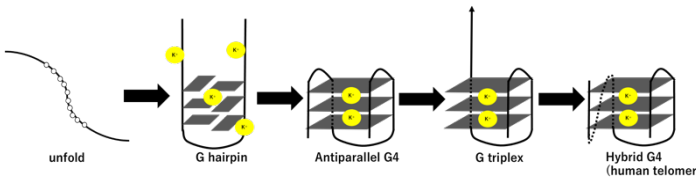


Fig. Proposed pathway of human telomere G4 formation.

そこで本研究では、ループ領域の構造に着目し配列を系統的に変化させることで G4 のフォールディング速度に及ぼす効果を検討した。その結果、ループ領域を不安定にさせた配列やヘアピンループ構造を形成しない配列では、ヘアピンを形成している配列と比べ速度定数が著しく小さくなることが示された。これらの結果から、ループ領域の構造が G4 のフォールディングにとって重要であることが示された。

1）D. Sen, *et al., Nature* **344**, 410-414 (1990).
2）M. Kim. *et al., J. Am. Chem. Soc*. **124**, 2098-2099 (2002).
3） T. Mashimo, *et al., J. Am. Chem. Soc*. **132**, 14910-14918 (2010).
4）T. Q. N. Nguyen, *et al., J. Phys. Chem. B* **124**,5122-5130 (2020).

がんの光線力学療法を指向した３脚型キノンーシアニン色素の光増感活性の評価

○村元順哉[1]・安原優[1]・坂本隆[1,2]（[1]和歌山大シスエ、[2]和歌山大院シスエ）

Evaluation of tripodal quinone-cyanine dies as photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer

(Faculty of Systems Engineering, Wakayama University[1], Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University[2]) MURAMOTO, Junya[1]; YASUHARA, Yu[1]; SAKAMOTO, Takashi[1,2]

非標準的な核酸構造の１つである４重鎖（G4）核酸は、染色体テロメア領域や、種々のがん関連遺伝子のプロモーター領域にも多く存在し、がん治療の標的になると期待されている。フタロシアニン亜鉛錯体は、そのG4核酸への選択的結合能とNIR光励起による活性酸素種（ROS）放出能から、がんの光線力学療法（PDT）の光増感剤となることが報告[1)]されているが、このようなG4核酸に選択的な光増感剤の報告例は稀である。

本研究ではG4核酸を標的とするPDTを実現するための新たな光増感剤候補の探索を行うこととし、その化学構造の基本骨格として、最近我々が開発した３脚型キノン-シアニン骨格に着目した。３脚型キノン-シアニン蛍光色素である$QCy(MeBT)_3$（図１）は、２重鎖及びG4 DNAを異なる波長の蛍光増強で検出できる優れた蛍光プローブ[2)]であるが、その蛍光量子収率は0.01以下であり、励起エネルギーのほとんどが無輻射過程を経て基底状態に戻る。すなわち、緩和過程でROSを放出している可能性が高いと考えられる。

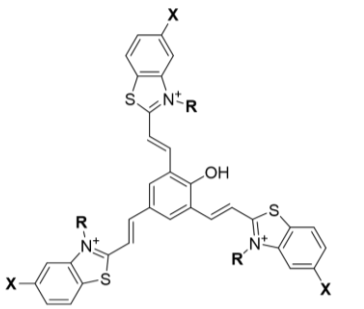


図 1. 用いた３脚型キノン-シアニン色素の構造

これを実証するために、まずは光照射530 nmによる$QCy(MeBT)_3$のROS放出能力を評価した。一重項酸素（$^1O_2$）に選択的に反応するフルフリルアルコール（FA、2.1 mM）の低粘度（0%グリセロール）および高粘度（50%グリセロール）水溶液に$QCy(MeBT)_3$（10 μM）を添加し、光照射120分後の残存FA量を比較した。結果、高粘度水溶液の場合、顕著なFAの減少（30%）が観測され、$QCy(MeBT)_3$の分子内運動の減少により$^1O_2$が生成することが確認できた。また、このFAの減少は光照射した場合のみ観測されたことから、$QCy(MeBT)_3$が光増感剤としての能力を持つことが明らかとなった。

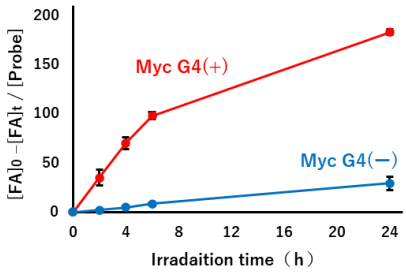


図 2. $QCy(MeBT)_3$ の光照射による G4 DNA 依存的な一重項酸素の放出．[MycG4] = 0 or 10 μM, $[QCy(MeBT)_3]$ = 10 μM [FA] = 2.1 mM in 50 mM Tris-HCl (pH7.5) containing 100 mM KCl.

次に、G4 DNA（Myc G4）、$QCy(MeBT)_3$およびFAのバッファー溶液に光照射（530 nm）を行い、$^1O_2$生成のG4 DNA依存性を評価した。FA減少量の24時間後までの経時変化を計測した結果（図２）、G4 DNA添加によるFA減少量の顕著な増加が見られ、$QCy(MeBT)_3$への光照射による$^1O_2$の生成が、G4 DNA依存的に引き起こされることが明らかとなった。発表では、G4 DNAへの選択性を高めた$QCy(BnBT)_3$、さらに重原子として臭素を導入した$QCy(BnBT\text{-}Br)_3$を用い、G4 DNA選択的な光増感剤としての能力を検討した結果も合わせて報告する。

1) K. Kawauchi, W. Sugimoto, T. Yasui, K. Murata, K. Itoh, K. Takagi, T. Tsuruoka, K. Akamatsu, H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, D. Miyoshi, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2271.
2) T. Sakamoto, Z. Yu, Y. Otani, *Anal. Chem.* **2022**, *94(10)*, 4269–4276.

グアニン四重鎖を含む DNA に対するトポイソメラーゼ I の反応性

○坂本皓哉[1]・横澤龍馬[1]・山梨舞子[1]・大吉崇文[1]（[1]静岡大院理）

The reactivity of Topoisomerase I to G-quadruplex-containing DNA ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University) SAKAMOTO, Koya[1]; YOKOSAWA, Ryoma[1]; YAMANASHI, Maiko[1];OYOSHI, Takanori[1]

グアニン四重鎖（G4）構造は、4 つのグアニン塩基がフーグスティーン型の水素結合によって形成された G カルテットが重なることで出来る核酸局所構造の一つである。ゲノム DNA 中での G4 の形成は転写の制御やテロメア末端の保護などに関与しており、生体内において重要な役割を果たしていることが知られている [1, 2)]。

G4 の形成は DNA のねじれの状態によって制御されており、ネガティブスーパーコイル DNA 中でその形成が促進されるが、生体内でネガティブスーパーコイル DNA のねじれは、トポイソメラーゼ I（Top1） によって解消され、Relax 状態に巻き戻されることが知られている [3)]。さらに Top1 は、G4 DNA に結合することが報告されている [4)]。しかし、G4 を含むネガティブスーパーコイル DNA に対する Top1 の反応性は、未だ明らかになっていない。そこで我々は、G4 を含むネガティブスーパーコイル DNA に対する Top1 の反応性を解析することを目的とした。

G4 を含むネガティブスーパーコイル DNA に対する Top1 の反応性を解析するため、G4 形成配列を含むプラスミドと含まないプラスミドを用意し、これらプラスミドに対して Top1 を反応させた後、アガロースゲル電気泳動によってプラスミドのスーパーコイル状態の変化を解析した。その結果、Top1 は G4 形成配列を含むプラスミドの方をより早くリラックス状態に移行させた。さらに、触媒活性部位を欠損させることで、DNA に結合することは出来るが Relax 化させることが出来ない Top1 の変異体である Top1 ΔCterm を Hela 細胞内に発現させ、Top1 ΔCterm と G4 の局在を免疫蛍光染色によって調べた結果、Top1 と G4 DNA が共局在していることが分かった。この結果から、Top1 が G4 構造を認識し、その周囲のネガティブスーパーコイルを効率的に解消することが示唆された(Figure 1)。

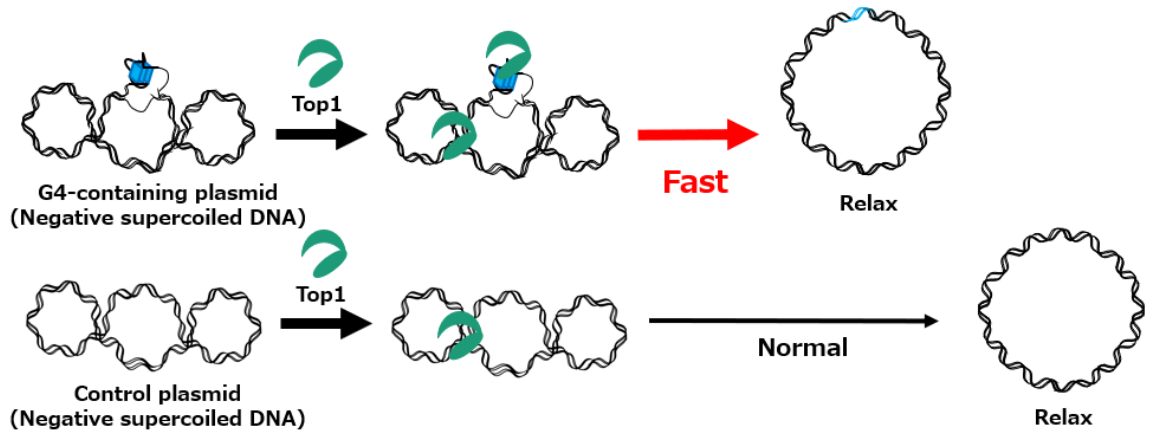


Figure 1. A model of Top1 reactivity to G4-containing plasmid

1) *Proc Natl Acad Sci USA,* 99, 11593-11598, 2002
2) *J Am Chem Soc,* 134, 11974-11976, 2012
3) *J Med Chem,* 52, 2863-2874, 2009
4) *Nucleic Acids Res,* 28, 4832–4838, 2000

G4 含有プロモーターを制御する機能性ポリペプチドの開発

○苅米 倭[1]・山梨舞子[1]・石原顕紀[1]・大吉崇文[1,2,3]（[1]静大院理、[2]静大院創造、[3]静大グリーン研）

Development of functional polypeptides regulating G4-containing promoter (Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University[1], Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University[2], Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University[3]) KARIKOME, Yamato[1]; YAMANASHI, Maiko[1]; ISHIHARA, Akinori[1]; OYOSHI, Takanori[1,2,3]

グアニン四重鎖（G4）構造形成配列は多くのプロモーター配列に存在することが報告されており、転写に対する重要な構造として考えられている[1)]。プロモーター中に G4 構造を有するガン遺伝子である *bcl-2* は、G4 結合性転写因子である Nucleolin によって転写が活性化される一方で、同様にプロモーター中に G4 構造を有する *c—myc* においては、Nucleolin によって転写が抑制されることが報告されている[2,3)]。このように異なるプロモーター中の G4 によって転写の制御機構が異なっているが、G4 と G4 結合性タンパク質による転写に関わる詳細な制御機構はほとんど明らかになっていない。そこで我々は、G4 構造をプロモーターにもつ遺伝子について、人工的に転写を抑制および活性化を行うことができる G4 結合性ポリペプチドの開発を行い、各遺伝子におけるプロモーター中の G4 構造の役割を明らかにすることを目的とした。この G4 結合性ポリペプチドとして、当研究室で既に G4DNA に特異的に作用することが報告した TLS/FUS の RGG 領域を基にした新規 G4DNA 結合性ポリペプチドを（RGGF）を用いることとした[4)]。さらに、この RGGF に単純ヘルペスウイルスの転写活性化因子である VP16 の転写活性化領域を RGGF に融合させた VP16-RGGF を作成した[5)]。

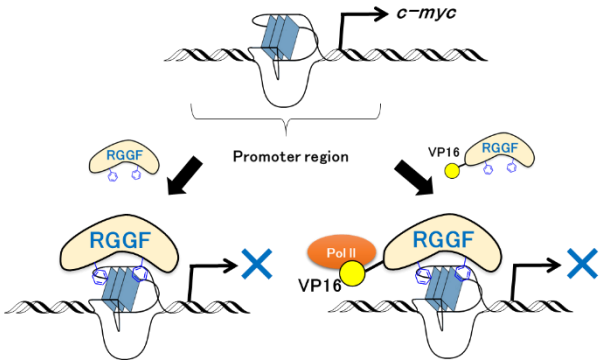


Fig 1. The model transcriptional mechanism with functional polypeptide in *c-myc*

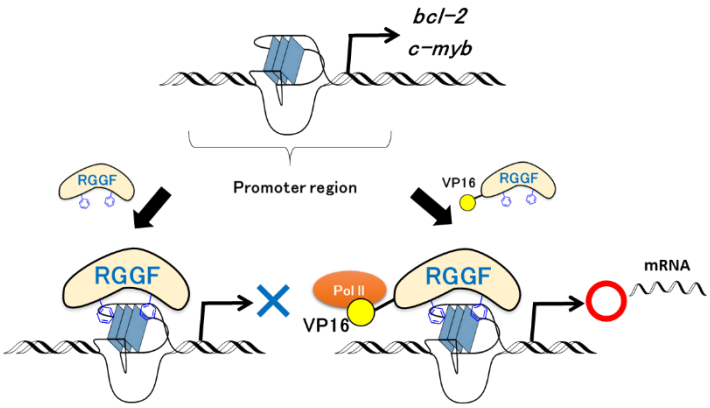


Fig 2. The model transcriptional mechanism with functional polypeptide in *bcl-2* and *c-myb*

RGGF をヒト細胞に高発現させたとき、プロモーター中に G4 構造を有する *bcl-2* と *c-myb* 及び *c-myc* の遺伝子において、転写が抑制された(Fig. 1,2)。さらに、VP16-RGGF をヒト細胞に高発現させたとき、*bcl-2* と *c-myb* の転写は活性化されたが、*c-myc* の転写は抑制された(Fig. 1,2)。これらの結果より、*bcl-2* と *c-myb* 及び *c-myc* のプロモーター中の G4 は、結合する G4 結合性タンパク質によらず、各プロモーター中の G4 の転写制御における役割が異なっていることが示唆された。

1) *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 406-413, 2) *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 12439-12449,
3) *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23622-23635, 4) *ACS. Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2564-2569,
5) *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 275-280

ルテニウム–白金連結錯体を鋳型特異的に脱離する DNA プローブを用いた核酸検出

○朝比奈 雄志・小嶋 美鈴・北村 裕介・勝田 陽介・井原 敏博（熊本大院先端）

Nucleic acid detection using DNA probes that release a ligated product between ruthenium and platinum complexes in a sequence specific manner. (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University) ASAHINA, Takeshi; KOJIMA, Misuzu; KITAMURA, Yusuke; KATSUDA, Yousuke; IHARA, Toshihiro

標的核酸を鋳型としてプローブ核酸同士を連結し、その連結体を質量分析で確認することで、標的核酸を間接的に検出する手法は、ハイスループットな核酸分析法として高い注目を集めている。しかし、核酸のイオン化効率が低いことや、反応基質のプローブに比べ連結体が安定に標的核酸と結合し、未反応のプローブ核酸と置換されないため、シグナルの増幅が困難である。そこで本研究では、イオン化効率が高い金属錯体に着目し、特徴的な同位体存在比を有する Ru と Pt を中心金属とする錯体を用いた。これらの錯体を修飾したプローブには、プローブの核酸部位と錯体部位を連結するリンカー部位にプロテインスプライシング反応を起こすペプチドユニットを導入している（Fig. 1）。そのため、両プローブが標的核酸に結合して近接するとスプライシング反応が誘発され Ru-Pt 連結錯体を脱離する。カチオン性の錯体の脱離によって二本鎖が不安定化するため、プローブを過剰に加えておけば、未反応のプローブと錯体脱離後のプローブが置換し、連結・脱離反応が繰り返し起こると予想される。本戦略により、標的の遺伝情報を生成物である連結錯体の質量とユニークな同位体パターンの変化として高感度に検出できると期待される（Fig. 2）。

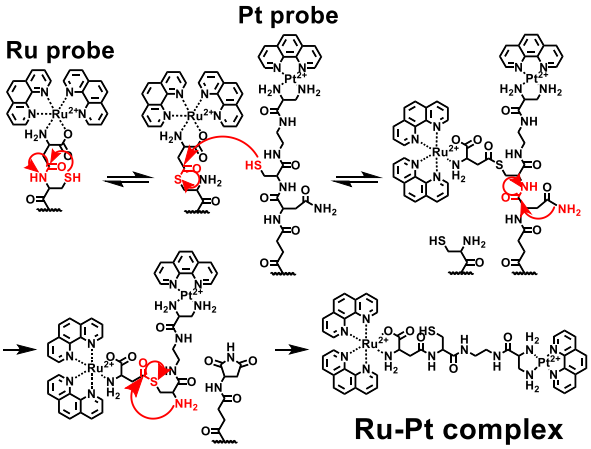


Fig. 1. Schematic representation of the formation and release of ruthenium-platinum complexes.

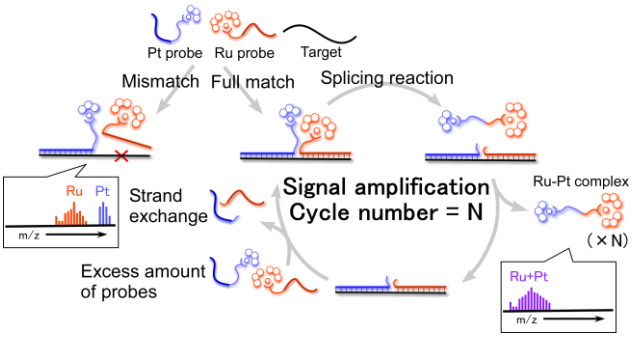


Fig. 2. Signal amplification based on the reaction cycle for the autonomous and successive formation and release of ruthenium-platinum complexes.

Ru 錯体修飾プローブを以下の手順で合成した。まず、**Fmoc-Cys(Mmt)-NHS**（NHS : N-ヒドロキシスクシンイミド）を 3’アミノ化 DNA とカップリングし、Fmoc 脱保護後、Ru 錯体の NHS 活性エステル体 **[Ru(phen)$_2$Asp-NHS](PF$_6$)$_2$** と反応させた。AgNO$_3$/DTT により Mmt 基を脱保護することで目的物を得た。Pt 錯体修飾プローブは以下の手順で合成した。合成した **Alloc-EDA-Cys(Mmt)-Asn(Mtt)-SC-NHS** を固相担体上で 5’アミノ化 DNA とカップリングし、Alloc 脱保護後、Pt 錯体の NHS 活性エステル体 **[Pt(phen)dap-NHS]Cl$_2$** と反応させ、固相から切出し、単離した。AgNO$_3$/DTT および AcOH により Mmt 基、もしくは Mtt 基を脱保護することで目的物を得た。合成した両プローブと標的 DNA を 0°C にて 15 分間インキュベートした。マトリックスを用いずにそのまま MALDI-TOF/MS で測定を行った結果、両プローブと完全相補的な DNA 存在下では、連結錯体の質量が検出された。一方、Ru 錯体プローブと一塩基ミスマッチ部位を有する DNA 存在下では複合錯体は検出されなかった。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

新規 G4 リガンドスクリーニングを用いた構造選択的 G4 リガンド開発

○橋本佳樹[1]・取井猛流[1]・木下菜月[1]・川内敬子[1]・建石寿枝[2]・杉本直己[1,2]・三好大輔[1]（[1]甲南大 FIRST、[2]甲南大 FIBER）

Development of Structural Selective G-Quadruplex Ligand with Novel Ligand Screening (Graduate School of Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University [1], Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research, Konan University [2]) HASHIMOTO, Yoshiki[1]; TORII, Takeru[1]; KINOSHITA, Natsuki[1]; KAWAUCHI, Keiko[1]; TATEISHI-KARIMATA, Hisae[2]; SUGIMOTO, Naoki[1, 2]; MIYOSHI, Daisuke[1]

グアニンに富んだ核酸配列はグアニン四重らせん構造 (G4) を形成することが可能である。G4 はテロメアやがん関連遺伝子のプロモーター領域・mRNA の 5'-UTR 領域に局在し、テロメア伸長抑制や遺伝子の発現調節など、様々な生物学的プロセスに関与する [1)]。そのため、G4 は新規がん治療薬の標的として注目されている。さらに G4 の生物学的な意義を解明するために、G4 リガンドを用いた細胞内 G4 のイメージングも近年注目されている。これらのような目的で G4 リガンドの細胞内応用が盛んに試みられている。G4 リガンドの細胞内応用にあたって、細胞内の核酸存在環境に注目すると、細胞内ではゲノム DNA の大部分が二重らせん構造を形成し、塩基数にして 6000×10^6 塩基存在する。一方で G4 はゲノム上に 70 万ヶ所の形成可能配列が存在し、塩基数に換算すると約 14×10^6 塩基である [2)]。このように、細胞内では G4 と比較して大過剰の二重らせん構造が存在する。そのため、細胞内で応用する G4 リガンドには高い構造選択性が要求される。しかしながら、これまでに高い構造選択性を有する G4 リガンドはほとんど報告されていない。その原因として、構造選択的 G4 リガンドを取得するためのハイスループットスクリーニングシステムがいまだに開発されていないことや、構造選択性をもたらす G4 リガンドの分子骨格が明らかにされていないことが挙げられる。

そこで本研究では、G4 構造選択的な蛍光プローブである Thioflavin T (ThT) [3)]を用いたスクリーニングシステムである ThT-Displacement assay (TD assay) を構築した。本手法は細胞内の核酸環境を模倣した過剰二重らせん構造 DNA 存在下で実施可能なハイスループットスクリーニングシステムである。本手法によって、構造選択的 G4 リガンド候補を取得し、転写活性や細胞増殖に及ぼす抑制効果を検討した。さらに取得した候補化合物の誘導体を用い、G4 に対する結合親和性を検討することで構造選択性に重要である構造因子を明らかにした。発表では取得した構造選択的 G4 リガンド群とその物性についても報告する。

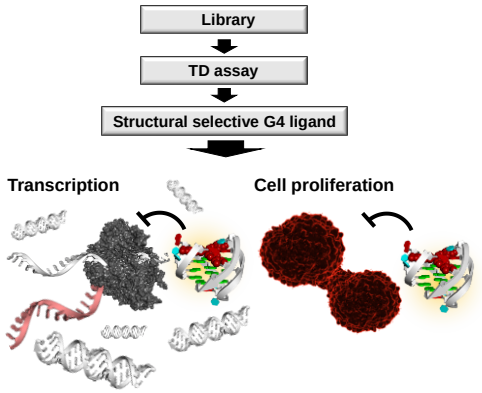


Fig. Schematic illustration of structural selective G4 ligand development.

1) D. Rhodes, *et al., Nucleic. Acid. Res*. **43**, 8627-8637 (2015).
2) V. S. Chembers, *et. al., Nat. Biotechnol*. **33**, 877-881 (2015).
3) V. Gabelica, *et al., Biochemistry* **52**, 5620-5628 (2013).

人工核酸 L-*a*TNA と SNA の化学的な鋳型合成の速度論解析を基盤とした長鎖伸長反応法の構築

○沖田ひかり・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

Development of Long-Chain Elongation Reaction Based on Kinetic Analysis of Chemical Template-Directed Ligation of L-*a*TNA and SNA (Graduate School of Engineering, Nagoya University) OKITA, Hikari; MURAYAMA, Keiji; ASANUMA, Hiroyuki

DNA のリボース骨格を改変した XNA(ゼノ核酸)は高い分解酵素耐性を有しており、当研究室でも非環状型の XNA を創出してきた。特に L-*a*TNA[1]や SNA[2]は各々、相補鎖だけでなく、天然核酸とも安定な二重鎖を形成できるため、生物学的ツールとしての応用が期待されている(Fig. 1)。しかしながら、XNA 骨格が酵素に認識されないため、酵素反応へ応用することが困難であった。そこで、酵素の代わりに縮合剤 *N*-cyanoimidazole と Mn^{2+}を用いた化学連結法によって非環状型 XNA の鋳型合成法の開発を行ったところ、3-mer の L-*a*TNA ランダム配列プールを用いた 17-mer L-*a*TNA の配列複製に成功した[3]。また、8-mer 断片の連結反応において L-*a*TNA の方が SNA よりも 17 倍以上連結速度が速いことも確認している。本研究では(1) L-*a*TNA-SNA キメラ配列の反応解析を行い、その結果をもとに(2)最適な伸長方向・二価金属イオンを検討し、最終的に(3)化学連結法による L-*a*TNA の長鎖伸長反応法の高効率化を試みた。

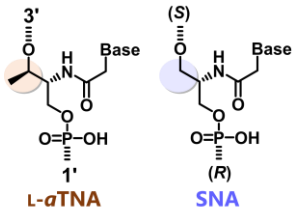


Fig. 1. Chemical structures of L-*a*TNA and SNA.

(1)連結部位または末端部位に数個の L-*a*TNA を導入した L-*a*TNA-SNA キメラ配列を用いて、8-mer 断片の連結反応を比較した。その結果、連結部位に L-*a*TNA を導入した方が末端部位に導入した場合に比べ 7 倍以上連結速度が速く、連結部位における L-*a*TNA の骨格構造が連結効率の向上に重要であることが示唆された。また、連結部位のリン酸基側が L-*a*TNA であると加速の効果が大きいことも明らかになったことから、プライマー(反応開始鎖)の連結部位にリン酸基が存在すると連結効率が向上するのではないかと考え、伸長方向の検討を行うことにした。

(2)伸長方向の検討では 3 種類の 3-mer の L-*a*TNA 断片を用いた 17-mer の配列複製にて 1'→3'方向と従来の 3'→1'方向の伸長速度を比較したところ、1'→3'方向の方が高い連結効率を示した(Fig. 2)。更に反応を加速させるために、リン酸基との相互作用が予想される二価金属イオンの種類を検討したところ、Cd^{2+}を用いた場合、極めて高い連結効率を示すことが明らかになった。

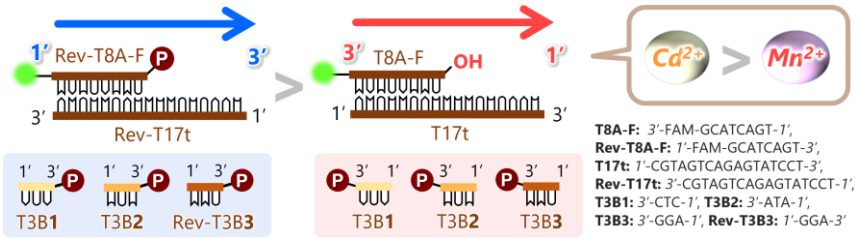


Fig. 2. Elongation direction and divalent metal cation in L-*a*TNA replication.

(3)最後に、最適化された 1'→3'方向かつ Cd^{2+}の条件のもと、従来の 17-mer よりも長い 23-mer、29-mer の L-*a*TNA 鋳型鎖上で 3-mer の L-*a*TNA ランダム配列プールを用いた逐次的な連結反応を試みたところ、両場合とも高効率に目的産物が得られたことが明らかになった。以上の結果より、反応条件の最適化を行うことで、長鎖 L-*a*TNA の配列複製法の確立に成功した。

[1] K. Murayama *et al*, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 6500. [2] H. Kashida *et al, Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 1285. [3] K. Murayama, H. Okita *et al*, *Nat. Commun.*, **2021**, *12*, 804.

mRNA 配列の翻訳効率と精度への影響の網羅的解析と人工抗体・環状ペプチドの高多様性ライブラリ創製への応用

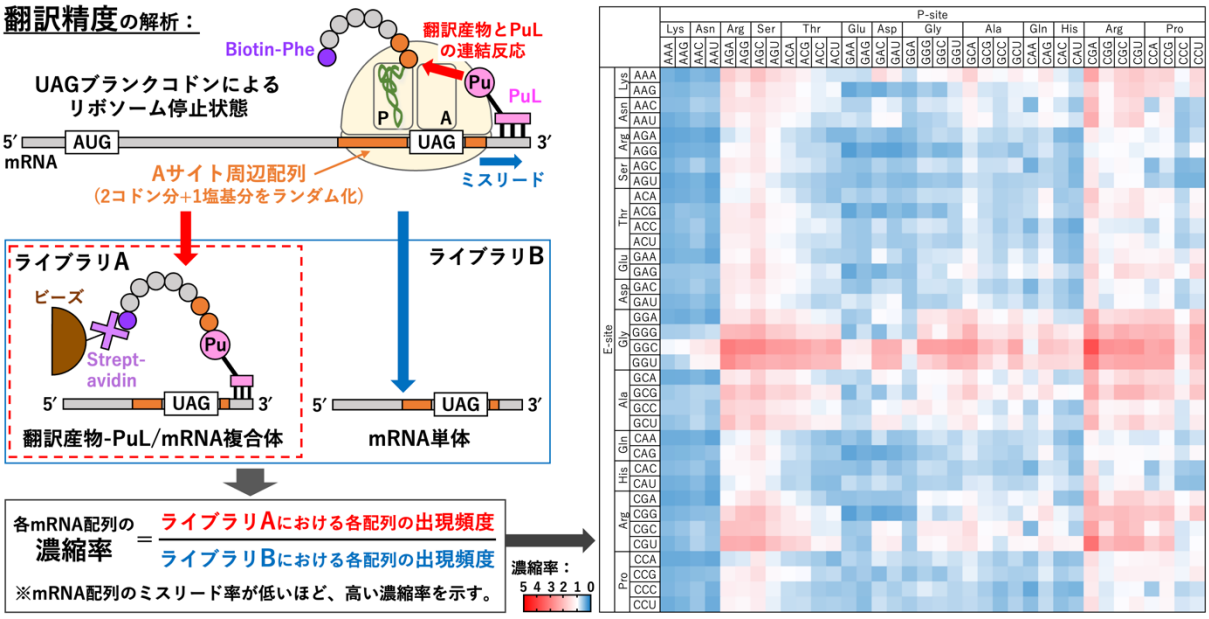
○梅本駿[1]・近藤太志[1]・藤野公茂[1]・林剛介[1]・村上裕[1,2]（[1]名大院工、[2]名大ナノライフ）

Construction of Highly Diverse Monobody and Macrocyclic Peptide Libraries Based on the Effect of mRNA Sequences on Translation Efficiency and Accuracy (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University[2].) UMEMOTO, Shun[1]; KONDO, Taishi[1]; FUJINO, Tomoshige[1]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1,2]

タンパク質の翻訳効率と翻訳精度は、mRNA 配列による影響を受けることが知られている。mRNA 配列が翻訳効率に与える影響については、*in vivo* で大規模に解析した例がこれまでに数多く報告されている[1-2]。しかし、*in vivo* での翻訳量は mRNA の転写効率などの違いも反映されるため、翻訳効率を直接評価することができない。そこで、私たちは再構成無細胞翻訳系と mRNA 提示法を用いて、*N* 末端領域の mRNA 配列による翻訳効率への影響を直接的に大規模解析した。その結果、*N* 末端領域が及ぼす翻訳効率への影響は、5'-UTR 配列とタンパク質の塩基配列に強く依存することが分かった。

翻訳精度に対しては、mRNA 配列が及ぼす影響を大規模に解析した研究はない。そこで、私たちは先ほどと類似の手法で、リボソームの A サイト周辺に存在する mRNA 配列による翻訳精度への影響を大規模解析した。翻訳精度の指標となる濃縮率を比較した結果、E サイトおよび P サイトのコドンが翻訳精度に大きく影響することが分かった。A サイトの UAG コドン直後の 1 塩基については、ピリミジン塩基よりもプリン塩基の方が A サイトのミスリードを強く誘発した。

これらの解析結果を活用して、より大きな多様性を持つ Monobody ライブラリ[3]と大環状ペプチドライブラリ[4]の構築を試みたところ、1 mL の翻訳液換算で約 100 兆種類のライブラリが調製できることが示された。進化分子工学的手法においてライブラリの多様性は機能性の高い分子を創製するために最も重要な要素の一つであるため、この成果は有用な人工抗体・大環状ペプチドの開発に貢献するものと期待される。



[1] Kudla, G., et al. *Science* **324**, 255-258 (2009). [2] Goodman, D. B., et al. *Science* **342**, 475-479 (2013).
[3] Kondo, T., *et al. Sci. Adv.* **6**, eabd3916 (2020). [4] Ishizawa, T., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **135**, 5433-5440 (2013).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

メチル化 RNA を検出する発蛍光性合成色素/タンパク質ハイブリッドプローブの開発

○上川 拓也[1,2]・堀 雄一郎[2]・野村 佳祐[1]・松木 星[1]・菊地 和也[1,3]（[1]阪大院工、[2]九大院理、[3]阪大免フロ）

Development of fluorogenic synthetic fluorophore/protein hybrid probes for detection of methylated RNA ([1]*Graduate School of Engineering, Osaka University*, [2]*Graduate School of Science, Kyushu University,* [3]*Immunology Frontier Research Center, Osaka University,*) KAMIKAWA, Takuya[1,2]; HORI, Yuichiro[2]; NOMURA, Keisuke[1]; MATSUKI, Akari[1]; KIKUCHI, Kazuya[1,3]

アデノシンの *N* ^{6}-メチル化は、重要な RNA 転写後修飾のひとつとしてよく知られている。*N* ^{6}-メチルアデノシン(m^{6}A)は、RNA の安定化・スプライシングなどの遺伝子発現制御に関与するだけでなく、II型糖尿病・COVID-19・癌などの疾患と関連することが報告されていることから、その検出技術の開発は、生命科学に加え医学分野においても重要な課題である [1]。しかし、メチル化 RNA を可視化するために従来開発された、m^{6}A 結合タンパク質と蛍光タンパク質を融合させたバイオプローブを用いる手法は、遊離状態のプローブからも蛍光がみられるなどの課題を残している [2] 。

本課題を解決するため、演者らが開発してきた PYP (Photoactive yellow protein)タグと合成蛍光色素を用いるタンパク質ラベル化技術を応用した [3]。これまでに、本技術を用いて、メチル化 DNA と結合した際に蛍光強度が増大する発蛍光プローブを開発し、生きた細胞内の細胞分裂過程におけるメチル化 DNA 動態の可視化を達成している [4]。本研究では、この設計戦略を応用し、m^{6}A の蛍光検出法の構築を志向した発蛍光性を示す合成色素/タンパク質ハイブリッドプローブの開発を行った。ハイブリッドプローブは、m^{6}A を認識し結合する YTH ドメインと PYP タグを組み合わせた融合タンパク質と核酸と結合した際にその蛍光性を回復する核酸結合色素により構成されている (Figure 1)。ハイブリッドプローブの蛍光特性を調べた結果、メチル化 RNA を in vitro で蛍光検出できることを示した。本発表では、ハイブリッドプローブの分子設計、蛍光特性および m^{6}A を有した RNA に対する結合能についての詳細を報告する。

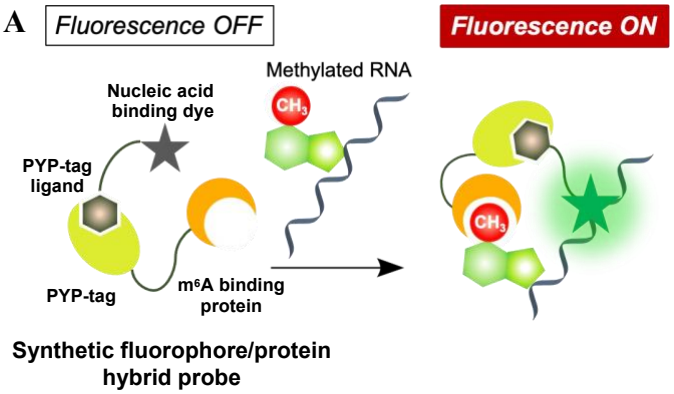


Figure 1. Principle of fluorogenic detection of methylated RNA constructed by PYP-tag labeling system.

1) T. Sun, R. Wu, L. Ming, *Biomed. Pharmacother.* **112**, 108613 (2019).

2) L. Kan, A. V. Grozhik, J. Vedanayagam, D. P. Patil, N. Pang, K. S. Lim, Y. C. Huang, B. Joseph, C. J. Lin, V. Despic, J. Gao, D. Yan, S. Kondo, W. M. Deng, P. C. Dedon, S. R. Jaffrey, E. C. Lai, *Nat. commun.* **8**, 15737 (2017).

3) S. I. Reja, Y. Hori, T. Kamikawa, K. Yamasaki, Mi. Nishiura, S. D. Bull, K. Kazuya. *Chem. Sci.* **13**, 1419 (2022).

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

RNA 四重らせん構造を標的とした小分子による液液相分離の制御

○高宮渚[1]・鶴田充生[1]橋本佳樹[1]川内敬子[1]三好大輔[1]（[1]甲南大 FIRST）

Regulation of liquid-liquid phase separation by small molecules targeting RNA G-quadruplex (Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University[1]) TAKAMIYA, Nagisa[1]; TSURUTA, Mitsuki[1]; HASHIMOTO, Yoshiki[1]; KAWAUCHI, Keiko[1]; MIYOSHI, Daisuke[1]

筋萎縮性側索硬化症（ALS）や脆弱 X 関連振戦/失調症候群（FXTAS）などの神経変性疾患は、詳細な発症メカニズムが解明されておらず、治療薬・治療法の開発における課題となっている。近年、これらの神経変性疾患の原因タンパク質と mRNA が液液相分離現象（LLPS）を誘起することが報告されている[1)]。LLPS は、均質な液相を 2 つの異なる液相に分離する現象であり、ストレス顆粒や核小体などの Membraneless organelle（MLO）の形成につながる。LLPS は代謝やシグナル伝達、遺伝子発現などの重要な生体反応を制御するために用いられている。一方で、異常な LLPS はタンパク質の凝集やフィブリルの形成を誘発する。このことから、LLPS を抑制することで、フィブリルの形成が抑制し、疾患治療に繋がる可能性がある。LLPS を抑制させる化合物として、タンパク質に結合し LLPS を可溶化する Bis-ANS が報告されている[2)]。しかし、この化合物は特異性がないため、正常な LLPS も抑制してしまうことが問題である。このことから、疾患に関連する LLPS を特異的に抑制する化合物を同定する必要がある。LLPS に関与するタンパク質のドメインは天然変性領域として知られ特定の構造を形成しない。そのため、LLPS を制御する際に特定のタンパク質を標的とする低分子化合物を開発することは困難である。LLPS においてタンパク質と同様に重要な役割を果たす生体分子に mRNA がある。神経変性疾患に関与する MLO であるストレス顆粒には、FMR1 遺伝子の非翻訳領域に存在する GC 反復配列が異常拡張された mRNA が含まれる。このようなグアニンに富んだ配列は、グアニン四重らせん構造（G4）を形成できる。さらに、FMR1 遺伝子から翻訳されるタンパク質である FMRP の RGG domain を模倣したペプチドは G4 に選択的に結合することが報告されている。これらのことからストレス顆粒に G4 の形成が関与していることが示唆されている。これまでに様々な G4 に対して親和性を有する小分子が報告されていることから[3)]、G4 を標的とすることことで LLPS を制御できる化合物の創製できる可能性がある。

そこで本研究では、まず標的 RNAG4［$r(G_2C)_4$ 及び $r(G_4C_2)_4$］に結合する化合物の同定を行った。（Fig 1.）次に、RNAG4 含む LLPS モデルシステムを用い、同定した化合物の LLPS に対する効果を検討した（Fig 2.）。その結果、LLPS を抑制することができる化合物群を見出した。

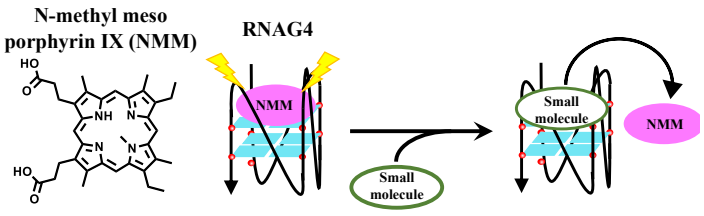


Fig 1. Schematic illustration of the method used in this study, an experiment to evaluate the affinity of small molecules for RNAG4.

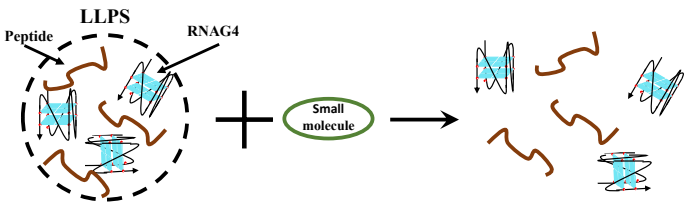


Fig 2. Schematic illustration of the method used in this study, an experiment to evaluate the effect of small molecules on LLPS.

1) J. P. Taylor, *et. al., Nature*, **539**, 197-206 (2016)
2) W. K. Surewicz, *et. al., Nat. Commun.*, **11**, 5574-5590 (2020)
3) S. Balasubramanian, *et. al., Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 261-275 (2011)

3’チオ化オリゴ核酸を用いた長鎖 DNA アセンブリ技術の開発

○加瀬光希弥[1]・稲垣雅仁[1]・平岡陽花[1]・橋谷文貴[2]・阿部奈保子[1]・木村康明[1]・阿部 洋[1,3,4]（[1]名大院理、[2]名大物国センター、[3]JST CREST, [4]iGCORE）

Development of long-chain DNA assembly technology by using 3’-thio-phosphorothiolate oligodeoxynucleotides (Graduate School of Science, Nagoya University[1], Research Center for Material Science, Nagoya University[2], Japan Science and Technology Agency, JST-CREST[3], Institute for Glyco-core Research (iGCORE)[4]) Mikiya, Kase[1]; Inagaki, Masahito[1]; Hiraoka, Haruka[1]; Hashiya, Humitaka[2]; Abe, Naoko[1]; Kimura, Yasuaki[1]; Abe, Hiroshi[1,3,4]

近年、CRISPR-Cas9 に代表されるゲノム編集技術の発展に伴い、人工的にゲノム DNA を合成する研究が注目されている。数十万塩基対を越えるような長いゲノム DNA を合成するためには、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅した短鎖 DNA 断片を正確かつ高効率に連結する DNA アセンブリ技術の開発が重要である。DNA アセンブリ技術は、酵素的手法と化学的手法に大別される。酵素的手法の代表としてゴールデンゲート法が挙げられるが、制限酵素を用いるため切断配列に制限があり、複数の DNA 断片を連結する場合には配列設計の自由度が低いという問題点が指摘されている [1]。また、調製できる接着末端の長さが 4 塩基に規定されてしまうため、連結効率がリガーゼの活性に依存し、コントロールすることが困難である。そこで我々は、制限酵素を用いること なく化学的核酸鎖切断により任意の配列と塩基数を有する接着末端を調製し、リガーゼによる連結効率向上を可能にする手法の開発に取り組んでいる。本研究では、高効率かつ正確な核酸連結により、ゲノムサイズ DNA 合成へと応用しうる新規化学的核酸鎖切断法の開発に取り組んだ。具体的には、オリゴ核酸中、任意の位置のリン酸ジエステル結合 3'酸素原子を硫黄原子に改変したチオリン酸ジエステル結合を導入する [2] ことにより、チオリン酸ジエステル結合部位において特異的に化学的鎖切断を誘起する手法を開発した。このような鎖切断反応は、銀ナノ粒子を用いることにより誘起可能であることを見出した。さらに、チオリン酸化オリゴ核酸をプライマーとして用いた PCR により目的配列 DNA を増幅後、得られた増幅産物 DNA を貴金属ナノ粒子で処理することにより任意の長さ・配列を有する接着末端を調製できることを明らかにし、つづく DNA リガーゼによる DNA 連結により数百塩基対を超える長鎖 DNA を合成することに成功した。本発表では、3’チオ化核酸の高効率合成法の開発、銀ナノ粒子によるオリゴ核酸鎖切断反応の実証とその長鎖オリゴ核酸合成への応用について紹介する。

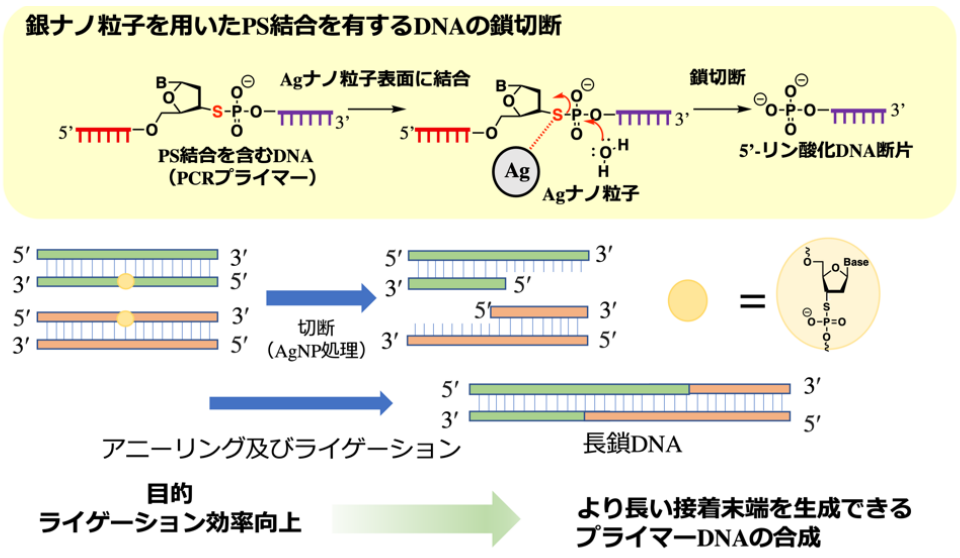


Fig 1. DNA Assembly Method Based on Silver Nanoparticle Induced Strand Cleavage

1） S. Marillonnet, *et al., PLoS ONE*, **2008**, *3*(11), e3647.
2） (a) J. S. Vyle, *et al, Biochemistry*, **1992**, *31*, 3012; (b) G. Sabbagh, *et al., Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*(2), 495.

細胞核に蓄積する Hoechst 修飾 DNA の合成と評価

○蒔苗宏紀・西原達哉・田邉一仁（青山学院大学大学院　理工）

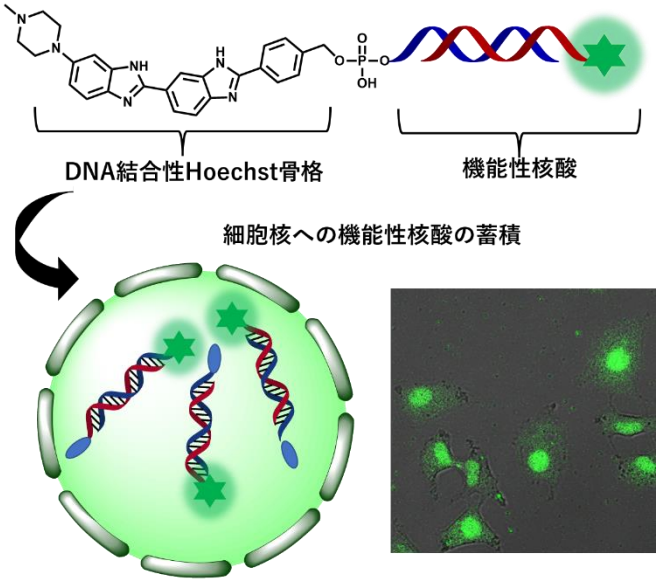
Synthesis and Evaluation of Hoechst-Tethered Oligodeoxynucleotides that Accumulate in Cell Nucleus

(Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) ○MAKANAI, Hiroki, NISHIHARA, Tatsuya, TANABE, kazuhito

人工核酸は遺伝子を標的とした核酸医薬品として機能するだけでなく、細胞内において生体内因子との結合、捕捉、機能制御など多様な特性を示す機能分子として駆動することが知られる。これまでに、細胞内の各種因子のイメージングに資する人工核酸、細胞内で駆動する DNA 型ナノマシン、薬剤を運搬する人工核酸などが開発され、人工核酸の多様性・多機能性が示されてきた。このように、細胞内で駆動する人工核酸が多数開発されているが、そのほとんどは細胞質内で駆動するものであり、細胞核に運搬されて駆動する人工核酸はほとんどない。細胞核は、細胞の中で最も大きなオルガネラであり、ゲノム DNA も格納されていることから、人工核酸を細胞核に運搬できれば、さらに人工核酸の汎用性を高めることが可能である。

我々の研究グループではこれまでに細胞核内のバイオイメージングを指向し、核染色試薬である Hoechst に着目してきた。Hoechst 分子は DNA 二重鎖の副溝に結合する小分子であり、その結合定数は 10^8 レベルと非常に強固である。最近では、この特性を活用して細胞核内へ各種分子を選択的に輸送する運搬機能分子として活用できることが示されてきた [1, 2]。そこで本研究では DNA の末端に Hoechst 分子を修飾した人工核酸を設計・合成した。すなわち、Hoechst 分子の核選択的な蓄積能を活用した人工核酸の核内集積システムの構築ができると考えた。

本研究ではベンジルアルコールを有する Hoechst 誘導体を合成し、ホスホロアミダイト法を用いて DNA オリゴマーに Hoechst 部を導入した。得られた Hoechst 修飾 DNA オリゴマー(Hoechst-DNA)に DNA を添加し、DNA に対する結合能を、蛍光分光法を用いて評価した。その結果、DNA の添加量に伴って Hoechst-DNA 由来の蛍光強度が上昇したことから、Hoechst-DNA は強く二重鎖 DNA に結合することがわかった。なお、結合定数は $7.8\times10^5\ M^{-1}$ であった。続いて Hoechst-DNA の細胞核への蓄積能を評価した。核への蓄積を追跡するために、相補的な配列をもつ FAM 修飾 DNA と二重鎖形成させた後、リポフェクタミンを用いて Hoechst-DNA を細胞内へ導入した。その結果、FAM 由来の強い蛍光が細胞核から観測され、Hoechst-DNA が細胞核内へ蓄積していることが示唆された。現在、DNA 鎖長を変えた誘導体の合成と細胞核への蓄積能を評価しており併せて報告する。



1) A. Nakamura, S. Tsukiji, *Bioorganic Med. Chem. Lett,* **27** 3127 (2017)
2) D. Hara, Y. Umerhara, A. Son, W. Asahi, S. Misu, R. Kurihara, T. Kondo, K. Tanabe, *ChemBioChem,* **18** 956 (2018)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

RNA Hacking 技術を基盤とした超選択的な Staple 核酸による遺伝子機能解明

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

Elucidation of gene function based on RNA Hacking technology by super selectivity Staple oligomer (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University[1], Faculty of Science and Technology, Hirosaki University[2], Institute for Chemical Research, Kyoto University[3]) KIDA, Tomoki[1]; KATSUDA, Yousuke[1]; KAMURA, Takuto[1]; LAVIN, Kotone[1]; KITAMURA, Yusuke[1]; HAGIHARA, Masaki[2]; SATO, Shin-ichi[3]; IHARA, Toshihiro[1])

生命活動は遺伝子の働きによって恒常性が保たれており、これら遺伝子機能に異常が生じることによって数多くの疾病は引き起こされる。したがって遺伝子機能や相互関係を解明することは、新たな創薬の可能性を見出すことができるため高い注目を集めている。近年では遺伝子発現抑制技術の一つである siRNA を用いることで標的遺伝子の機能解明が試みられている。これら技術は低分子化合物と比較して標的選択性が高い技術であるが、標的配列との相同性が高い遺伝子にも結合してタンパク質発現抑制をしてしまう狭義の Off-target 効果が生じる。したがって既存技術を利用して単一遺伝子の機能を正確に解明することは難しいと言わざるを得ない。

我々は Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を用いて標的 mRNA 上にタンパク質翻訳反応を阻害する RNA G-quadruplex（RGq）の形成を誘導する新規技術を開発している（Fig. 1a）。本技術はグアニン繰り返し配列を近接化し、RGq 構造の形成誘導が行われることでのみ遺伝子発現抑制機能が作動することから既存技術よりも標的選択性の高い技術である。

in vivo 検討における先行研究で、我々は Staple 核酸によりカルシウムチャネルの一つである Trpc6 発現を抑制することに成功している。また、狭義の Off-target 効果を評価するために Trpc6 と配列相同性が高い Trpc3 の発現量を評価したところ、予想と反して Trpc3 発現量が上昇していることを確認した。一般的に Trpc6 と Trpc3 はヘテロ四量体を形成し生体内で機能していることから、Trpc6 の発現抑制を行うことでフィードバック機構のように Trpc3 の発現が上昇したことが考えられる（Fig. 1b）。このような現象は既存の研究では報告されておらず、siRNA などでは狭義の Off-target 効果により Trpc3 の発現も共に抑制している可能性が考えられる。本結果は標的選択性が高い Staple 核酸技術を利用することによって見出されたものであり、既存技術では探し出すことが難しい遺伝子機能を解明できる新規ツールとして利用可能である。

本発表では Trpc6 および Trpc3 の発現量変化を Staple 核酸と siRNA で比較し、さらに Staple 核酸技術が標的選択性を向上させるメカニズムに関して報告する。

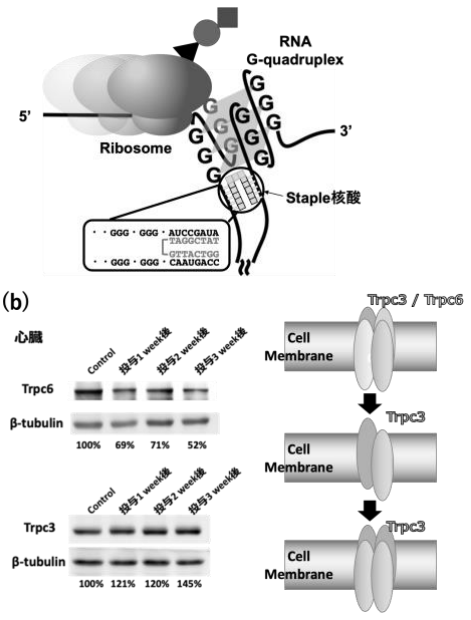


Fig. 1 (a) Staple 核酸技術の概念図。Staple 核酸の導入により RGq 構造の形成を誘導しタンパク質翻訳反応を抑制する。(b) Staple 核酸による Trpc6 の発現抑制効果並びに Trpc3 の発現量、および想定されるフィードバック機構の概念図。

グアニン四重らせん構造が形成する液滴の核酸配列特異的制御

○鶴田充生[1]・取井猛流[1]・小畠一起[1]・川内敬子[1]・建石（狩俣）寿枝[2]・杉本直己[1,2]・三好大輔[1]（[1]甲南大 FIRST、[2]甲南大 FIBER）

Sequence specific control of liquid droplets composed of RNA G-quadruplex (Graduate School of Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University[1], FIBER (Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research), Konan University [2]) TSURUTA, Mitsuki[1]; TORII, Takeru[2]; KOHATA, kazuki; KAWAUCHI, keiko; TATEISHI-KARIMATA, Hisae; SUGIMOTO, Naoki; MIYOSHI, Daisuke

細胞内での液液相分離現象を介した生体分子の液滴（ドロプレット）形成は、様々な生体反応を制御する新たな分子機構として注目されている[1]（Figure）。これまで知られていた細胞内に存在している生体分子の foci も次々とドロップレットであることも明らかにされている。これらのドロプレット内に封入されるタンパク質の多くは、プリオン様ドメインや RGG ドメインなどの天然変性領域を含むことが知られている。

ドロプレット形成は神経変性疾患の発症にも関与していると考えられている。神経変性疾患の脆弱 X 関連振戦/失調症候群（fragile X tremor/ataxia syndrome：FXTAS）では、*FMR1* 遺伝子上の GGC の繰り返し配列が異常に拡張することで疾患発症につながると考えられている。このようなグアニンリッチな配列は、核酸の非標準構造の代表例であるグアニン四重らせん構造（G4）を形成する可能性がある。さらに興味深いことに、RNA の G4 は RGG ドメインと選択的に結合することも報告されている[3]。このように疾患関連ドロプレットの構成要素が明らかとなりつつある。しかし、ドロプレットの分解に有効な薬剤の報告例はない。

そこで本研究では、GGC 反復配列が形成する G4 を標的とし、G4 の相補鎖となるオリゴ核酸を添加することでドロプレットの抑制を試みた。そのためにまず、*FMR1* 遺伝子から転写される RNA 由来の配列（FMR1 RNA：$r(GGC)_4$）と *FMR1* 遺伝子から発現されるタンパク質である FMRP の RGG ドメイン由来のペプチド配列（RGG peptide：RRGDGRRRGGGGRGQGGRGRGGGFKGNDDHSRGGW）を用いてドロプレットのモデルシステムを構築した。次にモデルシステムを用いて、ドロプレットに対する G4 形成配列の相補鎖の効果を検討した。その結果、相補鎖配列が標的 RNA の構造を G4 から二重鎖へ遷移させることで、ドロプレットの形成を抑制することが示された。さらに、相補鎖と形成する二重鎖の熱力学的安定性が高いほど、ドロプレットの分解効率も高くなることが分かった。このように、液液相分離現象を制御可能なアンチセンス核酸は、疾患関連ドロプレットに対する新たな創薬モダリティとなると期待される。

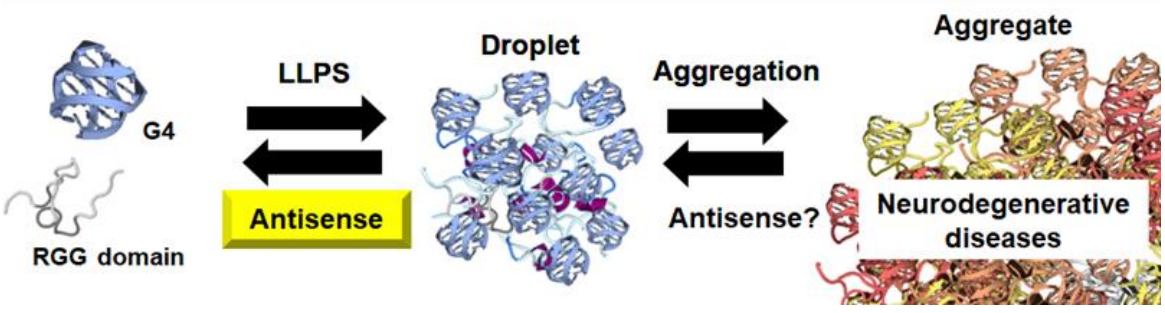


Figure. Droplets formed by RGG domain with G4 RNA and disassembled by antisense nucleotide.

1）K. Kohata *et al.*, *Biophys. Rev.*, **2020**, 12, 669.
2）A. T. Phan *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 18, 796.

がん細胞選択的細胞毒性を示す二核銅錯体の細胞死誘導機構の解明

○畑 真知[1]・浦野 泰臣[2]・人見 穣[1]・野口 範子[2]・小寺 政人[1]（[1]同大院理工、[2]同大院医生命）

Mechanism of cancer-cell-selective cytotoxicity by dicopper complexes (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University[1], Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University[2]) HATA, Machi[1]; URANO, Yasuomi[2]; HITOMI, Yutaka[1]; NOGUCHI, Noriko[2]; KODERA, Masahito[1]

抗がん剤として臨床利用されているブレオマイシンは DNA 標的部位をもち、投与後に Fe や Cu と錯形成して DNA 切断部位を形成する。DNA 標的部位と切断部位の組み合わせは、DNA 切断による細胞毒性の発現に効果的である。しかし、ブレオマイシンは副作用として肺毒性を伴う問題がある。この原因として、これらの抗がん剤は、がん細胞だけでなく正常細胞にも作用することが挙げられる。その為、副作用の軽減に向けて、がん細胞に対して選択的に作用する抗がん剤の開発が求められる。

これまでに我々は、がん細胞の微小環境(低 pH，高い活性酸素種濃度，高い抗酸化物質濃度)を利用して、がん細胞選択的に細胞毒性を発現する二核銅錯体を開発してきた。その中で、金属結合部位に 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen)を持つ Hbcamide 配位子の二核銅錯体[Cu_2(μ-OH)(bcamide)](ClO_4)$_2$ (**1**) (Fig 1)が H_2O_2 濃度に比例して DNA 切断を促進することを見出した[1]。錯体 **1** は、がん細胞に対して正常細胞よりも約 3 倍高い細胞毒性を示した。しかし、ヒト子宮頸癌由来のがん細胞である HeLa 細胞に対する **1** の IC_{50} 値は 1,000 μM 以上で、既存の抗がん剤よりも細胞毒性が低い。そこで、DNA 切断活性と細胞毒性の向上を目指し、cyclen を NH 基が 1 つ少ない 1,4,7-triazacyclononane (tacn)に置換した Hbtamide 配位子の二核銅錯体[Cu_2(μ-OAc)(OAc)$_2$(btamide)] (**2**) (Fig 1)を合成した。錯体 **2** は、様々ながん細胞への細胞毒性が錯体 **1** より 30 倍向上した。また、がん細胞に対して正常細胞よりも約 4 倍高い細胞毒性を示し、がん細胞選択性が向上した。この細胞毒性向上の理由を解明する為、in vitro 及び in vivo の測定を行った。その結果、金属錯体はがん細胞中の抗酸化物質との反応で酸素分子を活性化して活性酸素種を生成することがわかった。また、この生成した活性酸素種によりパイロトーシスと呼ばれる細胞死を引き起こしていることが示唆された。tacn-amide-tether 配位子の二核銅錯体 **2** は、がん細胞の微小環境を利用して高い細胞毒性を発現するので、がん細胞選択的な細胞毒性の発現が可能である。今回は、これらの機構について詳細について報告する。

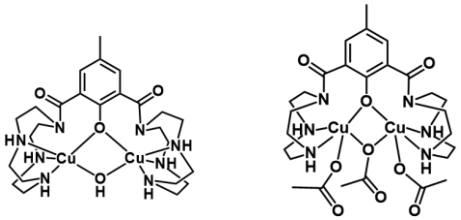


Fig 1. Chemical structures of **1** (left), **2** (right).

[1] Kadoya, Y.; Fukui, K.; Hata, M.; Miyano, R.; Hitomi, Y.; Yanagisawa, S.; Kubo, M.; Kodera, M. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 14294–14298.

RNA hacking によるフレキシブルな遺伝子発現増加技術

○五木結愛[1]・勝田陽介[1]・北村裕介[1]・萩原正規[2]・佐藤慎一[3]・井原敏博[1]（[1]熊本大学大学院先端科学研究部、[2]弘前大学大学院理工学研究部、[3]京都大学化学研究所）

Flexible gene expression increase technology by RNA hacking (Affiliation Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University[1], Faculty of Advance Science and Technology, Hirosaki University[2], Institute for Chemical Research, Kyoto University[3]) ITSUKI, Yua[1]; KATSUDA, Yousuke[1]; KITAMURA, Yusuke[1]; HAGIHARA, Masaki[2]; SATO, Shin-ichi[3]; IHARA, Toshihiro[1]

感染症などの外的因子以外の疾病原因を煎じ詰めれば「遺伝子機能が適切範囲を外れる」ことにある。つまり生体機能の維持に必要不可欠な遺伝子であったとしても正常範囲以上の機能を発揮すれば疾病と判定され、小分子化合物や時には siRNA 機構に基づく核酸医薬を利用することで機能や発現量を抑制する手法で治療が試みられる。

しかし、その逆である必要遺伝子の機能不全や発現不足を補填するような疾病治療法は手薄になっていると言わざるを得ない。確かにアロステリックサイトに結合し機能活性化を可能とする小分子など臨床シーンに登場する医薬品はわずかながら存在しているものの、未だ大きな開発スペースがあることは明らかである。

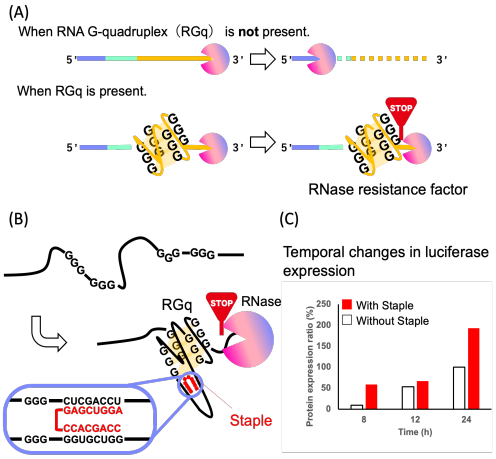


Fig.1 (A) 3 'UTR における RGq の役割。mRNA の 3'→5'RNase の耐性因子となり安定性をあげる。(B) Staple 核酸による RGq 形成は mRNA 安定化の要因となる。(C)Staple 核酸による3'UTR の RGq 形成によるルシフェラーゼ発現量の評価。Staple 核酸が存在する時タンパク質発現量が増加している。

このような状況下、遺伝子疾患に基づくたんぱく質補填技術に関しては mRNA ワクチンやスプライシング制御型アンチセンスオリゴ核酸（SSO）などの開発が進められており、東京医科歯科大学横田隆徳らのグループや名古屋大学阿部洋らのグループにおいても臨床応用が現実的になるような魅力的な研究が展開されている。

これに対し我々のグループでは Staple 核酸と名づけた短鎖核酸によって mRNA に RNA 高次構造の形成を誘導する RNA hacking（RNAh）という技術開発を試みている。その中でも、近年においては細胞内で非常に安定な高次構造である RNA G-quadruplex（RGq）の形成を誘起する研究開発に取り組んでいる。RGq は形成する位置によって様々な機能を発揮することが知られており、5'UTR や ORF では遺伝子発現抑制効果を示し 3'UTR では RNA 分解酵素の伸長を阻害するとされている（Fig.1A）。

そこで本発表において我々は Staple 核酸を利用した 3 'UTR での RGq 形成誘導、およびそれに伴うタンパク質発現の増加効果に関する検討を報告する（Fig.1B）。

本技術は全 mRNA に共通して存在する 3 'UTR に作用することでタンパク質発現の量のみを増加させるもので、技術が確立することであらゆる遺伝子を標的とした設計が可能な汎用性の高いものになる考えられ、現在の核酸医薬における新たな選択肢を提供できると期待している。

本発表において、同機序開発の現状について報告する（Fig.1C）。

鎖置換反応を利用した DNA 足場 BRET システムの動的制御

○高野史章・南出悠貴・仁木智哉・田花汐理・葛谷明紀（関西大化学生命工）

Dynamic control of DNA scaffolded BRET system using strand displacement reaction. (Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University.) TAKANO Fumiaki, MINAMIDE Yuki, NIKI Tomoya, TABANA Shiori, KUZUYA Akinori.

蛍光色素で標識を行う顕微鏡観察法では、強い励起光の照射に伴う蛍光色素の退色や細胞毒性が問題になる。発光タンパクを励起源として用いれば、これらの問題を回避することができる。しかし、発光タンパクの波長は基質に依存して固定されている。そこで、発光タンパクと蛍光タンパク質を適切なリンカーを介して融合タンパク質として波長変調することが考えられる [1]。この生体発光共鳴エネルギー移動 (BRET) システムでは、効率的なエネルギー異動が可能な反面、多大な労力を伴う遺伝子組換え実験によるリンカーの配列、長さの最適化が必要である。本研究では、DNA をリンカーとした BRET/FRET システムを活用した多色発光システムを開発した。まず DNA をハイブリダイゼーションさせることで BRET を誘導した。次いで、DNA に複数の蛍光色素を導入し、さらに長波長へ変調することができる。これにより RGB 発光が可能となり 3 つの DNA 複合体濃度を調整することでマルチカラーな発光を自在に選択できる系を実現した。また、ハイブリダイゼーション、鎖置換反応を利用することで色調の変化をリアルタイムで観察した。

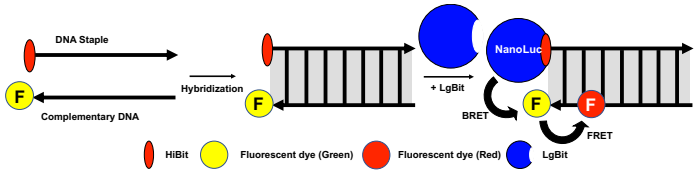


Fig 1. Multi-color bioluminescence using DNA as a linker.

NanoLuc (Nluc) 発光タンパクのスプリット体のうち、小断片側のペプチド鎖 (HiBit)を 5’末端に結合した HiBit-DNA を合成し、それと相補な FAM 修飾 DNA とハイブリダイゼーションさせた。その後、大断片側 (LgBit) 溶液を加え発光タンパクを DNA 末端で再構築した [2]。これに Furimazine を加えた結果、発光スペクトルおよび iPhone による撮影により BRET が観察された。このことは、二本鎖 DNA 末端で蛍光色素を発光タンパクの近傍に局在化させていることで BRET の誘導に成功した。また、赤色発光も Alexa594 を用いて同様に行った。より鮮明な緑色発光させるために、DNA に FAM を連続導入 (2FAM)したところ、分子同士の衝突により消光した。そこで、FAM 同士の衝突を考え、2 分子の FAM が二重螺旋の反対側に位置するように 4 塩基離して、2 分子目の FAM を鎖内に導入 (FAM Int FAM)した結果、予想通り FAM 蛍光を抑えることに成功した。結果として青色と緑色の発光強度比は FAM 1 分子の 2.9 と比較して 8.8 と大幅に向上した (Fig 2A)。より鮮明な赤色発光では 2 つのアプローチを試みた。1 つ目は FAM を一旦経由してその後、FAM と Alexa の間で FRET を起こさせる系。2 つ目は、2 分子の Alexa で直接エネルギーを受け取る系である。結果として FAM 経由で BRET と FRET を組み合わせることで、青色と赤色の発光強度比が向上し、より鮮明な赤色が得られた (Fig 2B)。RGB の 3 つの DNA 濃度を調整し、マルチカラーな発光として、白色および水色、黄色、ピンク色発光実現できたことから、3 つの DNA 濃度を調整するだけでマルチカラーな発光を自在に選択できることが確認できた。また、鎖置換反応により緑色から赤色へ変化している様子が発光スペクトルおよび動画から観察できた。

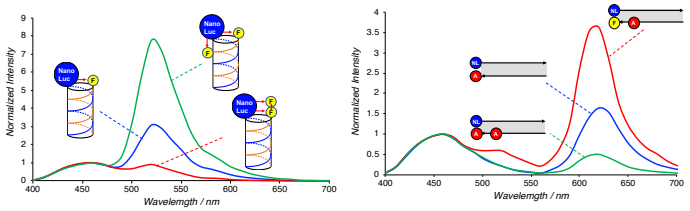


Fig 2. (A) Normalized intensity of (green) FAM Int FAM, (blue) FAM, (red) 2FAM. (B) Normalized intensity of (red) FAM Int Alexa594, (blue) Alexa594, (green) Alexa594 Int Alexa594.

1) S. Sihuai, et al., *Int. J. Mol. Sci*, **2016**, *17,* 1704.
2) A. S. Dixon, et al., *Anal. Chem*. **2016**, *11*, 400-408.

Poster Short Talk

Sat. Sep 10, 2022 6:00 PM - 6:30 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 9:00 AM - 9:30 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Short talks free discussions (P1-P20)

6:00 PM - 6:30 PM JST | 9:00 AM - 9:30 AM UTC

Short talks free discussions

Oral Session

Sat. Sep 10, 2022 9:20 AM - 10:40 AM JST | Sat. Sep 10, 2022 12:20 AM - 1:40 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Toshihisa Mizuno (Faculty of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

9:20 AM - 9:40 AM JST | 12:20 AM - 12:40 AM UTC

[1B-01] Sesamin oxidation mechanism of CYP92B14 related to lignan accumulation in seseme seeds

*Erisa Harada[1], Jun Murata[1], Kei Shiraishi[1], Hiromi Toyonaga[1], Eiichiro Ono[2], Masayuki P. Yamamoto[3], Manabu Horikawa[1] (1. Suntory foundation of Life sciences, 2. Research Institute, Suntory Global Innovation Center Ltd, 3. Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[1B-02] Molecular mechanisms of antibody recognition in immobilized systems and solution systems of FcγRIIIa receptor

*Satoru NAGATOISHI[1,2], Seisho Kinoshita[3], Daisuke Kuroda[3], Hirofumi Kosuge[3], Masato Kiyoshi[4], Akiko Ishii-Watabe[4], Yosuke Terao[5], Teruhiko Ide[5], Kouhei Tsumoto[1,2,3] (1. The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, 3. School of Engineering, The University of Tokyo, 4. National Institute of Health Sciences, 5. Tosoh Corporation)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[1B-03] Analyses and chemical regulation of crosstalk mechanism of ethylene- and jasmonate-related transcription factors

*Yousuke Takaoka[1], Ruiqi Liu[1], Kaho Suzuki[1], Minoru Ueda[1,2] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[1B-04] Identification of protein lipoylation system in hyperthermophilic archaea

*Takaaki Sato[1], Jian-qiang Jin[1], Shin-ichi Hachisuka[1], Tsuyoshi Fujiwara[1], Haruyuki Atomi[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

セサミン代謝酵素 CYP92B14 の酸化反応機構とゴマリグナン蓄積

○原田英里砂[1]・村田純[1]・白石慧[1]・豊永宏美[1]・小埜栄一郎[2]・山本将之[3]・堀川学[1]（[1]（公財）サントリー生命科学財団、[2]サントリーグローバルイノベーションセンター株式会社・研究部、[3]富山大学大学院理工学研究部）

Sesamin oxidation mechanism of CYP92B14 related to lignan accumulation in seseme seeds (Bioorganic Research Institute, Suntory Foundation for Life Sciences[1], Research Institute, Suntory Global Innovation Center Ltd[2], Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama[3]) HARADA, Erisa[1]; MURATA, Jun[1]; SHIRAISHI, Kei[1]; TOYONAGA, Hiromi[1]; ONO, Eiichiro[2]; YAMAMOTO, P. Masayuki[3]; HORIKAWA, Manabu[1]

ゴマ種子には１％程度のリグナンが蓄積し、その代表的なものとして、セサミン、セサミノール配糖体、セサモリン等のゴマリグナンが知られている。これらゴマリグナンは生体内で抗酸化性を示すばかりではなく、コレステロール低下や抗腫瘍作用などの生理機能成分としても注目されているが、ゴマ植物内における生合成経路の全容は明らかになっていない。近年、我々は、栽培ゴマ（*Sesamum indicum*）において、登熟期にセサミンをセサミノールとセサモリンへと代謝する酵素 SiCYP92B14 を同定した。この代謝反応では、CYP92B14 は芳香環を直接酸化するだけでなく、oxidative rearrangement of α-oxy-substituted aryl groups (ORA) の２種類の機構でセサミノールを生成するというユニークな特徴を示す。さらに、栽培種とは異なり、セサミノールの類縁体であるセサンゴリンが蓄積し、セサモリンがほぼ蓄積されていないゴマ野生種（*S. radiatum*）からもホモログ酵素 SrCYP92B14 を同定し、これら 2 種の CYP92B14 の機能解析により、CYP92B14 はゴマの登熟期においてセサミンを酸化し、その代謝物比を決定することに寄与する普遍的な酵素であることを提唱した。特に、活性中心近傍のヘリックスやヘムプロピオン酸近傍の残基は代謝物比を変えるのに関わっていた。さらに、今回、栽培種とリグナン蓄積が類似している野生種（*S. mulayanum*）、および、*S. radiatum* と同様にセサンゴリンを蓄積し、かつセサモリンも蓄積する野生種（*S. angustifolium*）からも CYP92B14 を同定した。特に、SrCYP92B14 と SangCYP92B14 の違いから、セサモリン生成に重要である残基が分かりつつある。また、CYP92B14 の ORA において新たな反応経路を見出し、ゴマにおいて CYP92B14 がセサミン代謝からリグナン蓄積量を規定する重要な役割を果たしていることが改めて示唆された。

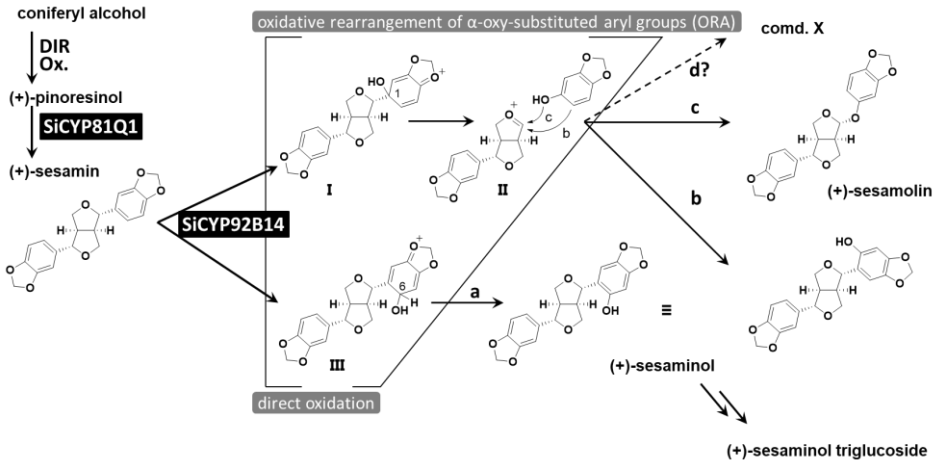


図 1 ゴマ栽培種で推測されるリグナン生合成経路

SangCYP92B14 では新たな反応経路により compound X が生成される（d）。

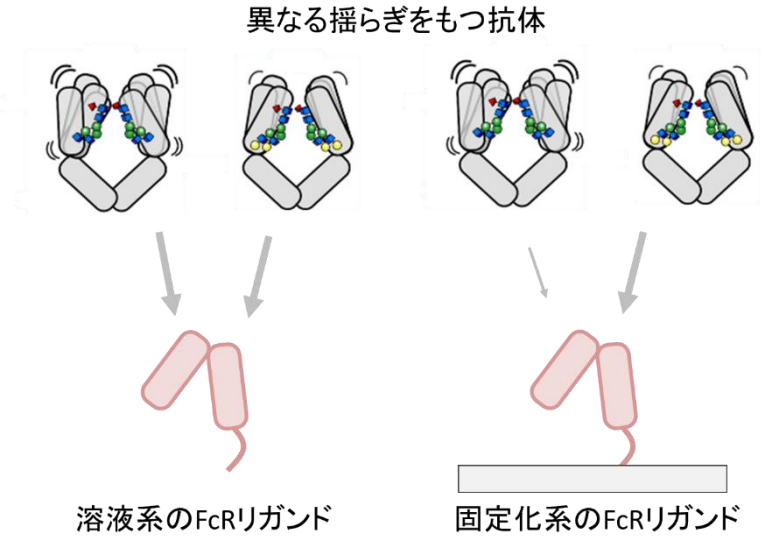
[Reference] 1. Murata, J. et al. *Nat. Commun.* **8**, 2155 (2017).
2. Harada, E. et al. *Plant J.* **104**, 1117-1128 (2020).

FcγRIIIa 受容体の固定化系と溶液系における抗体認識機構の解明

○長門石曉[1,2]・木下清晶[3]・黒田大祐[3]・小菅啓史[3]・木吉真人[4]・石井明子[4]・寺尾陽介[5]・井出輝彦[5]・津本浩平[1,2,3]（[1]東大医科研、[2]医薬基盤研、[3]東大院工、[4]国衛研、[5]東ソー）

Molecular mechanisms of antibody recognition in immobilized systems and solution systems of FcγRIIIa receptor (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo[1], National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition[2], School of Engineering, The University of Tokyo[3], National Institute of Health Sciences[4], Tosoh Corporation[5]) NAGATOISHI, Satoru[1,2]; KINOSHITA, Seisho[3]; KURODA, Daisuke[3]; KOSUGE, Hirofumi[3]; KIYOSHI, Masato[4]; ISHII-WATABE, Akiko[4]; TERAO, Yosuke[5]; IDE Teruhiko[5]; TSUMOTO Kouhei[1,2,3]

蛋白質の特異的な分子認識機能を活用して、固相に固定化することで標的とする分子をキャプチャーすることは、センシングや分離精製において強力な技術ツールである。我々は Fc 受容体の 1 つである FcγRIIIa をリガンドとしてカラムに固定化された FcR カラムを用いて、IgG 型抗体のヘテロな glycan 構造を分離するツールに着目した。我々は、この FcR リガンドが glycan 構造の違いによる糖鎖と Fc 間の相互作用様式の差異が Fc のコンフォメーションの揺らぎを変化させ、結果として FcR リガンドとの結合において結合エントロピーに差異を与えることを報告してきた（M. Kiyoshi, et al.）。この相互作用は、FcR リガンドをセンサー基板に固定化し、その熱力学的性質について表面プラズモン共鳴法 SPR を用いて解析されている。そこで、等温滴定型熱量計 ITC にて FcR リガンドと IgG の結合解析を行ったところ、glycan 構造の違いによる FcR との熱力学的な相互作用様式に有意な差異が観察されなかった。また反応熱プロファイルから、相互作用に関する速度論パラメータを解析したところ、これらも有意な差異は見られなかった。このことは、SPR における FcR リガンドの固定化系と、ITC における FcR リガンドの溶液系では、IgG-Fc に対する分子認識機構が異なることを示唆する。この相互作用様式の違いを明らかにするために、我々は分子動力学計算において FcR リガンドの一部の動きを強制的に制限し、動力学計算中における FcR リガンドのダイナミクス解析を行った。その結果、FcR リガンドの動きに制限をかけた場合と、制限をかけていない場合において、FcR リガンドの抗体認識部位近傍のコンフォメーションに差異が生じることが明らかとなった。以上の結果は、この動的な FcR リガンドの違いが、抗体識別機構と密接に関連していることを強く示唆するものである。



【参考文献】H. Kosuge, *et al.*, ***Biochemistry*** in press (2022), H. Kosuge, *et al.*, ***Biotechnol. Prog.*** 36, e3016 (2020). M. Kiyoshi, *et al.*, ***Sci. Rep.*** 8, 3955 (2018).

エチレンおよびジャスモン酸関連転写因子のクロストーク機構の解析と化学制御

○高岡　洋輔[1]・劉　瑞琦[1]・鈴木　華穂[1]・上田　実[1,2]（[1]東北大院理、[2]東北大院生命科学）

Analyses and chemical regulation of the crosstalk mechanism of ethylene- and jasmonate-related transcription factors (Graduate School of Science, Tohoku University[1], Graduate School of Life Sciences, Tohoku University[2]) TAKAOKA, Yousuke[1]; LIU, Ruiqi[1]; SUZUKI, Kaho[1]; UEDA, Minoru[1, 2]

植物ホルモンであるエチレン（ET）とジャスモン酸（JA, JA-Ile）は、植物の生長と虫害・病原菌耐性応答について拮抗的に作用することが知られている。以前の研究によるとこのクロストーク機構には、それぞれのシグナル伝達における主要転写因子 MYC2/3/4 と EIN3/EIL1 間の直接的なタンパク質間相互作用（PPI）などが関わっていることが報告されており、これらの転写因子が植物の生長と防御のトレードオフ関係を制御することが示唆されている[1,2,3]。

興味深いことにこれら主要転写因子の活性は、共に JA 共受容体の一つである転写リプレッサーJAZ によって抑制され、なおかつ同じ転写メディエーターMED25 によって活性化を受けることも示唆されていた（Figure 1）。ただし、これら PPI の詳細な相互作用様式や親和性などの詳細は不明な点も残されていた。そこで本研究では、これらの転写因子が引き起こす PPI として、活性化および再抑制に関わる結合ドメインの同定や、それぞれの PPI の親和性などの詳細な解析を行った。その結果、MYC2/3/4 および EIN3/EIL1 は、活性化の際に MED25 の同じ結合ドメイン（CMIDM）と競合的に結合していることが確認された（Figure 1）[4,5]。これらの知見は、ET および JA 間のクロストーク制御機構に新たな知見を与えるものと期待される。また最近我々は、その相互作用様式の違いを利用して、これら転写因子のうち一部を選択的に阻害するケミカルツールの開発にも着手したので、詳細を報告する。

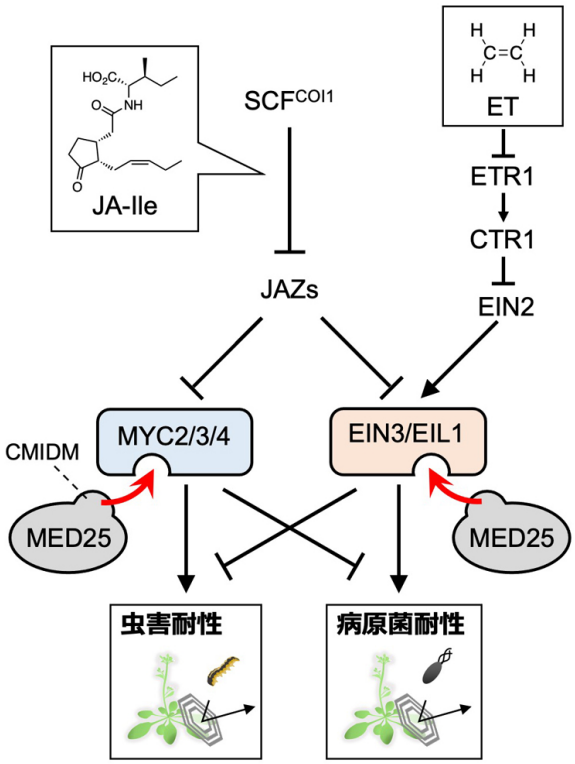


Figure 1. JA および ET 関連主要転写因子 MYC と EIN3/EIL1 が制御する植物生長と防御.

1) Song, S. *et al*. *Plant Cell*, **26**, 263 (2014). 2) Zhang, X., *et al. Plant Cell* **26**, 1105 (2014). 3) Howe, G.A. *et al. Annu. Rev. Plant Biol.* **69**, 20.1 (2018). 4) Takaoka, Y. *et al. J. Biol. Chem.*, **298**, 101504 (2022). 5) Liu, R, *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *in press*.

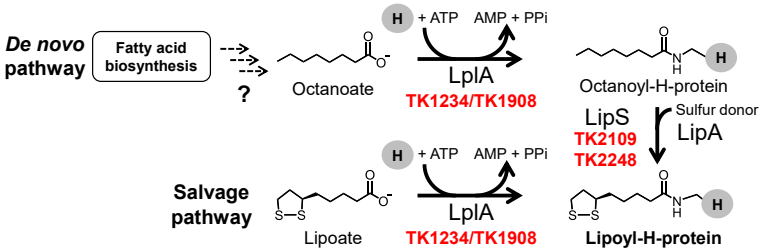
©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

超好熱性アーキアにおけるタンパク質リポイル化機構の解明

○佐藤喬章・Jian-qiang JIN・蜂須賀真一・藤原毅・跡見晴幸（京大院工）

Identification of protein lipoylation system in hyperthermophilic archaea (Graduate School of Engineering, Kyoto University) SATO, Takaaki; JIN, Jian-qiang; HACHISUKA, Shin-ichi; FUJIWARA, Tsuyoshi; ATOMI, Haruyuki

リポ酸は硫黄を含む脂肪酸であり（Fig. 1 左下）、glycine cleavage system (GCS)や 2-oxoacid dehydrogenase の補酵素として機能する。GCS はグリシン由来の炭素をテトラヒドロ葉酸などの C_1 キャリアーを介して他の化合物に供与することにより C_1 代謝で機能している。リポ酸は GCS を構成するタンパク質の一つ H-protein のリポ酸結合ドメイン内のリジン残基とアミド結合しており、グリシン由来の炭素を受け取って C_1 キャリアーへ受け渡している。例えば GCS から供給される炭素と水分子に由来するヒドロキシメチル基がグリシンに付加されてセリンを生成する。このように H-protein はリポ酸修飾（リポイル化）されて機能を発揮できるようになる。大腸菌における H-protein のリポイル化機構では、まず脂肪酸生合成の代謝中間体 octanoyl-acyl carrier protein (octanoyl-ACP)からオクタノイル基が octanoyl transferase (LipB)によって H-protein 上に転移され、octanoyl-H-protein（Fig. 1 右上）が生成する [1]。次に lipoyl synthase (LipA)がオクタノイル基の C_6 および C_8 位に硫黄を挿入してリポイル化が完了する。また、lipoate-protein ligase (LplA)が遊離リポ酸を H-protein 上に転移してリポイル化する salvage 経路も存在する（Fig. 1 下段）。一方、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を含む多数のアーキアは H-protein を有するにもかかわらず LipB および LipA と有意な相同性を示すホモログをゲノム上に持っていなかった。その反面、salvage 経路で機能すると考えられる LplA のホモログは存在した。



(Fig. 1) Predicted H-protein lipoylation system in *T. kodakarensis*.

そこで、本研究では超好熱性アーキア *T. kodakarensis* における H-protein のリポイル化機構の解明を目指した。まず新規 lipoyl synthase の候補として、ゲノム解析で biotin synthase と名付けられた TK2109・TK2248 に着目した。好熱好酸性アーキア *Acidianus hospitalis* W1 のゲノムにおいてこれらのホモログの近傍に H-protein が存在したからである。また、biotin synthase が触媒する反応は dethiobiotin の炭素鎖への硫黄の挿入で、lipoyl synthase が触媒する反応と類似していた。遺伝子破壊実験と組換え型タンパク質の解析の結果、TK2109/TK2248 は既知の lipoyl synthase である LipA とは 1 次構造が異なる新規な lipoyl synthase であることが同定でき、LipS と名付けた（Fig. 1）[2]。

次に LplA ホモログの機能解明を目指した。TK1234 と TK1908 は各々が既知 lipoate-protein ligase (LplA)の N および C 末端側の領域と相同性を示した。これら 2 つの組換え型タンパク質を両方添加すると、リポ酸もしくはオクタン酸を基質にした際にペプチドへの ligase 活性を示すことが明らかになった。また、意外なことに salvage 経路のみで機能していると考えられていた LplA の遺伝子破壊株はセリン要求性を示し、オクタン酸を H-protein 上に結合する octanoate-protein ligase 活性により H-protein の *de novo* リポイル化機構にも寄与することが示唆された（Fig. 1 上段）[3]。

1) J.E. Cronan, Microbiol. *Mol. Biol. Rev.* **80**, 429 (2016)
2) J.Q. Jin, S.I. Hachisuka, T. Sato, T. Fujiwara, H. Atomi, *Appl. Environ. Microbiol.* **86**, e01359-20 (2020)
3) J.Q. Jin, T. Sato, S.I. Hachisuka, H. Atomi, *Appl. Environ. Microbiol.* **88**, e0064422 (2022)

Invited Lecture

Sat. Sep 10, 2022 11:00 AM - 12:00 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 2:00 AM - 3:00 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Mechanistic study of rhodopsins

Chair: Katsutoshi Hori (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

11:00 AM - 12:00 PM JST | 2:00 AM - 3:00 AM UTC

[1IL-01] Mechanistic study of rhodopsins

*Hideki Kandori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

ロドプシンのメカニズム研究

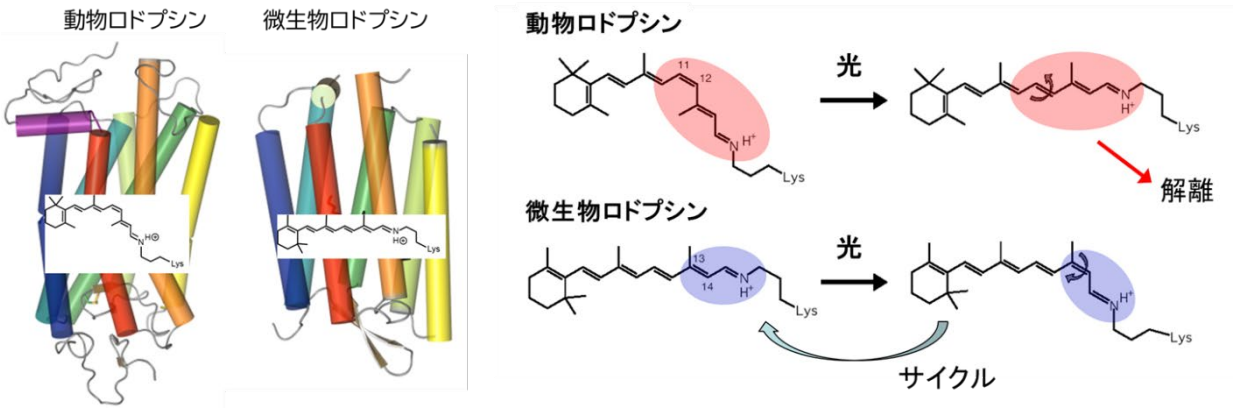
神取秀樹（名工大院工・オプトバイオテクノロジー研究センター）

Mechanistic study of rhodopsins (Nagoya Institute of Technology) KANDORI, Hideki

ロドプシンは 11-*cis* レチナールを結合する動物ロドプシンと all-*trans* レチナールを結合する微生物ロドプシンに分類される [1]。動物ロドプシンは視物質のように G タンパク質共役型受容体として光情報変換を担う一方、微生物ロドプシンはイオンポンプ、イオンチャネル、センサー、酵素と様々な機能を担う。微生物ロドプシンは脳機能の解明に期待される光遺伝学（optogenetics）のツールとして応用への期待も高い [2]。

私は大学院生のときに超高速分光を用いて視物質ロドプシンの光化学初期過程を研究して以来 [3]、一貫してロドプシンの分光研究を行っている。特に、精密な赤外分光計測をロドプシンに適用することで、内部結合水の重要性などロドプシンの機能をもたらす構造ダイナミクスを明らかにしてきた [4]。世界でロドプシンについて最もうるさい 3 人の中の 1 人として、ロドプシン機能の転換に加えて [5]、最近では新しいロドプシン機能の発見や創成にも関わってきた。新規ロドプシンの発見としては、光駆動ナトリウムポンプ [6]、内向きプロトンポンプ [7]、新規チャネルロドプシン [8]、酵素ロドプシン [9]、ベストロドプシン [10]、ヘリオロドプシン [11]などが挙げられ、新規ロドプシンの創成としては、光駆動カリウムポンプ [12]やセシウムポンプ [13]、長波長シフト変異体 [14]などが挙げられる。これらの新規ロドプシンは、光遺伝学や視覚再生、放射性セシウム回収などのツールとしても期待されている。

本シンポジウムでは、光がどのようにロドプシンに捉えられ、どのように多様な機能がもたらされるのか、明らかにするために行ってきた我々の研究について話題提供したい。



[1] Ernst *et al.* ***Chem. Rev.*** *114*, 126 (2014); 神取秀樹、***生化学*** *91*, 472 (2019). [2] Kandori, ***Bull. Chem. Soc. Jpn.*** *93*, 76 (2020); ***Optogenetics*** (Yawo, Kandori, Koizumi, Kageyama, Eds), Springer (2020). [3] 神取秀樹、***生物物理*** *60*, 127 (2020). [4] Kandori *et al.* ***J. Am. Chem. Soc.*** *122*, 11745 (2000); Shibata *et al.* ***J. Am. Chem. Soc.*** *125*, 13312 (2003); Katayama *et al.* ***Angew. Chem. Int. Ed.*** *49*, 891 (2010); Ito *et al.* ***J. Am. Chem. Soc.*** *136*, 3475 (2014); Kim *et al.* ***Nature*** *561*, 343 (2018); Kato *et al.* ***Nature*** *561*, 349 (2018); Kandori, ***Bull. Chem. Soc. Jpn.*** *93*, 76 (2020). [5] Sasaki *et al.* ***Science*** *269*, 73 (1995); Kawanabe *et al.* ***J. Am. Chem. Soc.*** *131*, 16439 (2009). [6] Inoue *et al.* ***Nat. Commun.*** *4*, 1678 (2013); Kandori *et al.* ***Chem. Rev.*** *118*, 10646 (2018). [7] Inoue *et al.* ***Nat. Commun.*** *7*, 13415 (2016); Bulzu *et al.* ***Nat. Microbiol.*** *4*, 1129 (2019); Inoue *et al.* ***Sci. Adv.*** *6*, eaaz2441 (2020). [8] Yamauchi *et al.* ***Biophys. Physicobiol.*** *14*, 57 (2017). [9] Yoshida *et al.* ***J. Biol. Chem.*** *292*, 75314 (2017); Ikuta *et al.* ***Nat. Commun.*** *11*, 5605 (2020). [10] Rozenberg *et al.* ***Nat. Struct. Mol. Biol.*** *29*, 592 (2022). [11] Pushkarev *et al.* ***Nature*** *558*, 595 (2018); Shihoya *et al.* ***Nature*** *574*, 132 (2019); Hososhima *et al.* ***eLife*** in press (2022). [12] Kato *et al.* ***Nature*** *521*, 48 (2015). [13] Konno *et al.* ***J. Phys. Chem. Lett.*** *7*, 51 (2016). [14] Inoue *et al.* ***Nat. Commun.*** *10*, 1993 (2019).

Invited Lecture

Sat. Sep 10, 2022 1:20 PM - 2:20 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Nano AI Biodevices and Quantum Life Sciences for Future Healthcare

Chair: Hiroshi Murakami (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

1:20 PM - 2:20 PM JST | 4:20 AM - 5:20 AM UTC

[1IL-02] Nano AI Biodevices and Quantum Life Sciences for Future Healthcare

*Yoshinobu Baba[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

ナノ AI バイオデバイス・量子生命科学が拓く未来医療

○馬場嘉信[1,2]（[1]名大院工、[2]量研量子生命研）

Nano AI Biodevices and Quantum Life Sciences for Future Healthcare (Department of Chemistry and Biotechnology, Nagoya University[1], Institute of Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology[2]) BABA, Yoshinobu[1,2]

2021 年度に開始された第 6 期科学技術・イノベーション基本計画は、我が国が目指すべき社会として「Society 5.0」を実現するために、量子技術、AI、バイオテクノロジー、マテリアル等の国家戦略を策定し、社会課題解決のための研究開発・社会実装を加速しています。

我々は、Society 5.0 実現のために、文科省・光・量子飛躍フラッグシッププログラム(Q-LEAP)量子生命科学拠点、マテリアル先端リサーチインフラ次世代バイオマテリアルハブ拠点、革新的イノベーション創出プログラム(COI STREAM)拠点等の国家プロジェクトにおいて、量子生命科学・ナノ AI バイオデバイスによるバイオ医工学の革新を目指した研究を推進しています[1-17]。本講演では、これらの研究成果のうち、量子センサ・ナノワイヤデバイスによる未病状態検出・健康長寿技術開発、ナノワイヤによるエクソソーム超高効率捕捉と尿中のエクソソーム miRNA 超高感度解析および AI がん診断、量子センサと臓器透明化による iPS 細胞の *intra vital* イメージング、量子・光免疫治療によるがんの低侵襲治療、AI ナノポアデバイスによる新型コロナウイルス等のウイルス・感染症超高感度・高精度識別など、量子生命科学・ナノ AI バイオデバイスの基礎研究から未来医療への展開に向けた最新の研究動向について分かりやすく解説します。

(1) N. Kaji, et al., *Chem. Soc. Rev.*, 39 (2010) 948.

(2) T. Yasui, et al., *Science Advances*, 3 (2017) e1701133.

(3) T. Yasui, et al., *ACS Nano*, 13 (2019) 2262.

(4) C. Wang, et al., *Nano Lett.*, 19 (2019) 2443-2449.

(5) Z. Xixi, et al., *Nano Lett.*, 20 (2020) 599.

(6) G. Zhang, et al., *J. Mat. Chem. A,* 9 (2021) 5815.

(7) Y. Kitano, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 13 (2021) 17316. Supplementary Cover

(8) M. Tsutui, et al., *Small Methods*, 5 (2021) 2100542. Inside Back Cover

(9) T. Yasui, et al., *Biosens. Bioelec.,* 194 (2021) 113589.

(10) L. Jiangyang, et al., *ACS Sensors* 7 (2022) 534. Supplementary Cover

(11) M. Tsutui, et al., *Science Advances*, 8 (2022) eabl7002.

(12) M. Luo, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 14 (2022) 34365.

(13) L. Jiangyang, et al., *ACS Sensors* 7 (2022) 534. Supplementary Cover

(14) S. Sotoma, et al., *Science Advances*, 7 (2021) eabd7888.

(15) G. Huang et al., *Nature Energy*, 6 (2021) 1176.

(16) Y. Saito, et al., *Science Advances*, (2022) 10.1126/sciadv.abj2667.

(17) T-H Xiao, et al., *Nature Communications,* 12 (2021) 3062.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Oral Session

Sat. Sep 10, 2022 2:40 PM - 3:40 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 5:40 AM - 6:40 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Inaba (Tottori University)

2:40 PM - 3:00 PM JST | 5:40 AM - 6:00 AM UTC

[1B-05] In vivo photoactivated proximity labeling for the identification of neurotransmitter receptor-proximal proteins

*Mikiko Takato[1], Seiji Sakamoto[1,2], Hiroshi Nonaka[1,2], Tomonori Tamura[1,2], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. JST ERATO)

3:00 PM - 3:20 PM JST | 6:00 AM - 6:20 AM UTC

[1B-06] Effect of Hydrophobic Aromatic Group on Amphiphilic Oligo(ethylene glycol)s as Lysozyme Stabilizers

*Wijak Yospanya[1], Kohei Sato[1], Kazushi Kinbara[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

3:20 PM - 3:40 PM JST | 6:20 AM - 6:40 AM UTC

[1B-07] Promotion of Protein Folding by Stepwise Redox Reactions

*Takahiro Muraoka[1,2], Shunsuke Okada[1], Masaki Okumura[3] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, 3. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

光駆動近接ラベル化法による生きたマウス脳内での神経伝達物質受容体近傍タンパク質の同定

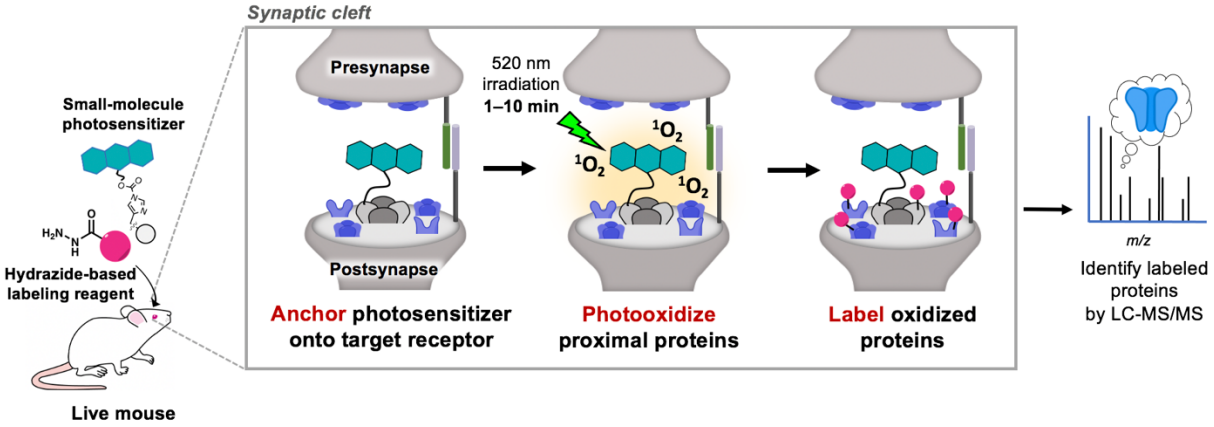
○髙遠美貴子[1]・坂本清志[1,2]・野中洋[1,2]・田村朋則[1]・浜地格[1,2]（[1]京大院工、[2]JST ERATO）

***In vivo* photoactivated proximity labeling for the identification of neurotransmitter receptor-proximal proteins**

(Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], JST ERATO[2]) TAKATO, Mikiko[1]; SAKAMOTO, Seiji[1,2]; NONAKA, Hiroshi[1,2]; TAMURA, Tomonori[1,2]; HAMACHI, Itaru[1,2]

神経伝達物質受容体は神経活動において中心的な役割を果たし、その機能および動態は様々なタンパク質との相互作用によってダイナミックに制御されている。そのため、神経伝達物質受容体と相互作用するタンパク質の同定は脳の高次機能を分子レベルで理解する上で重要である。近年、タンパク質間相互作用の探索法として近接ラベル化法（proximity labeling: PL 法）が注目を集めている。PL 法では、BioID や APEX などの酵素を生体内の標的タンパク質に融合し、短寿命の高反応性基質の生成により標的周辺のタンパク質を網羅的にラベル化し同定することができる。しかし、現行の PL 法は生きた動物個体内で利用できるものは限られ、またその時間分解能は低く、脳内のシナプス等で起こる分単位や秒単位のプロテオーム変動を追うことはできない。さらに、約 30 kDa の外因性タンパク質の融合が必要なため、本来起こり得るタンパク質間相互作用が阻害されてしまう懸念もある。

このような背景の下、我々は高い時間分解能を有するケミカルな PL 法の確立を目指して、光駆動近接ラベル化法を開発した。[1] 本手法では、内在性の標的タンパク質に小分子の光増感剤を特異的に修飾し、可視光を 1–10 分照射することで局所的に一重項酸素($^1O_2$)を発生させる。短寿命の $^1O_2$ は標的タンパク質の半径約数十 nm のタンパク質を酸化することが推定される。酸化タンパク質は求核性ラベル化剤によってビオチン標識し、LC-MS/MS 解析で同定することができる。本手法は光照射のオン／オフによってビオチン化反応の時間制御が可能であるため、標的周辺プロテオームの光照射時の「スナップショット」をとらえることができる。我々は本手法を生きたマウス脳内に適用し、記憶に関連する AMPA 型グルタミン酸受容体や抑制性神経伝達を担う $GABA_A$ 受容体の周辺タンパク質をわずか 1 分の光照射で複数同定することに成功した。今後は本手法の高い時間分解能を活かし、刺激に応答した神経伝達物質受容体周辺プロテオームの変動を追跡することを目指す。



1) T. Tamura, M. Takato, K. Shiono, I. Hamachi, *Chem. Lett.*, **49**, 145 (2020)

Effect of Hydrophobic Aromatic Group on Amphiphilic Oligo(ethylene glycol)s as Lysozyme Stabilizers

(School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology[1]) YOSPANYA, Wijak[1]; SATO, Kohei[1]; KINBARA, Kazushi[1]

The vast variety of enzymes have been used in different artificial and unnatural conditions (temperature, pH, other existing molecules, etc.). Therefore, enzyme stabilization is one of the most demanding studies in the field. In polymer chemistry, poly(ethylene glycol)s (PEGs) and their modifications are known as an effective protein stabilizer especially against heat-induced aggregations. In contrast, the short and monodisperse molecules generally require higher concentration, resulting in increasing viscosity, density and ionic strength of solutions, which can alter functions of proteins.

We are interested in developing oligo(ethylene glycol)s (OEGs) for protein thermal stabilization. Similar to PEG, OEG is a water-soluble ether with biocompatibility and low-cost production. Also, OEGs are non-ionic and neutral, preserving the original ionic properties of solution. Previously, we reported the lysozyme thermal aggregation suppression by amphiphilic OEG, composed of octaethyleneglycol as a hydrophilic unit and phenyl group as a hydrophobic unit. Interestingly, the compositions of hydrophilic and hydrophobic units are crucial. Neither octaethylene glycol (no hydrophobic unit) nor phenyl-appending tetraethylene glycol ($PhPEG_4$) (shorter hydrophilic unit) show comparable thermal aggregation suppression of lysozyme. (**Figure 1**)

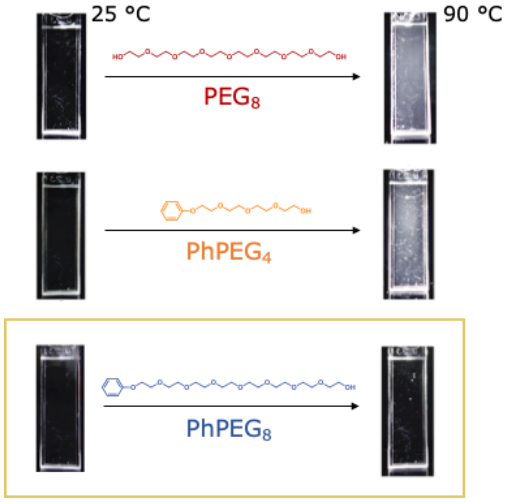


Figure 1. Photographs of lysozyme (0.037 mM) in PBS (pH 7.4) containing 1.5 mM of PEG_8, $PhPEG_4$ or $PhPEG_8$ in a 1 mm-thick quartz cell at 25 and 90 ºC. Only PhPEG8 inhibits lysozyme aggregation upon heating.

In this work, we attempt to discuss the optimization of hydrophobic aromatic group. Larger aromatic groups, such as naphthalene and triptycene, were examined. In addition, we also investigated the effect of multiple OEGs on phenyl group.

As a result, we succeeded improving the efficiency of the stabilizer. The required amount for the suppression reduced significantly. Especially, amphiphilic naphthalene OEGs show superior suppression properties over the others. The efficiency trend versus the size of aromatic group is ambiguous, and the effects of OEG length are not clear, unlike previously reported cases. This implies that beside the appropriate proportions between hydrophobic and hydrophilic units, there are still several unknown key factors to the optimal designs of amphiphilic OEGs for protein aggregation suppression. In addition, some amphiphiles, despite the promising suppression effect, have low water solubility, which is another important factor to consider in this application.

[1] Nabanita Sadhukhan, Takahiro Muraoka, Mihoko Ui, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto and Kazushi Kinbara. *Chem. Commun.,* 2015, **51**, 8457

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

多段階反応システムによるタンパク質フォールディング促進

○村岡貴博[1,2]・岡田隼輔[1]・奥村正樹[3]（[1]東京農工大院工、[2]神奈川県立産業技術総合研究所、[3]東北大学際研）

Promotion of Protein Folding by Stepwise Redox Reactions (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology [1], Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology [2], Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University [3]) MURAOKA, Takahiro[1]; OKADA, Shunsuke[2]; OKUMURA, Masaki[3]

タンパク質は医薬品などに用いられる機能性高分子であり、天然構造への折り畳み（フォールディング）によって機能を発現する。ジスルフィド(SS)結合形成を伴うフォールディングは酸化的フォールディングと呼ばれ、SS 結合を組むシステインペアによりタンパク質の立体構造は操作される。天然型システインペアによる SS 結合形成は天然構造を与える一方、非天然型システインペアによる SS 結合形成は非天然構造に導き、時に凝集体を形成する。SS 結合を有するタンパク質は抗体やインスリンなど非常に多く、そのフォールディング促進は、学術、産業分野において重要である。我々は近年、生体内で酸化的フォールディングを触媒する酵素 Protein Disulfide Isomerase (PDI)の活性サイトを模倣したフォールディング促進分子の開発に取り組んでいる [1)]。

細胞内では、複数酵素が段階的に翻訳タンパク質のフォールディングに作用し、促進していることが近年報告されている [2)]。主に次の 2 つの素反応の連携が示されている。

i) SS 結合導入の促進：ERp46 が触媒。粗雑ながらタンパク質に SS 結合を迅速に組み込む。

ii) SS 結合組替えの促進：PDI が触媒。非天然型 SS 結合を天然型へと組み替える。

タンパク質が高濃度に密集する細胞内環境で酵素による多段階反応が行われており、我々はこの仕組みが、疎水部を表面露出した還元変性タンパク質の凝集を抑え、迅速なフォールディングを進めることに効果的であると着想した。つまり、ERp46 の作用により基質タンパク質を迅速に折り畳み、表面疎水性を低下させた後、PDI の作用により天然構造形成に至る多段階反応触媒の機序である。そこで本研究では、ERp46 と PDI それぞれ類似の作用を示す化合物を開発し、それらを連携させることで、凝集しやすい濃縮環境においてもフォールディングを促進する反応システムの構築を目指した。

Bovine Pancreas Trypsin Inhibitor (BPTI)をモデルタンパク質に用い、逆相 HPLC 分析によりフォールディング過程をモニターした。ERp46 模倣分子を加えたところ、添加後 1 分で還元変性体に対して迅速に SS 結合を導入する作用が観察されたが、殆どは非天然型へのジスルフィド結合の導入であった。PDI 模倣分子を用いたところ、ERp46 模倣分子と比較しゆっくりと還元変性体が減少し、60 分時点の天然構造収率が 66%まで向上した。興味深いことに、ERp46 模倣分子と PDI 模倣分子を段階的に加えることで、天然構造の収率が 98%まで飛躍的に向上し、両化合物の連携による相乗効果が示された。

次に、BPTI 濃度を 10 倍増加させた濃縮環境におけるフォールディング促進効果を評価した。還元変性体に対する PDI 模倣分子のみの添加では、反応開始直後に凝集体が形成された一方、ERp46 模倣分子添加では凝集が抑えられた。その後、PDI 模倣分子を添加すると、天然構造の収率が大きく向上した。単一化合物を用いる従来法に比べ、高い天然構造形成の収率だけでなく、高濃度条件でもフォールディングを促進する点で、本多段階反応システムの高い効果が示された。

1) S. Okada, M. Matsusaki, K. Arai, Y. Hidaka, K. Inaba, M. Okumura, T. Muraoka, *Chem. Commun.*, **55**, 759 (2019).

2) R. Kojima, M. Okumura, S. Masui, S. Kanemura, M. Inoue, M. Saiki, H. Yamaguchi, T. Hikima, M. Suzuki, S. Akiyama, K. Inaba, *Structure*, **22**, 431 (2014).

Oral Session

Sat. Sep 10, 2022 3:50 PM - 4:50 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 6:50 AM - 7:50 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Ayana Yamagishi (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST))

3:50 PM - 4:10 PM JST | 6:50 AM - 7:10 AM UTC

[1B-08] New assay method for the enzymatic reaction with gaseous substrates by using Raman spectroscopy

*Koji Nishikawa[1], Yuka Nakagawa[2], Syota Inoue[1], Takafumi Chuji[1], Satoru Nakashima[3], Hideaki Ogata[1], Yasuteru Shigeta[4], Katsuyuki Fukutani[5], Yoshiki Higuchi[1] (1. Graduate School of Science, University of Hyogo, 2. Kyoto University, 3. Nara Institute of Science and Technology, 4. Tsukuba University, 5. Institute of Industrial Science, The University of Tokyo)

4:10 PM - 4:30 PM JST | 7:10 AM - 7:30 AM UTC

[1B-09] Construction of in-cell protein crystals encapsulating artificial protein needles

*Satoshi Abe[1], Thuc Toan Pham[1], Takafumi Ueno[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

4:30 PM - 4:50 PM JST | 7:30 AM - 7:50 AM UTC

[1B-10] Monobodies with neutralizing activity against SARS-CoV-2 Omicron

*Taishi Kondo[1], Kazuhiro Matsuoka[2], Tomoshige Fujino[1], Shun Umemoto[1], Gosuke Hayashi[1], Yasumasa Iwatani[2,3], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Naoya University, 2. Department of Infectious Diseases and Immunology, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, 3. Division of Basic Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

Raman 分光法を用いたガス状分子を基質とする酵素反応の新規活性測定法

○西川幸志[1]・中川由佳[2]・井上翔太[1]・中地隆文[1]・中島聡[3]・緒方英明[1]・重田育照[4]・福谷克之[5]・樋口芳樹[1]（[1]兵庫県大院理、[2]京都大、[3]奈良先端大、[4]筑波大、[5]東大生研）

New assay method for the enzymatic reaction with gaseous substrates by using Raman spectroscopy

(Graduate School of Science, University of Hyogo[1], Kyoto University[2], Nara Institute of Science and Technology[3], Tsukuba University[4], Institute of Industrial Science, The University of Tokyo[5]) NISHIKAWA, Koji[1]; NAKAGAWA, Yuka[2]; INOUE Syota[1]; CHUJI Takafumi[1]; NAKASHIMA Satoru[3]; OGATA Hideaki[1]; SHIGETA Yasuteru[4]; FUKUTANI Katsuyuki[5]; HIGUCHI Yoshiki[1]

ヒドロゲナーゼは、常温・常圧で水素分子の生成・分解を触媒する酵素である。ヒドロゲナーゼの触媒反応機構を明らかにするため、X 線結晶構造解析や各種分光学的手法を用いて構造生物学的な研究が行われてきている。また、本酵素によって触媒される H_3O^+（D_3O^+）と D_2（H_2）の間の H/D 同位体交換反応や、*para*-H_2（D_2）と *ortho*-H_2（D_2）の間の核スピン異性体変換反応という非生理的な反応も研究されている。これらの反応は、ガスクロマトグラフィー（GC）や質量分析（MS）、あるいはそれらの組み合わせ（GC/MS）により測定されるのが一般的である。これらの測定技術は確立されたものであるが、反応系から一定時間ごとに気相をサンプリングする必要があるため、操作のたびに気相の圧力変化が生じてしまう。一方、ラマン分光法では、気相のサンプリングを行わずに反応系のガス組成を測定することができるため、ラマン分光法を用いると、非侵襲的に反応の時間変化を連続的に追跡することができる。そこで、ガス状分子を基質とする酵素反応の測定に特化したラマン分光装置を開発した。この装置を用いて、D_2/H_2O 系において硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F 株由来の[NiFe]ヒドロゲナーゼが触媒する H/D 同位体交換反応を測定した。D_2 と H_2 のラマンピーク強度の時間変化は、それぞれ指数関数的な単調減少及び増加の形であった。また、HD の初期生成速度（$0.0018 \pm 0.0002\ min^{-1}$）は H_2 のそれ（$0.0022 \pm 0.0003\ min^{-1}$）とほぼ等しい値と見積もられた。これらの結果から、反応系では $D_2 + H^+ \rightarrow HD + D^+$ という単一の交換反応だけでなく、$D_2 + 2H^+ \rightarrow H_2 + 2D^+$ という二重交換反応が起きていることが巨視的に確認された。ここで、D_2/H_2O 系での H/D 交換反応の時間変化の解析には、Leroux らが提案した反応モデル [1]を用いた。このモデルでは、活性部位での H/D 交換反応の速度定数（k）、基質のトラップ・放出の速度定数（k_{in} と k_{out}）が定義されている。いくつかの酵素濃度における D_2、HD、H_2 の時間変化を、モデル式から得られた解析解に当てはめ、k と k_{out} の比を求めた。k/k_{out} の値(1.8-2.1)は 2-20 μM の範囲の酵素濃度においてほぼ一定であった。

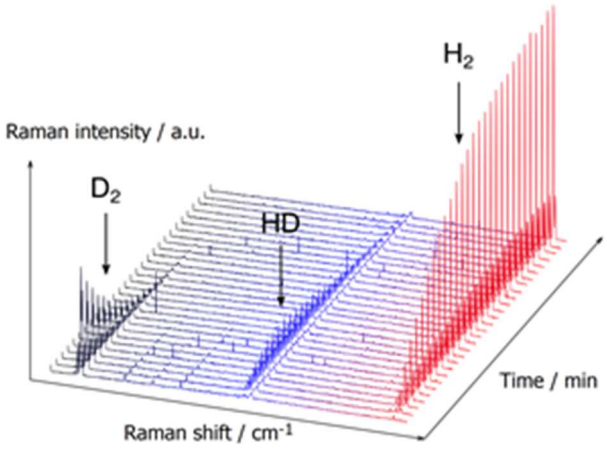


Fig.1. The time course of D_2, HD and H_2 catalyzed by hydrogenase in the D_2/H_2O reaction system.

1) F. Leroux, S. Dementin, B. Burlat, L. Cournac, A. Volbeda, S. Champ, L. Martin, B. Guigliarelli, P. Bertrand, J. Fontecilla-Camps, M. Rousset, C. Léger. *Proc Natl Acad Sci*. **105(32)**, 11188-11193 (2008)

人工タンパク質針を内包した細胞内タンパク質結晶材料の創成

○安部　聡・Thuc Toan Pham・上野隆史（東工大生命理工）

Construction of in-cell protein crystals encapsulating artificial protein needles (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) Satoshi Abe; Thuc Toan Pham; Takafumi Ueno

【序論】細胞内で自律的に形成されるタンパク質結晶は、ウイルス粒子の長期保存、固体触媒など様々な機能を発現している[1]。昆虫細胞で結晶化する多角体結晶（図 1a）は、結晶化する際にウイルス表面のタンパク質との多点的な相互作用によりウイルス粒子を包埋しながら結晶を形成する。これまで、我々は、ウイルス粒子の代わりに酵素や機能性タンパク質を多角体タンパク質と共発現することにより、多角体結晶へ外来タンパク質を包埋した固体材料を創出してきた[2]。しかしながら、タンパク質単量体の固定化にとどまっており、ウイルスのようなタンパク質集合体の内包制御は、未だ困難である。そこで、本研究では、設計性の高いタンパク質集合体である、針状タンパク質（Protein Needle, PN）を固定化タンパク質のタグとして用いることにより、多角体結晶に目的タンパク質を高い収率で内包する手法を開発した（Figure 1a-c）。PN は、外来タンパク質を融合しても集合体構造を形成するため、多角体タンパク質との多点相互作用により、目的タンパク質の効率的な内包が期待できる。本発表では、本手法を実証するために、SfGFP-PN 融合タンパク質を設計し、多角体への内包を試みた。

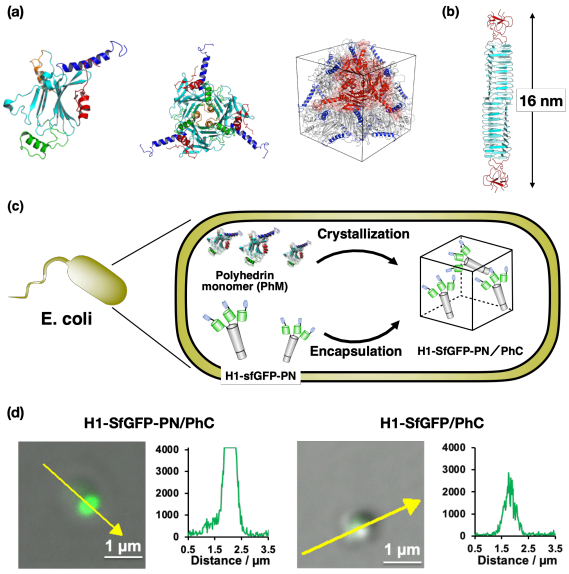


Figure 1. (a) 多角体結晶の単量体、三量体、ユニットセル構造、(b)Protein Needle の結晶構造、(c)H1-sfGFP-PN/PhC の細胞内合成、(d) H1-sfGFP-PN/PhC、H1-sfGFP/PhC の共焦点顕微鏡像と蛍光強度

【実験】多角体結晶への固定化をより効率よくするために、多角体タンパク質の N 末端に位置する H1 ヘリックスを SfGFP-PN の N 末端に融合した、H1-sfGFP-PN を作成した。H1-sfGFP-PN と多角体タンパク質を大腸菌で共発現し、H1-sfGFP-PN を内包した多角体結晶を合成した。合成時の温度変化により、内包量を検討した。結晶形成と H1-sfGFP-PN の固定化量の確認は、SDS-PAGE、NATIVE-PAGE、SEM、SAXS、X 線回折、共焦点顕微鏡観察により行なった。

【結果】H1-sfGFP-PN と多角体タンパク質を大腸菌内で共発現した結果、H1-sfGFP-PN が内包された多角体結晶が合成され、H1-sfGFP と比較すると、はるかに高い内包量を示した(Figure 1d)。結晶を溶解した溶液の NATIGE-PAGE の結果、H1-sfGFP-PN がトライマーやトライマーダイマーの集合体として内包されることがわかった。この結果から PN の集合構造が多角体結晶への内包を促進していることが示された。また、SAXS や X 線回折実験により、H1-sfGFP-PN を内包しても多角体は、結晶性を維持していることが示された。さらに、合成温度により、多角体結晶の結晶性と H1-sfGFP の合成量を制御可能なことを見出した。以上の結果から、本技術は、効率よく外来タンパク質をタンパク質結晶に固定化可能なため、ウイルス様タンパク質ケージの内包・保存・放出など、ワクチンやドラッグデリバリーに向けた、拡張性の高い技術として期待される。

【参考文献】

(1) R. Schonherr *et al. Biol. Chem.* **2018**, 399, 751., C. N. Mudogo *et al. Traffic.* **2020**, 21, 220.
(2) S. Abe *et al. Adv. Mater.* **2015**, 27, 7951., T. K. Nguyen *et al. ACS Appl. Nano Mater.* **2021**, 4, 1672.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

SARS-CoV-2 Omicron 株に対する人工抗体の創製

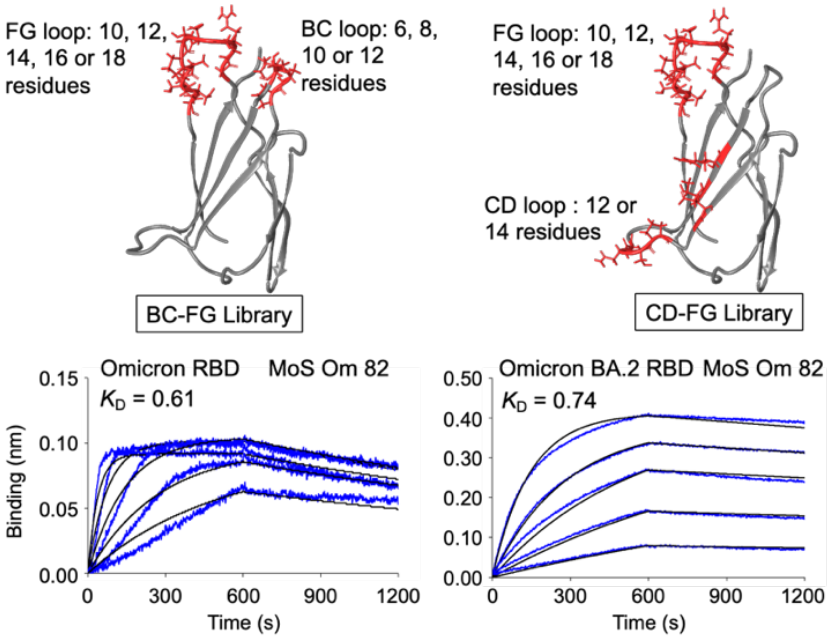
○近藤太志[1]・松岡和弘[2]・藤野公茂[1]・梅本駿[1]・林剛介[1]・岩谷靖雅[2,3]・村上裕[1,4]（[1]名大院工、[2]名医セ、[3]名大院医、[4]名大ナノライフ）

Monobodies with neutralizing activity against SARS-CoV-2 Omicron (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Department of Infectious Diseases and Immunology, Clinical Research Center, National Hospital Organization Nagoya Medical Center[2], Division of Basic Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University[3], Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University[4]) KONDO, Taishi[1]; MATSUOKA, Kazuhiro[2]; FUJINO, Tomoshige[1]; UMEMOTO, Shun[1]; HAYASHI, Gosuke[1]; IWATANI, Yasumasa[2,3]; MURAKAMI, Hiroshi[1,4]

2019 年に出現した新型コロナウイルスは、膜表面上のスパイクタンパク質を用いて細胞に侵入する。そのため、スパイクタンパク質を標的にした中和抗体薬やスパイクタンパク質に対する抗体を誘導するワクチンが既に開発されており大きな効果を発揮している。しかし、新たに出現した多数の変異を持つ Omicron 株に対しては、多くの抗体医薬品やワクチンによって誘導された抗体の効果は低下した。このような状況から、Omicron 株に対して有効な中和抗体の開発が重要となっている。

2020 年 4 月に我々は分子量が約 10 kDa と小さく、大腸菌で発現効率の良い monobody 骨格を用いて武漢株の新型コロナウイルスのスパイクタンパク質に 10 pM 以下の解離定数を持つ人工抗体 C4AM2 の取得に成功した。また、C4AM2 は武漢株に対して IC_{50} = 46 pM、変異株 Alpha, Beta, Gamma, Delta 株に対し IC_{50} = 77~590 pM で感染を防ぐことができた[1,2]。

本研究では、まず C4AM2 の Omicron 株の RBD に対する親和性を測定した。その結果、親和性が大きく低下していた。そこで BC-FG ライブラリに加え、CD ループと FG ループ、さらに β シートの一部もランダム化した CD-FG ライブラリを用いて、TRAP 提示法により新たにセレクションを行なった。標的には Omicron 株の RBD およびスパイクタンパク質を用いて、7 ラウンドの選択を行ない、得られた cDNA ライブラリを次世代シーケンサで配列解析を行なった。また、得られたクローンを大腸菌で発現、精製しバイオレイヤー干渉法で Omicron と BA.2 (B.1.1.529.2) の RBD について解離定数を測定した。その結果、Omicron RBD に対しては 17 種類のクローンが K_D = 0.09~12 nM で結合した。その中の、9 種類のクローンは BA.2 RBD について同程度の親和性を維持していた。また、中和活性を測定した結果、7 種類のクローンが Omicron 株と Omicron BA.2 株を中和することができた。特に、Mos Om82 は解離定数が Omicron RBD と BA.2 RBD について K_D = 0.61, 0.74 nM と強く結合し、Omicron 株と Omicron BA.2 株それぞれを IC_{50} = 0.41, 0.49 nM (5.6, 6.7 ng/mL)で感染を阻害した。



(1) Kondo, T., *et al*, Sci. Adv. 2020, 6 (42), eabd3916. (2) Kondo, T., *et al*, Life Science Alliance 2022, 5 (6) e202101322

Poster Short Talk

Sat. Sep 10, 2022 5:00 PM - 6:00 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 8:00 AM - 9:00 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Poster short talks (P21-P40)

[P21] Construction of enzyme complexes for fast degradation of plastics

*Minami Sawada[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P22] Chemoproteomic Identification of Blue Light-Damaged Proteins

*Kohei Toh[1], Motonari Uesugi[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P23] Studies on the association character and structural analysis of tetrameric antibody light chain

*Takahiro Sakai[1], Fitriana Wahyu[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Shohei Yamaguchi[1], Emi Hifumi[2], Taizo Uda[3], Hideaki Ogata[4], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Institute for Research Management, Oita University, 3. Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies, 4. Graduate School of Science, University of Hyogo)

[P24] Analysis of Mechanical Stability of a Cell Surface Protein AtaA_Chead by Molecular Dynamics Simulation

*Jun Sasahara[1], Takayuki Hashimoto[1], Kazushi Fujimoto[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P25] Creation of a bacterial-size liposome with the leaflets of asymmetric protein composition for artificial bacteria.

*Kosaku Noba[1], Shogo Yoshimoto[1], Yoshikazu Tanaka[2], Tomoaki Matsuura[3], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya university, 2. Department of Molecular and Chemical Life Sciences, Tohoku University, 3. Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology)

[P26] Development of small molecule-responsive synthetic protein clustering systems

*Yoko Fukaya[1], Masaru Yoshikawa[1], Sachio Suzuki[1], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P27] Trafficking studies of intracellular and cell surface AMAP-type glutamate receptors using ligand-directed chemistry.

*Yutaro Sugihara[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2,3], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University, 3. ERATO, JST)

[P28] New caged compounds for site-specific activation of AMPA-type glutamate receptors

*Kyohei Soga[1], Toshiaki Furuta[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Department of Biomolecular Science, Toho University)

[P29] Single-molecule toughness analysis of the C-terminal passenger domain of AtaA using AFM

*Amane Kato[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P30] Acceleration of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition induced by antibody-antigen interaction

*Kentaro Nishiyama[1], Hiroki Akiba[1,2], Satoshi Nagata[2], Kouhei Tsumoto[2], Haruhiko Kamada[1,2], Hiroaki Ohno[1,2] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)

[P31] Understanding the catalytic behavior of cross-linking enzyme under crowded condition

*Ryo Sato[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P32] Development of photochromic ligands for quantitative and photo-reversible protein labeling

*Satoshi Hamaguchi[1], Toshiyuki Kowada[1,2,3], Takato Mashita[2], Himadri S. Sarkar[3], Toshitaka Matsui[1,2,3], Shin Mizukami[1,2,3] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Graduate School of Science, Tohoku University, 3. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University)

[P33] Construction and structural analysis of a three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion

*Kodai Fujiwara[1], Haruki Onishi[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Masaru Yamanaka[1], Kento Yonezawa[1], Hironari Kamikubo[1], Takayuki Uchihashi[2], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P34] NMR analysis of transient unfolding/refolding protein structures by encapsulation in a self-assembled cage

*Anouk Rossen[1], Takahiro Nakama[1], Maho Yagi-Utsumi[2], Daishi Fujita[3], Koichi Kato[2], Makoto Fujita[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Molecular Science (IMS), 3. Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University)

[P35] Development of novel fluorescent biosensors for visualizing plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate

*Moeka Ajiki[1], Masaru Yoshikawa[1], Fubito Nakatsu[2], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 2. Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University)

[P36] Construction of Pd(II)-containing Artificial Metalloenzymes Using Scaffolds of Steroid Metabolizing Enzymes and their Application to Intramolecular Hydroarylation

*Haruka Nishiwaki[1], Shunsuke Kato[1], Takashi Hayashi[1] (1. Osaka University)

[P37] Preparation of Hydrogel Containing a Protein Unit Modified by Two Different Fluorophores

*Hiroki Innami[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P38] Development of Artificial Antibody for Antibody-anchored Natural Killer Cell Therapy

*Chihiro Tanaka[1], Tomoshige Fujino[1], Yui Harada[2,3], Yoshikazu Yonemitsu[2,3], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Pharmaceutical Sciences Kyushu University, 3. R&D Laboratory for Innovative Biotherapeutics Science, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P39] Chemogenetic activation of adenosine A_{2A} receptors focusing on structural information.

*Midori Makino[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P40] Exploration of orthogonal activation of mGlu1 using Pd complexes having different ligands.

*Suzuka Kurakake[1], Yuta Miura[1], Akinobu Senoo[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

プラスチックの分解速度向上を目指した酵素複合体の構築

〇澤田美波・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Construction of enzyme complexes for fast degradation of plastics (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SAWADA, Minami; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

環境負荷の低いプラスチックの処理方法として酵素 による分解が注目されている。この方法ではプラスチックをモノマーに分解し、それを原料として再びプラスチックを生産できるため、温和なケミカルリサイクルとして循環型社会の実現への寄与が期待されている。しかし、これら酵素によるプラスチックの分解は著しく遅いという問題がある。

自然界に目を向けてみると、プラスチックと同じく固相基質であるセルロースは酵素セルラーゼによって分解されている。セルラーゼはセルロースと結合する部位を持ち、さらにはセルロソームとして複合体化することで酵素が基質の表面に局在化し高い分解能力を示すことが知られている [1]。一方、生物にとって比較的新しい基質であるプラスチックを分解できる酵素にはこのような仕組みはない。従って、何らかの方法で酵素を基質であるプラスチック表面近傍に濃縮できれば、分解速度を向上できると考えられる。そこで本研究ではプラスチックを高速分解する酵素複合体の構築を目的として、①プラスチック分解酵素の複数連結、②プラスチック表面に対して親和性を持つタンパク質との連結、について検討した。

本研究では、プラスチック分解酵素にはポリエチレンテレフタレート （PET）加水分解酵素のひとつである LCC [2] を、プラスチック表面に対して親和性を持つタンパク質には当研究室で発見された高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 由来のファイバータンパク質 AtaA [3] のリコンビナントタンパク質を、酵素の連結には混合するだけで自発的に特異的な架橋反応が起こる SpyTag/SpyCatcher システム [4] を、モデルとして利用した。まず SpyCatcher が 5 個つながった（SpyCatcher）$_5$、SpyTag を融合した LCC、SpyCatcher を融合した AtaA をそれぞれ大腸菌で生産、精製した（Fig. 1）。これらをエッペン中で混合し SDS-PAGE に供したところ SpyTag/SpyCatcher 間の連結に伴う電気泳動移動度の減少が観察され、①（SpyCatcher）$_5$を足場に LCC が複数連結した複合体と②SpyCatcher を介して LCC と AtaA が連結した複合体の構築がそれぞれ確認できた。当日は、これら複合体の活性についても報告する。

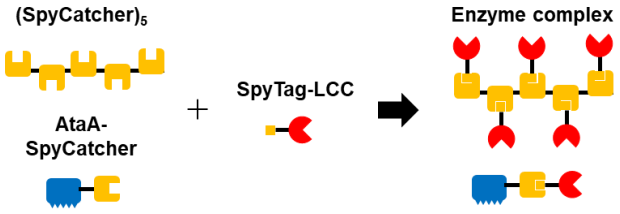


Fig. 1. Construction of enzyme complexes using SpyTag/SpyCatcher.

1) E.A. Bayer *et al.*, *Annual Review of Microbiology*, 58, 521-554 (2004)
2) V. Tournier *et al.*, *Nature*, 580, 216-219 (2020)
3) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLOS ONE*, 7, e48830 (2012)
4) A. H. Keeble *et al.*, *Angewandte Chemie. International Edition*, 56(52), 16521-16525

青色光照射により酸化される細胞内タンパク質の網羅解明

○藤浩平[1]・上杉志成[1]（[1]京都大学化学研究所）

Chemoproteomic Identification of Blue Light-Damaged Proteins (*Institute for Chemical Research, Kyoto University* [1]) Toh Kohei[1]; Uesugi Motonari[2]

光照射は一般的にヒトの細胞にとって有害である。可視光はオプトジェネティクスや超解像イメージングなどの生物科学分野に多く利用されてきたが、その照射は細胞の機能障害を引き起こす可能性がある。特に可視光領域の青色光(400-500 nm)は比較的高いエネルギーをもち、細胞の老化や加齢に伴う病態の発生と関連するため重要である。青色光を生細胞に照射すると、内因性光増感剤から活性酸素の一つである一重項酸素($^1O_2$)が発生し、核酸、脂質、タンパク質が酸化される。核酸や脂質に関しては、どのような特徴を持つものが酸化ターゲットになっているのか、これまでに集中的に解明されてきた。一方で、タンパク質に関しては、$^1O_2$ により酸化されるアミノ酸残基がチロシン、ヒスチジン、トリプトファン、メチオニン、システインと分かっているものの、どのようなタンパク質が実際に細胞内で酸化されているのかは未解明であった。$^1O_2$ によるタンパク質の酸化は細胞内シグナルに様々な変化を与えるため、その全貌を明らかにしていくことは、青色光照射による細胞影響を考察する上で重要と考えられる。

ごく最近、窒素を化学構造中に含む化学プローブが、$^1O_2$ に酸化されたタンパク質に結合すると報告されている [1,2]。我々はこの知見をもとに、適切な窒素含有化学プローブを生細胞に加えれば、青色光照射により酸化されたタンパク質を捕捉できるのではないかと考えた(図 1a)。そこで様々なプローブを検討した結果、プロパルギルアミン(PA)を用いることで、青色光照射により酸化された細胞内タンパク質を効率よく捕捉できることがわかった。PA は化学構造中にアルキン基を含むため、アジド基を有するビオチンとクリック反応を行うことで、酸化されたタンパク質をアビジンビースで濃縮精製することができる。濃縮精製したタンパク質の網羅解析を行ったところ、角膜内皮細胞を含む様々な哺乳類細胞において、細胞接着や細胞移動に関わるタンパク質である Integrin β1 が突出して酸化されていることがわかった。さらに酸化された Integrin β1 の機能を解析した結果、Integrin β1 の構造変化、それに伴う細胞接着機能低下、インテグリン下流シグナルの不活性化が確認された(図 1b)。これらの結果より、本研究で開発した方法は、青色光照射により酸化され、機能を失ったタンパク質を解明できる方法として有用であることが示唆された。ポスターセッションでは、より詳細な実験手法と今後の展開について議論する。

1) Tamura, T.; Takato, M.; Shiono, K. and Hamachi, I. *Chem. Lett.*, **2020**, *49*, 145.
2) Tsushima, M.; Sato, S.; Miura, K.; Niwa, T.; Taguchi, H. and Nakamura, H. *Chem. Commun.*, **2022**, *58*, 1926.

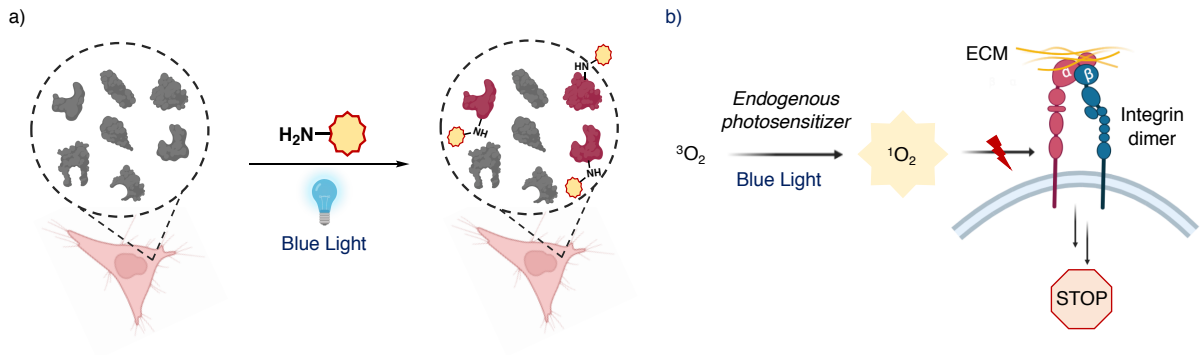


図 1 化学プローブを用いる青色光照射により酸化されるタンパク質の網羅的解析

4 量化する抗体軽鎖の会合挙動と構造解析に関する研究

○酒井 隆裕[1]・Wahyu Fitriana[1]・真島 剛史[1]・小林 直也[1]・山口 将平[1]・一二三 恵美[2]・宇田 泰三[3]・緒方 英明[4]・廣田 俊[1]（[1]奈良先端大先端科技、[2]大分大研究マネジメント機構、[3]九州先端研ナノテク、[4]兵庫県大院理）

Studies on the association character and structural analysis of tetrameric antibody light chain

(Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology[1], Institute for Research Management, Oita University[2], Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies[3], Graduate School of Science, University of Hyogo[4]) SAKAI, Takahiro[1]; FITRIANA, Wahyu[1]; MASHIMA, Tsuyoshi[1]; KOBAYASHI, Naoya[1]; YAMAGUCHI, Shohei[1]; HIFUMI, Emi[2]; UDA, Taizo[3]; OGATA, Hideaki[4]; HIROTA, Shun[1]

【序論】抗体の中には標的分子を分解する酵素活性を有する抗体酵素が存在する。また、抗体酵素には多量化により活性が向上するものがある。本研究では、酵素活性を有し多量化する抗体軽鎖#4 に着目し、重鎖とジスルフィド結合を形成する Cys 残基を Ala に置換した抗体軽鎖#4C214A を調製し、その会合挙動を調べた (Fig. 1)。さらに、#4C214A の定常領域を切除した抗体軽鎖可変領域#4V_L の X 線結晶構造解析により、抗体軽鎖の可変領域のドメインスワッピング構造を初めて明らかにした。



Figure 1. Schematic representation of equilibrium between monomeric and tetrameric forms of catalytic antibody light

【結果・考察】サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 及び SEC-多角度光散乱法（MALS）により、#4C214A は 4 量体を形成し、単量体と 4 量体の平衡状態であることが明らかとなった。平衡定数の温度依存性から、#4C214A が疎水性相互作用により 4 量化していることが示唆された。#4C214A 4 量体から単量体への解離において、解離速度の指標となる緩和時間は 0.5 時間 (45 °C) – 13.5 (4 °C) 時間と求まった。これらの緩和時間は一般的なタンパク質複合体の解離反応の緩和時間よりも著しく長かったことから、#4C214A 4 量体から単量体への変換は大きな構造変化を伴うと推測された。

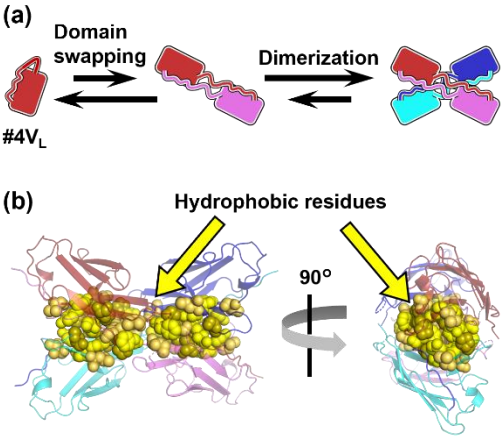


Figure 2. (a) Schematic diagram of #4V_L tetramerization. **(b)** #4V_L tetrameric structure and hydrophobic residues between #4V_L dimers.

#4C214A 4 量体構造の解明のため、X 結晶構造解析を試みたが、十分な分解能の回折像が得られなかった。そこで、ドメインスワッピングに関与していないと考えられる定常領域を切除し、結晶性の向上を目指した。#4C214A の可変領域と定常領域の間に TEV プロテアーゼ認識配列を導入した変異体を調製し、TEV プロテアーゼで切断することで、抗体軽鎖の可変領域#4V_L を単離した。SEC 及び SEC-MALS により、#4V_L も単量体と 4 量体の平衡状態であることが明らかになった。#4V_L の X 線結晶構造解析によりドメインスワッピングした立体構造が得られ、ドメインスワッピングした 2 量体はさらに 2 量化することで、#4V_L は 4 量体を形成していた (Fig. 2)。2 量体同士の相互作用界面には多くの疎水性残基が存在し (Fig. 2b)、4 量化に疎水性相互作用が大きく寄与することが結晶構造から確認された。

分子動力学シミュレーションによる細胞表層タンパク質 AtaA_Chead の力学応答解析

○笹原 純・橋本貴幸・藤本和士・吉本将悟・堀 克敏（名大院工）

Analysis of Mechanical Stability of a Cell Surface Protein AtaA_Chead by Molecular Dynamics Simulation

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) SASAHARA, Jun; HASHIMOTO, Takayuki; FUJIMOTO, Kazushi; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

微生物の細胞接着は、生存や増殖において重要な役割を担っており、その付着は細胞表層のアドヘシンを介して起こる。この際に、アドヘシンにはせん断応力や張力といった機械的負荷が生じるため、細胞接着の維持にはアドヘシン自体の強靭性が非常に重要である。*Acinetobacter* sp. Tol 5 は細胞表層に存在するアドヘシン AtaA を介して、生物表面のみならず、プラスチックやガラス、金属など様々な材料表面に対して高い付着性を示す [1]。AtaA は 250 nm の長さをもつ巨大なホモ三量体マルチドメインタンパク質である。AtaA ファイバーは Tol 5 の強固な細胞接着の維持を支えるテザー分子であり、容易に崩壊しない強靭性を有していると考えられてきた。AtaA を構成する多数のドメインのうち、C 末端に位置する AtaA_Chead は、先行研究によって結晶構造が明らかとなっており、headCap、HANS、Ylhead、HIM、Neck といった複数のドメインから構成されている [2] (Fig. 1)。しかしながら、異なるドメインが連結した AtaA がどのようにして、ファイバー全体の強靭性を発揮しているかは不明であった。本研究では AtaA_Chead の力学特性と、その分子機構の解明を目的に、全原子分子動力学計算を用いて AtaA_Chead の引っ張りに対する力学応答解析を行なった。

分子動力学計算用ソフトウェアである GROMACS を使用し、Steered Molecular Dynamics (SMD) 法により、AtaA_Chead (PDBID: 3WP8) の両端を一定の速度 (10 nm/ns) で伸長した際の Force-Extension Curve を算出した。まず初めに、三量体化を促進する目的で付加してある GCN4 タグのαヘリックスが引き伸ばされる過程で、headCap、HANS、Ylhead の順で各ドメインの構造が崩壊する様子が観察された。各構造が崩壊するのに必要な力は headCap-HANS 間が最も大きく、機械的安定性が高いことが示唆された。さらに、伸長に伴う力の伝達ネットワークを解析し AtaA_Chead 内部の力学伝播経路 [3]を可視化したところ、張力が引っ張り軸方向に伝達されるだけでなく、headCap を介して放射状に広がる様子が確認された。これより AtaA_Chead は、外力が作用した際にドメイン内及びドメイン間相互作用によって力学的負荷を分散することで構造の容易な崩壊を防いでいることが示唆された。

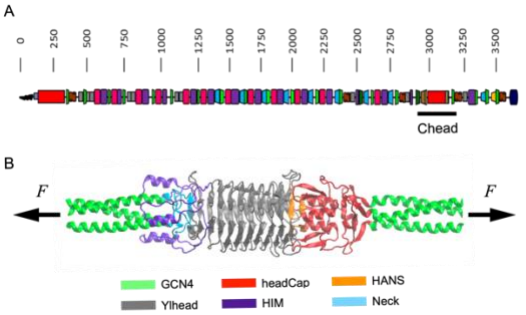


Fig. 1 (A) Schematic representation of AtaA and Chead domain. (B) Structure of AtaA_Chead.

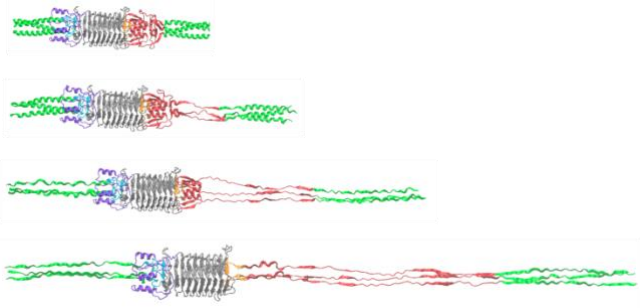


Fig. 2 Structural rupture snapshots of AtaA_Chead from steered molecular dynamics simulation.

1) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLoS One*, **7**, e48830 (2012)
2) K. Koiwai, M. D. Hartmann, D. Linke, A. N. Lupas, K. Hori, *J Biol Chem*, **291**, 3705-3724 (2016)
3) A. Sethi, J. Eargle, A. A. Black, Z. Luthey-Schulten, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 6620-6625 (2009)

人工細菌を志向した非対称なタンパク質組成を有する細菌サイズのリポソーム創出

○野場考策[1]・吉本将悟[1]・田中和義[2]・松浦友亮[3]・堀克敏[1]（[1]名大院工、[2]東北大院生命、[3]東工大 ELSI）

Creation of a bacterial-size liposome with the leaflets of asymmetric protein composition for artificial bacteria. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Department of Molecular and Chemical Life Sciences, Tohoku University[2] , Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology) NOBA, Kosaku[1]; YOSHIMOTO, Shogo[2]; TANAKA, Yoshikazu; MATSUURA, Tomoaki, HORI, Katsutoshi

人工細胞は、様々な化合物や生体システムを保持し、それによって細胞機能の一部を模倣した膜小胞である。これまで、人工細胞の作成には、直径 10 μm 以上の単一脂質膜からなる giant unilamellar vesicles が用いられてきた。このサイズの膜小胞は真核細胞を模倣できているが、極限環境を含む様々な環境や生体内、生体表面に遍在する細菌の細胞構造を再現できていない。細菌の細胞膜は、外葉と内葉で異なる脂質及びタンパク質組成を維持している。この非対称性は、シグナル伝達、タンパク質輸送、細胞の形状決定など、生体内の様々な生化学反応に不可欠である。このような非対称性の細胞膜環境を忠実に模倣したモデル系が必要であるが、タンパク質の非対称性を模倣した細菌人工細胞は限られている。これは、従来のリポソーム作製技術に起因している。

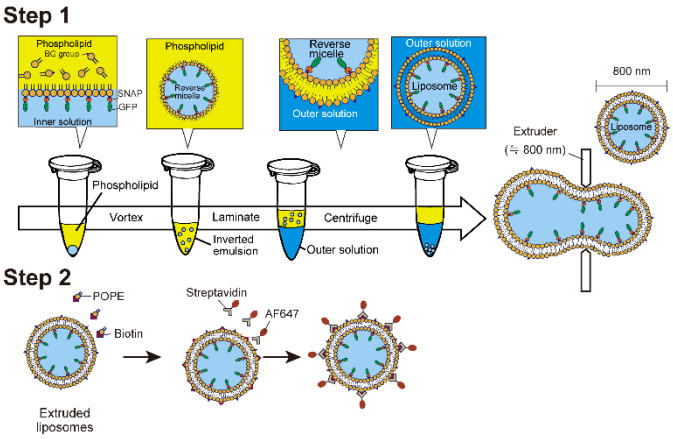


Fig. 1 本研究におけるリポソーム作成方法の概要

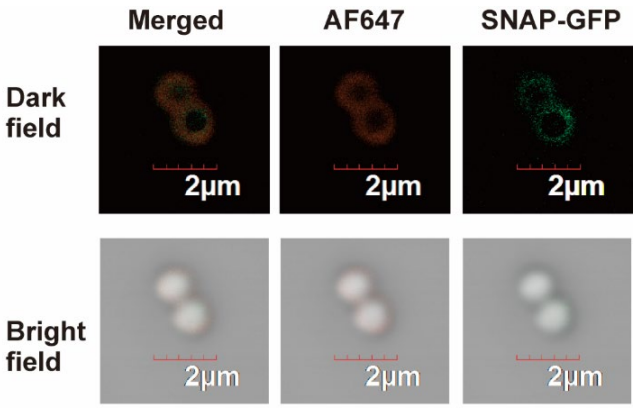


Fig. 2 創出したリポソームの CLSM 観察結果

本研究では、脂質二重層の内側と外側で異なるタンパク質を局在化した、細菌サイズの非対称リポソームの作成を目指した。目的を達成するために、従来のリポソーム作成法で汎用されている界面通過法とエクストルーダー法を組み合わせた。これらの方法を用いてベンジルグアニン誘導体を含むリン脂質を含むリポソームを調製し、SNAP-tag で融合した GFP を内葉に局在化させた。その後、ビオチン化脂質を外部に挿入し、Alexa Fluor 647 (AF647)が連結したストレプトアビジンタンパク質で修飾した（Fig. 1）。得られたリポソームは、ネイティブな細菌と同様のサイズ分布を有していることが動的光散乱法から明らかとなった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によって膜表面を観察することで、異なるタンパク質が連結した単一膜のリポソームが作成されていることが明らかとなった (Fig. 2)。また、調製したリポソームを Proteinase K で処理した後、フローサイトメトリーによって SNAP-GFP と AF647 の蛍光を評価した。その結果、リポソームの内側と外側に異なるタンパク質が結合していることが示された。このリポソーム作製法は、細菌の膜構造をボトムアップで再現する人工細菌の創製に貢献すると期待される。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

小分子応答型人工タンパク質クラスタリングシステムの創製

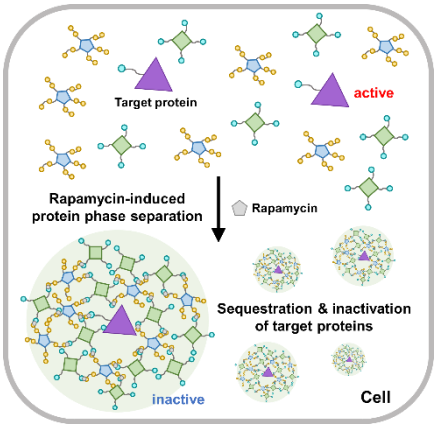
○深谷陽子[1]・吉川優[1]・鈴木祥央[1]・築地真也[1]（[1]名工大院工）

Development of small molecule-responsive synthetic protein clustering systems (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology[1]) FUKAYA, Yoko[1]; YOSHIKAWA, Masaru[1]; SUZUKI, Sachio[1]; TSUKIJI, Shinya[1]

細胞内では、異なる機能を持つさまざまなタンパク質が互いに相互作用・連携することで情報伝達を行っている。細胞内情報伝達システムは複雑でありながら精密に制御されており、情報伝達に関与するシグナルタンパク質に異常が生じると、種々の疾患の原因となる。そのため、シグナルタンパク質の活性を操作する技術は、細胞生理機能や疾患の理解・制御のための重要な基盤ツールを提供するものと期待される。近年、細胞内タンパク質の活性を操作するためのアプローチとして、遺伝子工学的な改変を加えたタンパク質を細胞内に発現させ、そのタンパク質の活性や局在を特定の小分子化合物によって制御する化学遺伝学（chemogenetics）が注目されている。例えば、標的タンパク質を小分子化合物で不活性化するシステムとして、HaloPROTACS が報告されている。このシステムでは、HaloTag によってタグ付けされた任意のタンパク質を小分子二量化剤の添加によってユビキチン化し、分解経路に導くことができる。HaloPROTACS システムは、さまざまなタンパク質を分解・不活性化できる高い汎用性を持つ一方、標的タンパク質の細胞内分解には十数時間以上の時間がかかる。そのため、タンパク質の素早い不活性化には適していない。そこで当研究室では、標的タンパク質を迅速に不活性化することのできる汎用的な新規化学遺伝学技術の開発に取り組んでいる。

最近になり我々は、細胞内で自己集合して相分離する機能性人工タンパク質を設計した。そしてこれと化学誘導二量化（chemically induced dimerization）法を組みわせることで、標的タンパク質をコンディショナルに取り込むことのできる人工非膜オルガネラを構築することに成功した[1,2]。このシステムでは、小分子ラパマイシンを添加することで任意の標的タンパク質を人工非膜オルガネラ内に隔離することができ、それにより標的タンパク質の不活性化を誘導することが可能であった。しかし、この人工非膜オルガネラは流動性が低く、標的タンパク質を内部まで隔離することが難しかった。そのため、活性を十分に隔離・阻害できるタンパク質に制限があるという問題があった。

そこで本研究では、上記の問題点を克服する新たなシステムとして、右図のような小分子応答型人工タンパク質クラスタリングシステムを考案した。このシステムは、以前のシステムとは異なり、初期状態では特に相分離構造体を形成しておらず、小分子を添加することで人工非膜オルガネラの形成（タンパク質クラスタリング）と標的タンパク質の取り込みを同時に誘導することができる。このようなシステムであれば、標的タンパク質を人工オルガネラ内部に高効率に隔離できると考えた。さまざまなコンストラクトを検討した結果、ラパマイシン添加に応答して素早く相分離し、さらに FRB でタグ付けされた標的タンパク質をその内部に効率良く取り込むことのできる人工タンパク質クラスタリングシステムを開発することに成功した。本発表では、本システムの設計とその展開について報告する。



図：本システムの概念図

1) M. Yoshikawa, T. Yoshii, M. Ikuta, S. Tsukiji, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 6434–6446.
2) M. Yoshikawa, S. Tsukiji, *Biochemistry*, **2021**, 60, 3273–3276.

リガンド指向性化学を用いた細胞内及び細胞外 AMPA 型グルタミン酸受容体の選択的可視化と動態解析

○杉原佑太朗[1]・小島憲人[1,2]・浜地格[2,3]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]京大院工、[3]JST ERATO）

Trafficking studies of intracellular and cell surface AMAP-type glutamate receptors using ligand-directed chemistry. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2], ERATO JST[3]) SUGIHARA, Yutaro[1]; OJIMA, Kento[1,2]; HAMACHI, Itaru[2,3]; KIYONAKA, Shigeki[1]

神経細胞間の情報伝達は、プレシナプスから放出された神経伝達物質をポストシナプスに存在する受容体が認識することで達成される。中枢神経系において、イオンチャネル型グルタミン酸受容体は速い興奮性の神経伝達を担い、中でも AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPAR) はポストシナプス膜上に発現し、興奮性神経伝達において重要な役割を果たす。神経細胞内において、AMPAR の発現量や動態は厳密に制御されており、その動態変化は記憶・学習や種々の神経疾患と密接に関係している。そのため記憶や疾患の分子メカニズムの解明に向けて、AMPAR の動態解析を目的とした可視化法の開発が活発に進められている。我々はこれまでに、リガンド指向性化学と生体直交反応を組み合わせたリガンド指向性 2 段階ラベル化法 [1]を開発し、神経細胞に内在する細胞表層 AMPAR の動態解析に成功していた。一方で、Trans-cyclooctene (TCO)と Tetrazine (Tz)の生体直交反応は非常に迅速かつ高選択的であるものの、夾雑環境下である細胞内の AMPAR を選択的に可視化することは困難であった。

本研究では、内在化した細胞内 AMPAR の動態解析を目的に、リガンド指向性 2 段階ラベル化法の細胞内適用に着手した。細胞内ラベルでは、2 段階目の反応で用いる tetrazine (Tz)の反応性の高さや色素の特徴が原因となり、バックグラウンド蛍光が高いことが問題であった。しかし、ある小分子化合物を用いたブロッキングを行うことでバックグラウンド蛍光が大幅に抑制され、細胞内 AMPAR の選択的なラベル化が可能となった。実際に、神経細胞においても細胞外および細胞内（内在化）した AMPAR を区別してラベル化することに成功した。また、本手法で細胞内・外 AMPAR をそれぞれ標識することにより、chemical LTP 刺激に対する AMPAR の動態変化観察に成功しており、今後 AMPAR 動態の詳細な解析において有用なツールになると期待される。

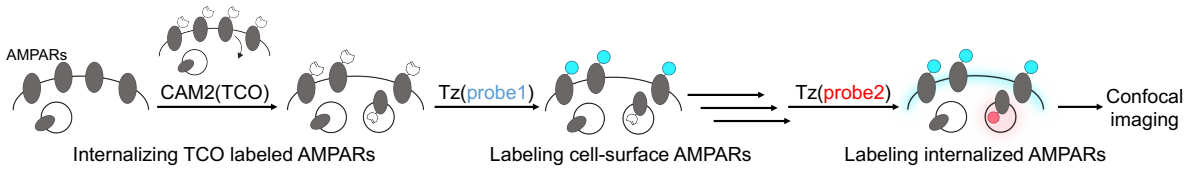


Fig. Schematic illustration of chemical labeling of intracellular and cell surface AMPARs by ligand-directed two-step labeling.

1) K. Ojima, et al., Ligand-directed two-step labeling to quantify neuronal glutamate receptor trafficking. Nat. Commun. 2021, 12, 831.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

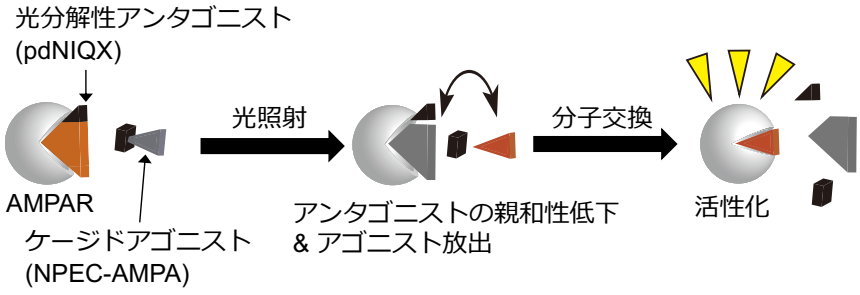
部位選択的な AMPA 型グルタミン酸受容体の活性制御を指向した新たな光制御システムの開発

○曽我恭平[1]・古田寿昭[2]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]東邦大理）

New caged compounds for site-specific activation of AMPA-type glutamate receptors (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Department of Biomolecular Science, Toho University[2]) SOGA, Kyohei[1]; FURUTA, Toshiaki[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

我々の脳内では神経細胞どうしが複雑な回路を形成することで高次脳機能を発現する。ポストシナプスに存在するグルタミン酸受容体は神経細胞間で興奮性の情報伝達を担う神経伝達物質受容体である。特に AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPAR)は記憶・学習に関与する。AMPAR の活性化は、記憶・学習の分子基盤である長期増強(LTP)に重要であることが知られており、AMPAR の活性制御は神経科学の分野において必須の技術である。その 1 つとして、ケージドグルタミン酸を用いた方法が挙げられる。ケージドグルタミン酸は、グルタミン酸の受容体との結合に重要な官能基を光分解性の保護基でマスクした化合物であり、光照射部位選択的にグルタミン酸を放出できる。ケージドグルタミン酸によって、シングルスパインレベルで AMPAR を活性化できることが報告されている[1)]。しかし、ケージド化合物の問題点として、活性種の拡散が挙げられる。中枢神経系においてスパインは数 μm 以内に複数存在しているため、ある 1 つのスパインを狙って光を照射してもそこからグルタミン酸が拡散し、隣のスパインに影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで本研究では、シングルスパインレベルで AMPAR を活性化することを指向して、光分解性化合物を用いた新たな光制御システムの開発を行った。AMPAR のアンタゴニストをベースとし、光照射前はアンタゴニストとして機能し、光照射により親和性が低下する光分解性アンタゴニスト pdNIQX(photo-decomposable *o*-nitrobenzyl quinoxaline dione)を設計・合成した。pdNIQX と同時にケージドアゴニストである NPEC-AMPA を加えておくと光照射部位においてアンタゴニストによる阻害が解除され、AMPA と入れ替わり、選択的に AMPAR を活性化できると考えた。実際に、HEK293T 細胞に発現させた AMPAR を光照射部位選択的に活性化することに成功した。本手法により、シングルスパインレベルで AMPAR の機能解析が可能になると期待される。



1) Matsuzaki, M. et al. *Nature* **429**, 761–766 (2004).

原子間力顕微鏡を用いた AtaA の C 末端パッセンジャードメインの 1 分子強靭性解析

○加藤周・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Single-molecule toughness analysis of the C-terminal passenger domain of AtaA using AFM (Graduate School of Engineering, Nagoya University) KATO, Amane; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

Acinetobacter sp. Tol 5 は細胞表層のタンパク質 AtaA を介して様々な物質表面に対して接着する [1]。AtaA は 3630 アミノ酸残基のポリペプチド鎖がホモ三量体を形成した長さ約 250 nm のファイバー状タンパク質で、数十のドメインが反復した構造を持つ (Fig. 1A)。その中でも、AtaA の C-terminal passenger domain (CPSD) はポリペプチド鎖が互いに絡み合った複雑な構造を形成することが X 線結晶構造解析により明らかになっており、AtaA ファイバーの強靭性や柔軟性に関わることが示唆されている [2]。しかしながら、CPSD に力が加わった際に実際にどのような力学応答を示すかは不明である。そこで本研究では、CPSD の強靭性解析を目的として、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた 1 分子測定を行った。

まず、N 末端に金基板への固定に用いるシステイン (Cys) を、C 末端に AFM プローブへの架橋に用いる SpyTag [3] を導入した Cys-CPSD-SpyTag を設計し、大腸菌で生産、精製した (Fig. 1A)。Cys-CPSD-SpyTag を SpyCatcher と混合し SDS-PAGE に供したところ、SpyTag-SpyCatcher 間での共有結合に伴う電気移動度の減少が検出された。よって、Cys-CPSD-SpyTag は SpyCatcher との結合能を維持していることが確認できた。

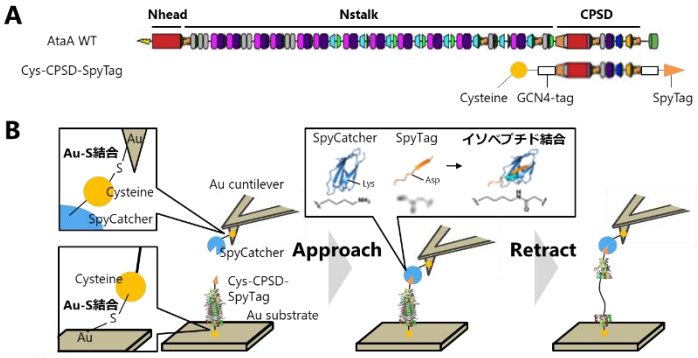


Fig. 1. (A) Schematic representation of AtaA and Cys-CPSD-SpyTag. (B) The measurement procedure for the mechanical property of Cys-CPSD-SpyTag using AFM.

続いて、Cys-CPSD-SpyTag を Au-S 結合を介して金基板に固定、SpyTag-SpyCatcher 結合を介して AFM プローブに架橋し、ファイバーの伸展に伴うフォースディスタンス (FD) カーブの取得を試みた (Fig. 1B)。その結果、Cys-CPSD-SpyTag 単分子を伸展したと考えられる FD カーブを複数取得することに成功し、約 850 pN の力が加わるまで壊れない部位が存在することが明らかになった。これは筋肉を構成するタイチンや細菌付着性ファイバータンパク質であるインチミンなど他のタンパク質と比較しても突出した強度であり、AtaA の CPSD には非常に強靭性の高い部位が存在することを示している。

1. M. Ishikawa *et al.*, PLOS ONE, 7, e48830 (2012)
2. K. Koiwai *et al.*, J. Biol. Chem., 291(8), 3705-3724 (2016)
3. B. Zakeri *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109(12), E690-E697 (2012)

抗体抗原間の相互作用により加速されるひずみ解消型 Click 反応

○西山健太郎[1]、秋葉宏樹[1,2]、永田諭志[2]、津本浩平[2]、鎌田春彦[1,2]、大野浩章[1,2]
（[1]京大院薬、[2]医薬健栄研）

Acceleration of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition induced by antibody-antigen interaction

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University[1], National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition[2]) Nishiyama, Kentaro[1]; Akiba, Hiroki[1,2]; Nagata, Satoshi[2]; Tsumoto, Kouhei[2]; Kamada, Haruhiko[1,2]; Ohno, Hiroaki[1,2]

2 分子間の化学反応速度は 2 つの物質の濃度に依存するため、低濃度では必然的に速度が低下する。一方で、例えば DNA-templated organic synthesis[1] として知られている手法 (Fig. 1a) では、反応させたい低分子化合物を DNA に連結することで、DNA の 2 本鎖形成を通じて化学反応点同士が接近し、通常の化学反応よりもはるかに低い絶対濃度で、反応を速く進行させることができる。このように、生体高分子同士の強力な相互作用に由来する近接効果を利用して化学反応を加速させる方法は、生体内のような夾雑系で迅速かつ特異的に化学反応を進行させる手段として有効であると考えられる。

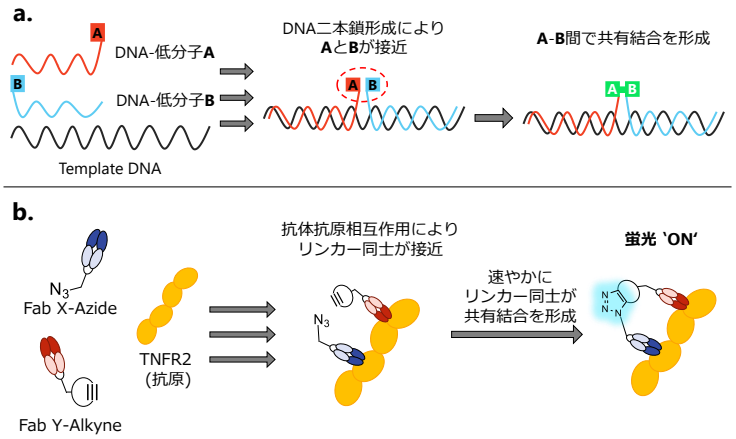


Fig. 1 (a) 近接効果による反応の加速の例 (DNA-templated organic synthesis) **(b)** 抗体抗原相互作用による反応の加速

抗体抗原相互作用は高い親和性と特異性を示すが、この相互作用を利用して、抗体にコンジュゲートした 2 つの低分子化合物間の反応の加速を試みた例は報告されていない。我々は、同一抗原の異なるエピトープに結合する 2 種類の抗体を利用することで、同様の近接効果により反応速度を上昇させられると考えた (Fig. 1b) 。抗体は容易に膜蛋白質を標的とできるため、生体内で抗原特異的に所望の化合物を合成するといった応用が視野に入る。さらに、抗体フラグメントを抗原特異的に二量体化できるため、抗体の低分子化と二価結合による高い結合能を両立できるようになる。

本研究ではモデルとして、TNFR2 抗原の異なるエピトープと相互作用する 2 種類の抗体の Fab (Fragment antigen binding) に、生体直交型反応性のリンカーをコンジュゲートして用いた。用いた 2 種類の Fab は、TNFR2 と隣接して相互作用することでリンカー同士が近接するような設計とした。また、リンカー同士の反応の進行を蛍光強度の増大によって評価するために、7-amino-3-azidocoumarin と bicyclononyne の間の click 反応により蛍光‘ON’となる設計とした (Fig. 1b)。

2 種類の Fab とリンカーのコンジュゲート体、および TNFR2 を 2 μM で混合し、サイズ排除クロマトグラフィーで分離し、蛍光強度を検出した。すると、経時的に蛍光強度が増大し、反応が進行していることを確認できた。また、TNFR2 非存在下では反応速度が著しく低下し、抗体抗原相互作用が click 反応の加速に重要であることが明らかとなった。さらに、TNFR2 と相互作用してもリンカー同士が接近しないと考えられる Fab の組み合わせを用いた場合は、click 反応の加速がみられなかった。以上より、抗体相互作用の際にリンカーが近接するような Fab の組み合わせを選択することで、化学反応の加速が実現可能であることが明らかとなった。

[1] Li., X. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4848-4870.

分子クラウディング環境下における架橋酵素の触媒挙動の理解

○佐藤 崚[1]・南畑 孝介[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）

Understanding the catalytic behavior of cross-linking enzyme under crowded condition

(Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University[2])
Sato, Ryo[1]; Minamihata, Kosuke[1]; Wakabayashi, Rie[1]; Goto, Masahiro[1,2]; Kamiya, Noriho[1,2]

【緒言】

タンパク質の機能評価は、通常、希薄な水溶液中で実施される。しかし、生体内でタンパク質が機能を発揮する環境は、高濃度の生体高分子やオルガネラが存在する分子クラウディングの状態にある。当該環境では酵素の触媒挙動が変化することが知られ、これまでにクラウディング剤や酵素の分子量が小分子基質に対する触媒挙動に与える影響が報告されている[1]。しかし、基質の分子量が触媒挙動に与える影響を系統的に調べた例は見当たらない。そこで、本研究では異種ペプチド間を架橋する微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) に注目した。MTG はグルタミン (Q) 及びリジン (K) 残基または一級アミン間におけるイソペプチド結合形成反応を触媒する。本研究では、Dextran によって調製されたクラウディング環境中で、分子量の異なる一連の基質を MTG によって架橋し、その触媒挙動の理解を目指した (Fig. 1a, b)。

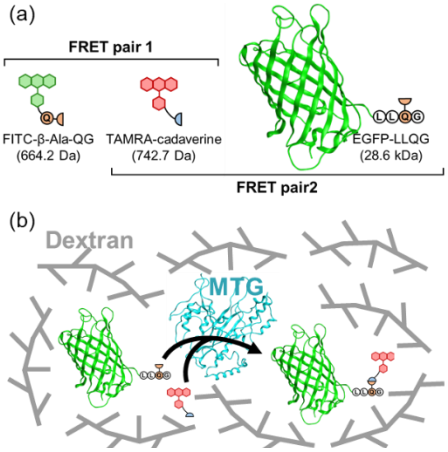


Fig. 1 (a) 本研究で用いた MTG 基質
(b) Dextran 溶液中での MTG 反応

【実験及び結果と考察】

MTG 反応性を有する蛍光色素 FITC-β-Ala-QG (FITC-Q), TAMRA-cadaverine (TAMRA-NH_2) 及び蛍光タンパク質 EGFP-LLQG (EGFP-Q) を、PBS 及び平均分子量の異なる Dextran (60, 500 kDa) を 15 wt%含む PBS 中で架橋した。各溶液中で生じた架橋産物の生成速度を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) により経時的に追跡したところ、Dextran 溶液中での FITC-Q と TAMRA-NH_2 の架橋速度は、PBS 中の 3 分の 1 程度に低下した (Fig. 2a)。これに対して、EGFP-Q と TAMRA-NH_2 間の架橋速度は、Dextran 溶液中と PBS 中ではほぼ同等であった (Fig. 2b)。MTG 架橋反応は、Q 基質との MTG-Q 複合体の形成後、一級アミン基質の求核攻撃により完了する [2]。Dextran 溶液は PBS よりも粘度が高いにも関わらず、架橋反応が同等の速度で進行したのは、Dextran の排除体積効果により MTG-Q 複合体の形成が加速したためと考えられる。本発表では、タンパク質基質同士の架橋挙動についても併せて報告する。

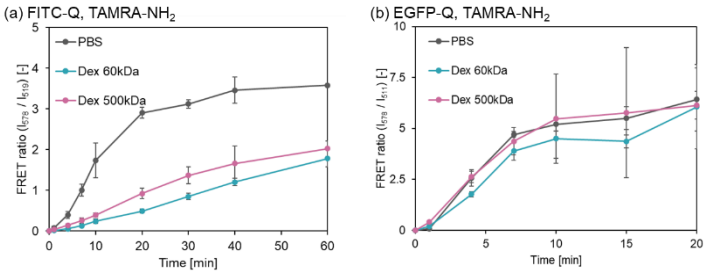


Fig. 2 クラウディング環境下での MTG による (a) FITC-Q, TAMRA-NH_2, (b) EGFP-Q, TAMRA-NH_2 の架橋挙動

【参考文献】

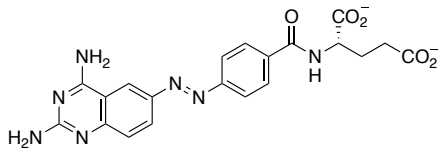
[1] I. Pastor *et al.*, *Biophys Chem.*, **185**, 8 (2014). [2] T. Kashiwagi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 44252 (2002).

光可逆的かつ定量的なタンパク質ラベル化を可能とするフォトクロミックリガンドの開発

○浜口聡志[1]・小和田俊行[1,2,3]・間下貴斗[2]・Himadri S. SARKAR[3]・松井敏高[1,2,3]・水上 進[1,2,3]（[1]東北大院生命、[2]東北大院理、[3]東北大多元研）

Development of photochromic ligands for quantitative and photo-reversible protein labeling. (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University[1], Graduate School of Science, Tohoku University[2], Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University[3]) HAMAGUCHI, Satoshi[1]; KOWADA, Toshiyuki[1,2,3]; MASHITA, Takato[2]; SARKAR, Himadri S.[3]; MATSUI Toshitaka[1,2,3]; MIZUKAMI Shin[1,2,3]

細胞内タンパク質の機能は、生体分子との相互作用や局在などによって精密に調節されている。タンパク質機能の異常は様々な疾患の原因となることから、そのような疾患における細胞内タンパク質間相互作用や局在を調べることは治療法確立のために重要である。これまで、可視化や二量化を通したタンパク質機能解析のために、タグタンパク質を特定の有機小分子によってラベル化する技術が広く用いられてきた。この技術は、蛍光タンパク質による蛍光標識に比べて、ラベルするリガンドの機能や物性の調節が容易であるという利点がある。一方で、リガンドの添加によってラベル化を行うことから、細胞局所におけるラベル化の時空間的制御は困難であった。近年、光反応性の保護基によりリガンドの活性部位を保護したケージド化合物を利用することで、細胞局所への光照射によるラベル化の時空間的制御が達成されている。しかし、ケージド化合物によるラベル化の時空間的制御はケージド基の光解離反応に基づいているため、可逆的なタンパク質のラベル化に課題を残している。この課題に取り組むため、我々は最近、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素（eDHFR）の阻害剤であるメトトレキセート（MTX）にアゾベンゼン構造を導入したフォトクロミックリガンド（**azoMTX**）を開発した（**Figure 1**）[1]。**azoMTX** は紫外光照射により生じる *Z* 体と可視光照射により生じる *E* 体の間で eDHFR に対する親和性に大きく差があるため、光異性化を利用して eDHFR との結合を可逆的に制御可能であった。一方、さらに取り組むべき課題の一つが、光照射下における異性体比である。紫外光照射下における *Z* 体の割合は最大で 75%であり、可視光照射下における *E* 体の割合は最大 92%に留まる(**Table 1**)。特に、可視光照射によって親和性の高い *Z* 体が残るため、eDHFR への結合・解離を完全に制御することは困難である。さらに、*Z* 体の熱半減期は室温で 5.5 時間と短く、時間経過とともに *Z* 体から *E* 体への熱異性化が起こり、複合体が解離する可能性がある。



azoMTX

Figure 1. Structure of **azoMTX**.

本研究では、定量的に近い光異性化特性、およびアゾベンゼン構造と比べてより高い熱安定性を示すことが報告されているフェニルアゾピラゾール構造[2]を分子内に導入した **azoPyQM** を開発した。**azoPyQM** は紫外光照射時の *Z* 体比率が最大 92%、可視光照射時の *E* 体比率が最大 98%となり、ほぼ定量的な光異性化特性を示した。また、*Z* 体の熱半減期は室温で 3.4 日と長く、長時間の生細胞イメージングへの適用が期待される。本発表では、**azoPyQM** の部分構造を有するタンパク質二量化剤の開発と生細胞イメージングの結果についても報告する。

Table 1. Comparison of **azoMTX** and **azoPyQM**.

Name	Percentages of mein isomer (%) *Z* (PSS394)	*E* (PSS560)	$t_{1/2}$ (at 25 °C)
azoMTX	75	92	5.5 h
azoPyQM	92	98	3.4 d

1) Mashita, T.; Kowada, T.; Takahashi, H.; Matsui, T.; Mizukami, S. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1382–1386.
2) Weston, C, E.; Richardson, R, D.; Haycock, P, R.; White, A, J, P.; Fuchter, M, J. *J. Am. Chem. Soc*. **2014**, *136*, 11878–11881.

循環置換とαヘリックス挿入を用いた３ユニット環状ヘムタンパク質の構築と構造解析

○藤原綱大[1]・大西遥喜[1]・真島剛史[1]・小林直也[1]・山中優[1]・米澤健人[1]・上久保裕生[1]・内橋貴之[2]・廣田俊[1]（[1]奈良先端大先端科技・[2]名大院理）

Construction and structural analysis of a three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion (Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology[1], Graduate School of Science, Nagoya University[2]) FUJIWARA, Kodai[1]; ONISHI, Haruki[1]; MASHIMA, Tsuyoshi[1]; KOBAYASHI, Naoya[1]; YAMANAKA, Masaru[1]; YONEZAWA, Kento[1]; KAMIKUBO, Hironari[1]; UCHIHASHI, Takayuki[2]; HIROTA, Shun[1]

天然には、秩序的に集合化した超分子構造をとることで機能を発揮するタンパク質が存在する。その機能発現機構を人工的に模倣し応用するために、自在にタンパク質超分子構造を構築する手法が求められている。本研究室ではこれまでに、超好熱菌由来シトクローム c_{555} のドメインスワッピング 2 量体構造を基に、循環置換と α ヘリックスリンカー挿入を施した人工タンパク質 CPC (Circular Permutated Cyt c_{555})を作製した(Figure 1a)[1]。CPC はエタノール処理により主に環状 3 量体を形成し、4 面体構造のナノ構造体を構築したが、環状構造ではない単量体や 2 量体も同時に形成した。そこで本研究では、CPC 3 量体と同様の環状構造を安定化させ、高選択的に得るため、CPC 3 分子を融合したタンパク質(CPC_3)を作製した(Figure 1b)。

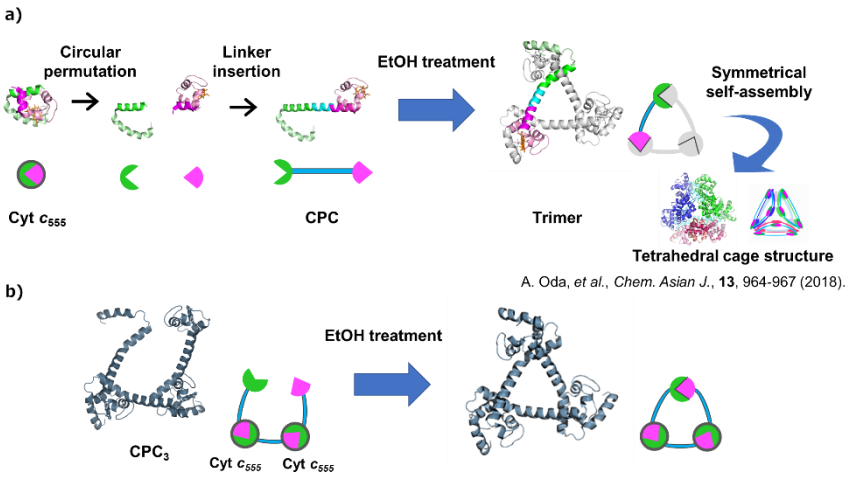


Figure 1. Design and construction of a) CPC trimer and b) cyclic CPC_3.

CPC_3 を組み換え大腸菌を用いて発現し、精製したところ、様々な構造の CPC_3 が得られた。CPC_3 を単一の構造にするため、エタノール(終濃度 60% (v/v))を添加することで CPC_3 を変性させた後、透析によりエタノールを取り除き、CPC_3 を安定構造へリフォールディングさせた。このエタノール処理により、CPC_3 のサイズ排除クロマトグラフィーの溶出時間は遅くなり、陽イオン交換クロマトグラフィーにおける CPC_3 の溶出ピークはシャープになった。これらの結果から、大腸菌から得られた CPC_3 は、エタノール処理により単一のコンパクトな構造へ変化することが示唆された。さらに、SAXS と AFM 測定により、エタノール処理前後の CPC_3 が 3 つのユニットで構成されていることを確認した。また、CPC_3 は大腸菌から得られた状態では N 末端と C 末端が開いた鎖状構造をとり、エタノール処理により N 末端と C 末端が閉じた環状構造へ変化することが示唆された(Figure 2)。

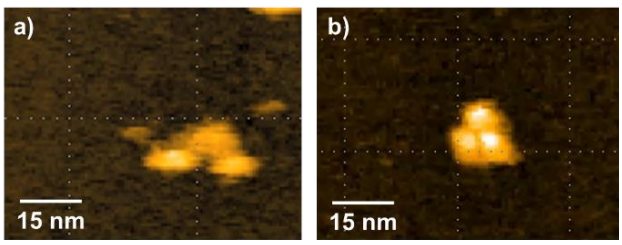


Figure 2. AFM images of CPC_3 monomer a) before and b) after ethanol treatment.

[参考文献]
[1] A. Oda, *et al.*, *Chem. Asian J.*, **13**, 964-967 (2018).

NMR analysis of transient unfolding/refolding protein structures by encapsulation in a self-assembled cage

(Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Institute for Molecular Science (IMS)[2], Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University[3]) ○ROSSEN, Anouk[1]; NAKAMA, Takahiro[1]; YAGI-UTSUMI, Maho[2]; FUJITA, Daishi[3]; KATO, Koichi[2]; FUJITA, Makoto[1,2]

Structural analysis of protein unfolding/refolding has been difficult as partially unfolded intermediates are unstable and often aggregate in solution. To elucidate these transient structures that are unobservable by standard spectroscopy techniques, development of new analysis methods for studying protein unfolding/refolding is paramount. We have previously reported the encapsulation of a single protein in a giant self-assembled $M_{12}L_{24}$ cage, which stabilized the protein under denaturing conditions by preventing its aggregation and precipitation.[1]

In this work, we analysed transient protein structures in solvent-induced unfolding and refolding by encapsulation of a protein in a self-assembled cage. (Fig 1).[2] The confined space in the cage can isolate an unstable unfolded protein, preventing formation of insoluble aggregates, and thus enabling NMR analysis of protein unfolding/refolding processes. A cutinase-like enzyme (CLE) was ligated to a bispyridine ligand (L), and subsequent self-assembly with Pd^{II} ions (M) yielded an $M_{12}L_{24}$ cage encapsulating the protein. In 90% acetonitrile/water solvent unencapsulated CLE precipitated, whereas for encapsulated CLE an unfolded, molten globule structure was observed. To investigate the unfolding process, we increased the acetonitrile-to-water ratio in steps. In ^{1}H–^{15}N HSQC NMR analysis, sudden attenuation of peak intensity indicated that the encapsulated CLE rapidly lost its native structure at 83% acetonitrile. Mapping of the peak intensity reduction revealed the structure of the unfolding CLE intermediate (Fig 1b). Since the perturbation was concentrated in certain areas, it is suspected that collapse of these regions is what initiated the unfolding. By decreasing the acetonitrile ratio we also examined the structural change upon refolding of the denatured protein (Fig 1a). The encapsulated CLE was shown to start refolding at 80% and fully restored its native structure at 70% acetonitrile ratio. The difference in transition points in the unfolding/refolding indicated hysteretic behaviour. Moreover, the difference in peak intensity recovery suggested the pathway for refolding may differ from that of unfolding.

In conclusion, we were able to observe the transient intermediate structures of protein unfolding/refolding processes by confinement in the $M_{12}L_{24}$ cage.

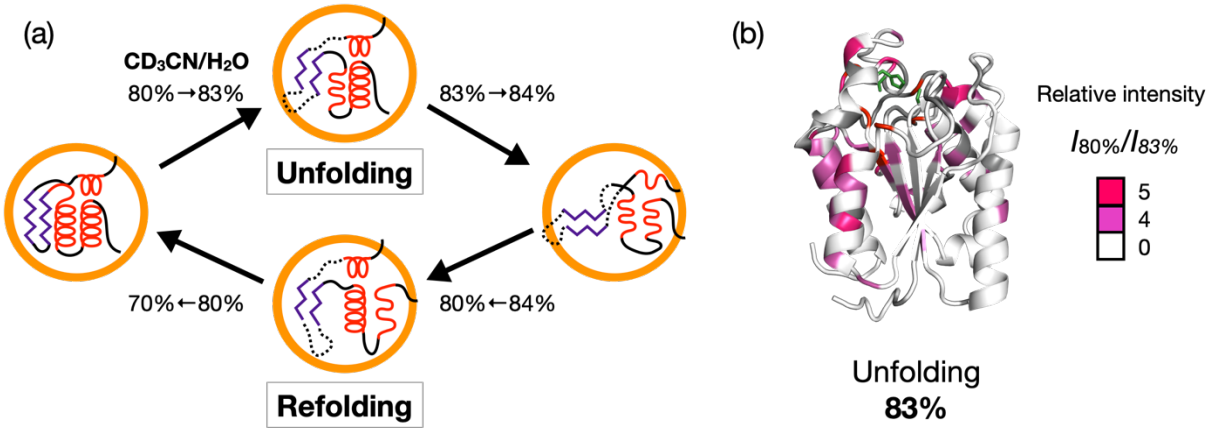


Fig 1. a) Schematic representation of the solvent-induced unfolding/refolding process for CLE. b) Relative peak intensity mapping for each residue for unfolding at 83% as compared to the intensity at 80% acetonitrile. The residues assigned to the disappeared peaks and unassigned residues are shown in red and gray, respectively.

1) Fujita, D.; et al. *Chem* **2021**, *7*, 2672–2683. 2) Nakama, T.; Rossen, A.; et al. *in preparation.*

細胞膜ホスファチジルイノシトール 4-リン酸を可視化する蛍光バイオセンサーの開発

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

Development of novel fluorescent biosensors for visualizing plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology[1], Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University[2]) AJIKI, Moeka[1]; YOSHIKAWA, Masaru[1]; NAKATSU, Fubito[2]; TSUKIJI, Shinya[1]

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸（PI4P）は動物細胞の生体膜に最も多く存在するイノシトールリン脂質の一つであり、特に細胞膜とゴルジ体の膜に豊富に存在している [1)]。細胞膜上に存在する PI4P（細胞膜 PI4P）はホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸（$PI(4,5)P_2$）の前駆体になることや、さまざまなエフェクタータンパク質を細胞膜にリクルートすることで膜ダイナミクスを制御していることが知られている。さらに近年では、小胞体と細胞膜間のメンブレンコンタクト形成において、PI4P の濃度勾配がその形成と解消に関与する機構が明らかとなってきた [2)]。このように細胞膜 PI4P はさまざまな細胞生理機能に関与する重要な脂質分子であるが、細胞膜 PI4P の動態や、それが制御する細胞生理機能のメカニズムについては不明な点が多い。これらの解明のためには、細胞膜 PI4P を特異的かつ高輝度に検出可能な蛍光バイオセンサーが必要となる。PI4P に対する既存のバイオセンサーとしては、病原菌レジオネラ・ニューモフィラ由来の SidM タンパク質が持つ PI4P 結合モチーフ（P4M）[3)]や、OSBP タンパク質の PH ドメイン（PH_{OSBP}）[4)]を蛍光タンパク質に融合したものが報告されている。しかし、実際にはこれらのプローブはゴルジ体 PI4P に対する特異性の方が高く、細胞膜 PI4P の検出には不向きであった（下記参照）。

そこで本研究では、細胞膜 PI4P を高選択的に可視化できる新規蛍光バイオセンサーの開発を目指した。具体的には、オキシステロール結合タンパク質関連タンパク質（ORP）ファミリーの一種である ORP9 の PH ドメイン（PH_{ORP9}）が PI4P に結合することに着目し（中津ら、未発表データ）、PH_{ORP9} を細胞膜 PI4P 結合モチーフとして用いることを考えた。そこで、PH_{ORP9} に緑色蛍光タンパク質 AcGFP を融合したコンストラクト（AcGFP-PH_{ORP9}）を作成し、細胞内に発現させたところ、明るい蛍光が細胞膜上で観察された（図 1a）。脂質特異的枯渇実験の結果、AcGFP-PH_{ORP9} が細胞膜上の PI4P を特異的に標識していることが示され、AcGFP-PH_{ORP9} が細胞膜 PI4P 蛍光バイオセンサーとして機能することが確認された。一方、既存の P4M を PI4P 結合モチーフとして使用した場合（AcGFP-P4M）、細胞質を拡散した成分とゴルジ体に結合した成分が主に見られ、細胞膜への局在はほとんど検出できなかった（図 1b）。また、AcGFP-PH_{OSBP} は、細胞膜 PI4P よりもゴルジ体 PI4P に対して強く結合する様子が示された（図 1c）。以上の結果は、AcGFP-PH_{ORP9} の細胞膜 PI4P バイオセンサーとしての優位性を示している。本発表では、一連の実験の詳細について報告する。

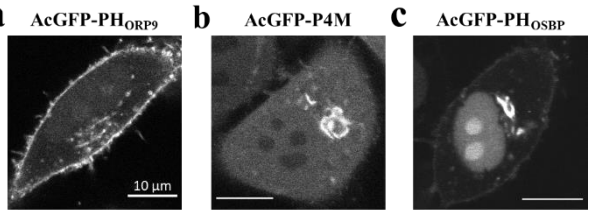


図1：各プローブによるPI4Pイメージング（HeLa細胞）

1) F. Nakatsu et al., *J. Cell Biol.* 199, 1003-1016 (2012)
2) F. Nakatsu et al., *Front Cell Dev. Biol.* 9:664788 (2021)
3) G. R.V. Hammond et al., *J. Cell Biol.* 205, 113-126 (2014)
4) A. Balla et al., *Mol. Biol. Cell.* 16, 1282-1295 (2005)

ステロイド代謝酵素を基盤とする Pd(II)含有人工金属酵素の創製と分子内ヒドロアリール化に対する触媒活性の評価

○西脇春香・加藤俊介・林　高史（阪大院工）

Construction of Pd(II)-containing Artificial Metalloenzymes Using Protein Scaffolds of Steroid Metabolizing Enzymes and their Application to Intramolecular Hydroarylation Reaction (Graduate School of Engineering, Osaka University) NISHIWAKI, Haruka; KATO, Shunsuke; HAYASHI, Takashi

非天然の合成金属錯体を補因子としてタンパク質反応場に導入した「人工金属酵素」の開発が、近年注目を集めている[1]。現在までに様々な人工金属酵素の構築手法が報告されているが、本研究では新たな研究展開として、ステロイド代謝酵素の基質認識を利用した人工金属酵素の開発に着手した。ステロイド代謝酵素は多くの生物に存在する酵素であり、基質であるステロイドを捕捉し、触媒反応を促進する精巧な反応場を具備する。本研究では、ステロイド骨格を部分構造に有する合成金属錯体を合成し、ステロイド代謝酵素の基質認識を介して酵素本来の活性中心に合成金属錯体を配置することで、酵素の精巧な反応場と金属錯体を協働させることをめざした。また、対象となりうるステロイド代謝酵素は、数多くの種類が存在するため、反応場の構造が異なる様々な候補の中から、反応に適した酵素を選ぶことができるのも本系の魅力である。これらの利点を活用し、本研究では、種々のステロイド代謝酵素について人工金属酵素の構築と触媒活性の検討を実施したので報告する。

本研究では、ステロイド代謝酵素本来の活性中心に、金属錯体を配置することをめざし、コレスタン骨格を部分構造に有する Pd-NHC 錯体（**Pd1**）を設計・合成した（図 1）。次に、**Pd1** を種々のステロイド代謝酵素と複合化することで、Pd を活性中心に有する人工金属酵素を調製した。さらに、調製した人工金属酵素を用いて分子内ヒドロアリール化反応を実施したところ、*R. erythropolis* 由来 3-Ketosteroid-Δ1-dehydrogenase（ReKSTD）に **Pd1** を複合化した人工金属酵素（ReKSTD-**Pd1**）が、優位な触媒活性を示すことが明らかとなった（図２）。ステロイド代謝酵素 ReKSTD 自身は触媒活性を示さなかったことから、ReKSTD-Pd1 の触媒活性は酵素に結合した **Pd1** によるものであると考えられる。また、ReKSTD-**Pd1** の調製時に、**Pd1** と類似のステロイド化合物を添加したところ、触媒活性が低下したことから、**Pd1** はステロイド代謝酵素の基質認識部位に結合していることが示唆された。

1) T. R. Ward *et al. Chem. Rev.* **2018**, *118*, 142–231.

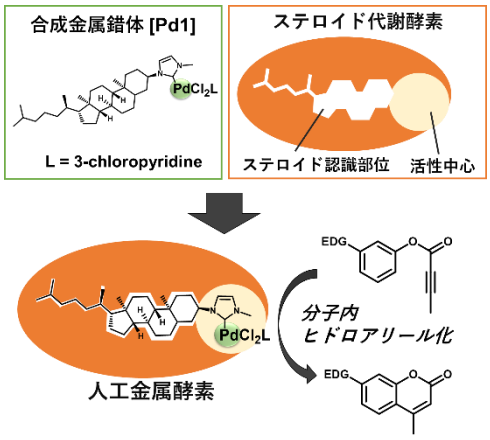


図 1 本研究で開発に取り組む人工金属酵素のデザイン

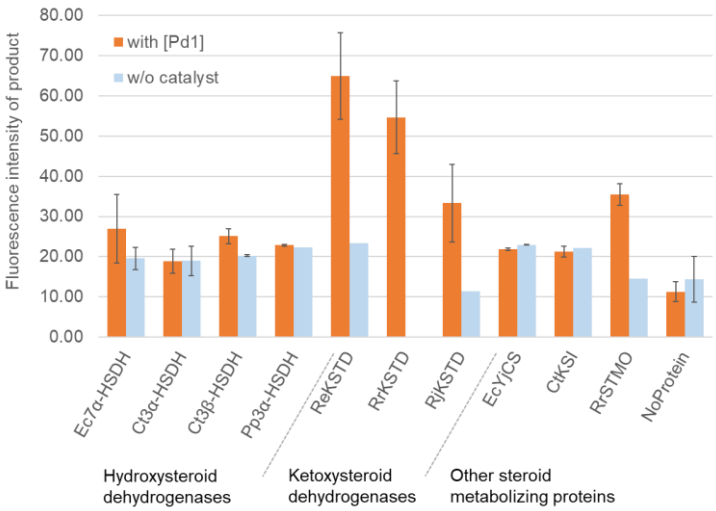


図 2 反応終了時における生成物の蛍光強度の比較
（λ_{ex} = 368.5 nm, λ_{em} = 466 nm）

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

二つの異なる蛍光色素を修飾したタンパク質を構成要素とするハイドロゲルの調製

○印南拓希・大洞光司・林　高史（阪大院工）

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

ハイドロゲルに関する研究は数多く報告されているが、その中には外部刺激に応答して形状や物性を変化させるものがある。このような刺激応答性ゲルの構築法の一つとして、特定の刺激に応答して物理化学的性質が変化する機能性分子をゲルの三次元網目構造の内部に導入する手法が挙げられる。特に、機能性分子としてタンパク質を用いると、温度や pH 等の外部刺激に応答したタンパク質のミクロな構造や物性の変化が、マクロなゲルの形状や力学的物性に変化を与えることが知られている [1]。

我々のグループでは、安定な共有結合を介してタンパク質をゲルの三次元網目構造内に導入し、前述のゲルとは逆にマクロな力学的外部刺激をタンパク質のミクロな構造変化として反映することで、新しいタイプの応力集中可視化ゲルが開発可能であると考えた。そこで本研究ではタンパク質の力学的刺激による変性と折り畳みに注目し、その構造変化を定量評価するために、ゲルの構成要素となるタンパク質に対して、フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）のドナーおよびアクセプターとして機能する二つの異なる蛍光色素の導入を試みた。FRET は距離依存性が強いため、タンパク質中に二つの蛍光色素を導入すれば、タンパク質の変性と折り畳みに伴う大きな構造変化によって蛍光スペクトルが大きく変化すると予想される。さらに、溶液中でのタンパク質の変性と折り畳みに伴うエネルギー変化とそれに伴う FRET の蛍光スペクトル変化を関連づけることで、ゲルへの応力に伴う局所的なエネルギー変化の定量的な可視化が可能と考えられ、新規メカノフォアとしての応用が期待される。ハイドロゲルの構成要素として用いるタンパク質としてはβ-lactoglobulin を用い、タンパク質に導入するドナーおよびアクセプター蛍光色素として fluorescein と tetramethylrhodamine をそれぞれ選択した。fluorescein はβ-lactoglobulin に一つだけ存在するフリーのシステイン残基へ導入し、tetramethylrhodamine はアジド化処理 [2]を行った N 末端へ dibenzocyclooctyne（DBCO）を介して導入した。また、β-lactoglobulin 表面に多数存在するリジン残基と両末端に succinimide を修飾した polyethylene glycol によるアミド結合形成により架橋し、目的のハイドロゲルを調製した。

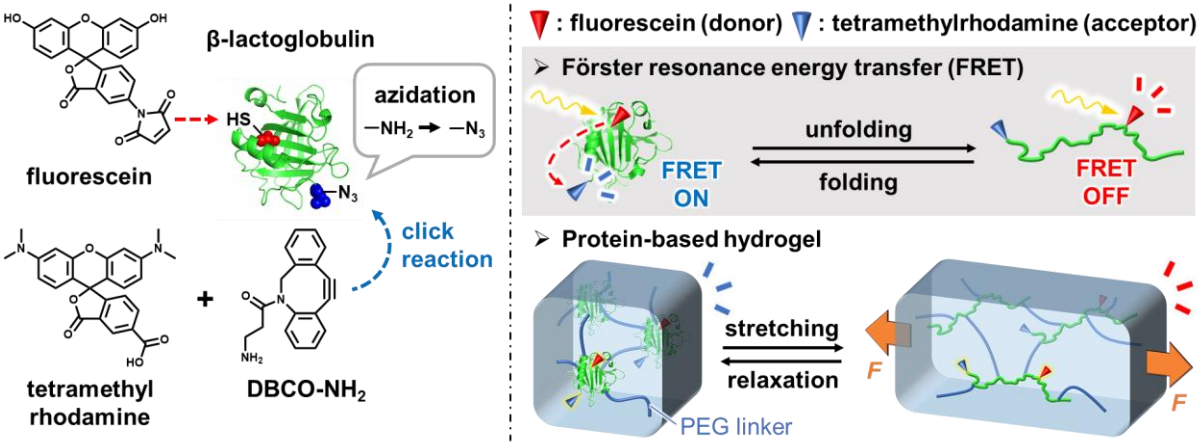


Fig 1. Schematic representation of β-lactoglobulin-based mechanofluorescent gel

1) W. L. Murphy *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 3066-3069.
2) S. Schoffelen *et al*., *Chem. Sci*., **2011**, *2*, 701-705.

抗体担持ナチュラルキラー細胞療法を可能にする人工抗体の創製

○田中千尋[1]・藤野公茂[1]・原田結[2,3]・米満吉和[2,3]・林剛介[1]・村上裕[1,4]（[1]名大院工、[2]九大院薬、[3]革新的バイオ医薬創成学、[4]名大ナノライフ）

Development of Artificial Antibody for Antibody-anchored Natural Killer Cell Therapy (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Pharmaceutical Sciences Kyushu University[2], R&D Laboratory for Innovative Biotherapeutics Science[3], Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University [4]) TANAKA, Chihiro[1]; FUJINO, Tomoshige[1] ; HARADA, Yui[2,3] ; YONEMITSU, Yoshikazu[2,3] ; HAYASHI, Gosuke[1] ; MURAKAMI, Hiroshi[1,4]

がんは世界的にメジャーな病気の一つであり、日本でも二人に一人が何らかのがんにかかると言われているほど非常に身近な病気である。一般的に行われるがんの治療法として、手術療法、放射線療法、薬物（化学）療法を含めた三大療法があるが、近年、三大療法よりも副作用が低い第四の療法として免疫療法が注目されている。

特に、ナチュラルキラー（NK）細胞療法では、NK 細胞の複数のセンサーによって正常細胞と腫瘍細胞を見分けることができ、副作用が少ないと考えられている。NK 細胞は、抗体の Fc 領域に Fcγ レセプターによって結合することで ADCC（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity）活性を発揮し腫瘍細胞を傷害するため、NK 細胞療法は腫瘍細胞上の抗原を標的化した抗体医薬品との併用で高い相乗効果が期待できる。しかし、NK 細胞の Fcγ レセプターには親和性が低い（K_D=0.1～1 μM）という問題があるため、NK 細胞から解離した抗体医薬品が正常細胞に結合すると、好中球や単球などの他の特異性の低い免疫細胞が正常細胞を攻撃するという問題を引き起こす。治療の障害となるこの副作用を抑制するためには、NK 細胞のみが Fcγ レセプターを介して抗体医薬品の Fc 領域に結合しなければならない。この課題を解決するために、NK 細胞と、抗体医薬品をつなぐ架橋構造体を作製し、あらかじめ細胞と抗体を結合させておく方法が提案された（特願 :2020-113083）。しかし、開発したプロトタイプでは、NK 結合ドメインに scFv を、IgG 結合ドメインに Protein G を用いており、scFv の親和性が低い（K_D = 10 nM）ことや、架橋構造体自体が凝集しやすいといった課題がある。

本研究では、これらの問題を解決するために、scFv に代わる NK 結合ドメインの人工抗体を取得することを目的とした（図 1A）。scFv の代わりに、人工抗体としてモノボディを用い、進化分子工学的手法の一種である TRAP 提示法（transcription-translation coupled with association of puromycin linker display）[1,2] を用いて NK 細胞上のタンパク質である 2B4 に結合するモノボディを選択した（図 1B）。その結果、K_D が数 nM で、かつ k_{off} が遅く外れにくい複数のモノボディを創製することに成功した。

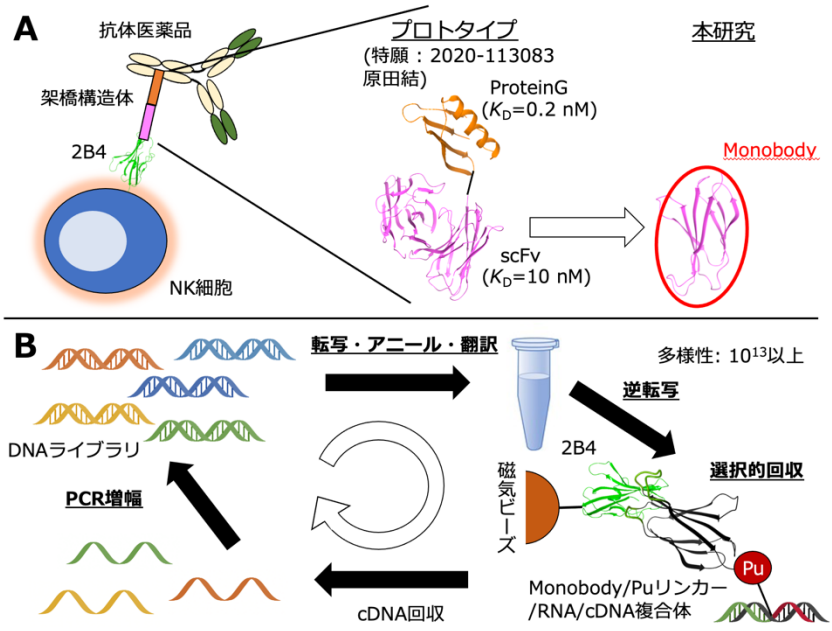


図 1 (A) 架橋構造体の構造 (B)TRAP 提示法の概略図

1. Ishizawa, T.; Kawakami, T.; Reid, P. C.; Murakami, H., *J Am Chem Soc.* 2013, 135 (14), 5433-40.
2. Kondo, T. et al., *Sci Adv.* 2020, 6 (42), eabd3916

構造情報に基づくアデノシン A_{2A} 受容体の化学遺伝学的活性化

○牧野碧・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

Chemogenetic activation of adenosine A_{2A} receptors focusing on structural information. (Graduate School of Engineering, Nagoya University) MAKINO, Midori; DOURA, Tomohiro, KIYONAKA, Shigeki

G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞外シグナルの伝達を介して広範な生理的プロセスに関与し、創薬標的として注目される。GPCR は発現する細胞種によって働きが異なることが知られるため、細胞種ごとでの機能解明が求められる。しかし従来の薬理学的な手法では細胞種選択的な GPCR の活性制御が難しく、個々の GPCR の詳細な機能は十分に解明されていない。このような背景から、個々の GPCR の機能解明に向けて、その発現位置や機能を変化させずに活性制御する手法が求められる。

そこで我々は特定の細胞で GPCR の活性制御を可能とする化学遺伝学的手法として Extracellular Loop-Engineered Chemogenetics (eLEC)を提唱している。本手法では内在性リガンドの結合位置から遠い細胞外ループ(ECL)に変異導入を行うことで、内在機能を保った変異体に対し人工リガンドによる変異体選択的な活性制御を可能とする手法である。これまでに class A や class C に属する GPCR において拮抗薬(アンタゴニスト)を用いた変異体選択的な活性制御系の構築を進めてきた。

本研究では、活性化剤(アゴニスト)を基盤とした $A_{2A}R$ の活性制御を検討した。アゴニストの結合過程での立体障害を軽減することを狙い、Adenosine と $A_{2A}R$ の結晶構造を基に $A_{2A}R$ の ECL2 や ECL3 に Ala を変異導入した変異型 $A_{2A}R$ を作製した。これらの変異型 $A_{2A}R$ について内在リガンドである adenosine による活性応答を測定した結果、変異型 $A_{2A}R$ は野生型と同等の活性応答を示した。これらの変異体の中で、リガンド結合ポケット上部で塩橋を形成する E169 や H264 に変異導入した変異型 $A_{2A}R$ に対して、既報の $A_{2A}R$ 選択的アゴニスト CGS21680 の 50%効果濃度(EC_{50})を測定したところ、野生型 $A_{2A}R$ よりも EC_{50} が数倍低濃度シフトした。E169 や H264 の側鎖の立体障害の軽減により CGS21680 との活性化能が向上したと考えられたため、E169 や H264 に近接する adenosine 6 位に置換基をもつ adenosine 誘導体を作製し、変異型 $A_{2A}R$ に対する EC_{50} を測定した結果、野生型 $A_{2A}R$ よりも EC_{50} が数十倍低濃度シフトした誘導体を見出した。

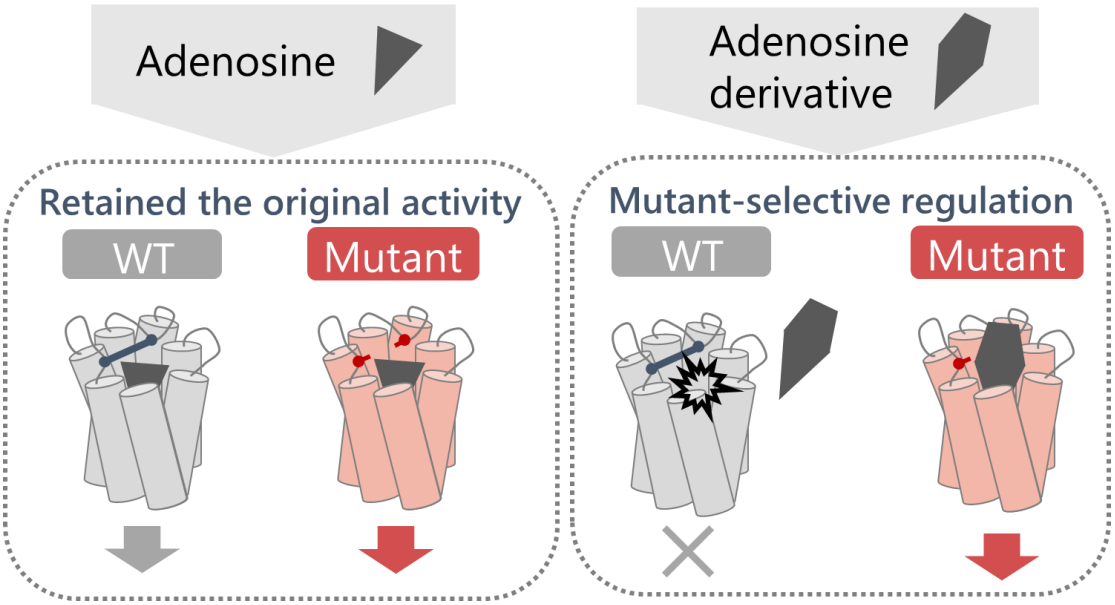


Fig. 1 Schematic of mutant-selective activation by eLEC

様々な配位子構造を持つ Pd 錯体を用いた mGlu1 の直交的活性制御法の模索

○倉掛涼香[1]・三浦裕太[1]・妹尾暁暢[1]・小島憲人[1,2]・浜地格[2]・清中茂樹[1]
（[1]名大院工、[2]京大院工）

Exploration of orthogonal activation of mGlu1 using Pd complexes having different ligands. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University [2]) KURAKAKE, Suzuka[1]; MIURA, Yuta[1]; SENOO, Akinobu[1], OJIMA, Kento[1,2]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

ヒトの脳にはおよそ 1000 億のニューロンと、その 10 倍以上におよぶグリア細胞が存在しており、記憶や学習を始めとした脳機能を調節している。ニューロンやグリア細胞に発現しているタンパク質の機能不全は、統合失調症やアルツハイマー病などの精神・神経疾患を引き起こす。そうした疾患の治療を目指して、神経細胞に発現しているタンパク質の機能解明が進められている。

目的の受容体の生理的機能を調べるためには、本来の機能を維持した状態で、目的の受容体のみを特異的に制御する手法が求められる。我々が開発を進めている配位ケモジェネティクス法は、受容体の特徴的な構造変化に着目した化学遺伝学的なアロステリック活性制御法であり、これまでに AMPA 型グルタミン酸受容体を始めとするいくつかの受容体に対し、人為的活性化及び人為的阻害法の開発に成功している(1)(2)。さらに、我々の最近の研究では、代謝型グルタミン酸受容体 I （mGlu1）において Histidine や Cysteine といった配位性アミノ酸を導入した三種の変異体と、Pd(bpy)、Cu^{2+}、Zn^{2+}の金属種間での直交的活性制御を達成した(3)。これは複数の脳領域に発現している mGlu1 を、細胞種特異的に解析できる点において有効な手法である。しかし生体内への適応を考慮した際には、生体内に多く存在する Cu^{2+}や Zn^{2+}に変わる金属種による選択性が求められる。

以上を踏まえ、本研究では Pd を用いて、配位子構造の違いによる配位ケモジェネティック直交的活性制御法の開発を目指した。Ligand binding domain の様々な位置に配位性アミノ酸を導入した mGlu1 変異体と、多様な Pd 錯体を用いて変異アミノ酸の側鎖の配向や周囲のアミノ酸との相互作用から選択性を生み出すことを狙う。本手法は、生体内に存在しない Pd 錯体を用いることで、生体内直交的活性化を実現できると期待される。

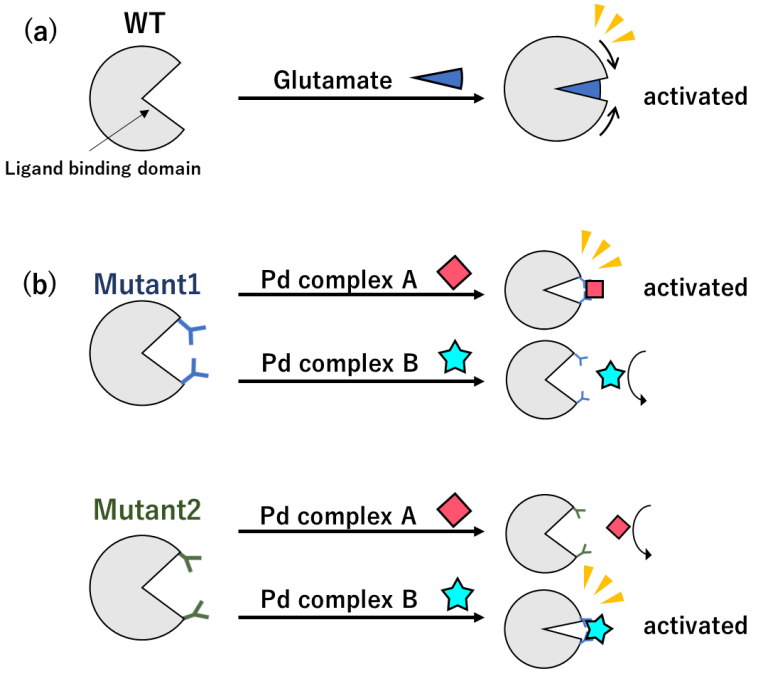


Fig. 1 (a) Glutamate-induced activation mechanism of mGlu1. (b)Orthogonal regulation of mGlu1 using Pd complexes.

1) S. Kiyonaka et al., *Nature Chem.* (2016)
2) K Ojima et al., *Nat. Commun.* (2022)
3) A. Senoo et al., *Front Chem.* (2021)

Poster Short Talk

Sat. Sep 10, 2022 6:00 PM - 6:30 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 9:00 AM - 9:30 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Short talks free discussions (P21-P40)

6:00 PM - 6:30 PM JST | 9:00 AM - 9:30 AM UTC

Short talks free discussions

Oral Session

Sat. Sep 10, 2022 9:40 AM - 10:40 AM JST | Sat. Sep 10, 2022 12:40 AM - 1:40 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Molecular recognition/Sugars, Lipids/DDS

Chair: Hiroki Akiba (Kyoto University)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[1C-02] Development of “OFF/ON” fluorescent probe for selective detection of prostate cancer cells

*Hiroaki Nagasaki[1], Naoki Tsutsumi[1], Yosuke Niko[1,2], Seiji Sakamoto[3], Itaru Hamachi[3], Masayuki Izumi[1,2], Rika Ochi[1,2] (1. Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Kochi University, 2. Faculty of Science and Technology, Kochi University, 3. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[1C-03] Fabrication of hexagon nanosheets based on α-helix formation of poly-L-lysine induced by biomolecules containing polyphosphate functionality

*Akihiro Kishimura[1,2,3,5], Ahmad Asmariah[1], Sooyeong Lee[1], Teruki Nii[1], Takeshi Mori[1,3], Yoshiki Katayama[1,2,3,4] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Molecular Systems, Kyushu University, 3. Center for Future Chemistry, Kyushu University, 4. Center for Advanced Medical Open Innovation, Kyushu University, 5. RIKEN Center for Emergent Matter Science)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[1C-04] Ergosterol concentration determined phase separation in liposomes and classification of phase-separation state using by machine learning

*Tsuyoshi Yoda[1] (1. Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, Hachinohe Industrial Research Institute)

前立腺がん細胞を選択的に検出可能な OFF/ON 型蛍光プローブの開発

○長﨑大明[1]・堤尚輝[1]・仁子陽輔[1,2]・坂本清志[3]・浜地格[3]・和泉雅之[1,2]・越智里香[1,2]（[1]高知大院総合、[2]高知大理工、[3]京大院工）

Development of "OFF/ON" fluorescent probe for selective detection of prostate cancer cells (Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Kochi University[1], Faculty of Science and Technology, Kochi University[2], Graduate School of Engineering, Kyoto University[3]) NAGASAKI, Hiroaki[1]; TSUTSUMI, Naoki[1]; NIKO, Yosuke[1,2]; SAKAMOTO, Seiji[3]; HAMACHI, Itaru[3]; IZUMI, Masayuki[1,2]; OCHI, Rika[1,2]

がんを早期発見・治療する上で、ターゲットとするがん細胞や組織を選択的に可視化（イメージング）できる蛍光プローブの開発が有用である。しかし、一般的な常に蛍光性を示すAlways-ON型蛍光プローブを用いた場合、濃度消光に起因する検出感度の低下や細胞外に残存する過剰な蛍光プローブの洗浄操作が必要であるなどの課題を抱えている。この課題を克服するため、本研究では前立腺がん細胞の選択的な検出を指向し、前立腺がん細胞に選択的に取り込まれ蓄積・凝集することで非蛍光性から蛍光性へとスイッチングするOFF/ON型蛍光プローブの開発を目指した。本目的を達成するため、分散状態では非蛍光性であるのに対し凝集状態では蛍光性へとスイッチングする光物理現象である凝集誘起発光（Aggregation-Induced Emission, AIE）特性[1)]に着目した。

当研究室で見出したAIE特性を示す蛍光色素部位**H-AAC**[2)]と、前立腺がん細胞表層の受容体と選択的に結合するリガンド部位**DUPA**[3)]、それらを連結するリンカー部位として炭化水素鎖（C6）と0～2残基のアミノ酸・ペプチド（PheまたはTyr）を導入した蛍光プローブ候補分子ライブラリ（Fig. 1）を設計・合成した。合成した分子ライブラリについて凝集能と蛍光特性を評価したところ、アミノ酸の残基数および配列に依存して蛍光強度や蛍光色が異なることが明らかとなった。合成した蛍光プローブを用いて、共焦点レーザー顕微鏡による生細胞イメージング実験を試みた。その結果、蛍光プローブの洗浄操作をおこなうことなく前立腺がん細胞を選択的に検出することに成功したので、その詳細について報告する。

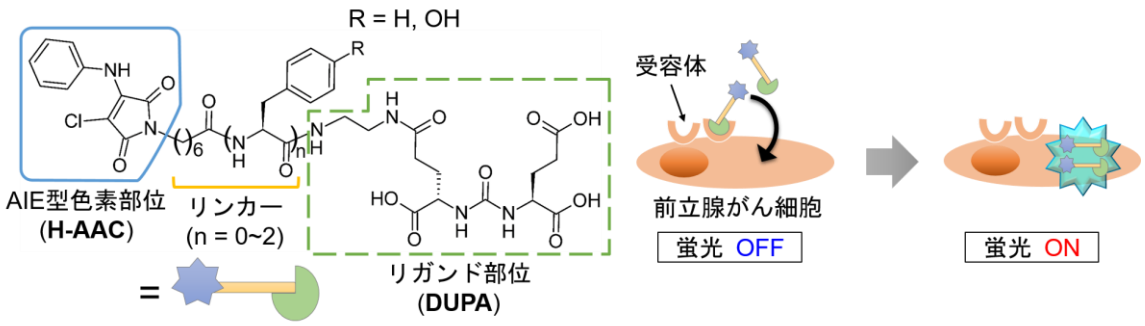


Fig. 1 本研究で開発した蛍光プローブの分子構造と細胞イメージングの模式図

1) J. Luo, B. Z. Tang *et al*., *Chem. Commun*., **2001**, 1740.
2) 堤尚輝, 越智里香ほか, 日本化学会第 102 春季年会(2022), A202-3vn-06.
3) R. Ochi, I. Hamachi *et al*., *Chem. Sci*., **2010**, *1*, 491.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

ポリリン酸含有生体分子により誘起されるポリ-L-リシン鎖のα-helix 形成に基づくヘキサゴンナノシートの作製

アーマド アスマリア[1]・リー スヨン[2]・新居輝輝[1]・森 健[1,3]・片山佳樹[1-4]・○岸村顕広[1-3,5]（[1]九大院工, [2]九大 CMS, [3]九大 CFC, [4]九大先端医 OIC, [5]理研創発物性セ）

Fabrication of hexagon nanosheets based on α-helix formation of poly-L-lysine induced by biomolecules containing polyphosphate functionality (Faculty of Engineering, Kyushu University[1], Center for Molecular Systems, Kyushu University[2], Center for Future Chemistry, Kyushu University[3], Center for Advanced Medical Open Innovation, Kyushu University[4], RIKEN Center for Emergent Matter Science[5]) AHMAD, Asmariah[1]; LEE, Sooyeon[1]; NII, Teruki[1]; MORI, Takeshi[1,3]; KATAYAMA, Yoshiki[1-4]; KISHIMURA, Akihiro[1-3,5]

我々はこれまで、ポリエチレングリコール（PEG）と荷電連鎖からなるブロック共重合体を用いて、ポリイオンコンプレックス（PIC）からなるユニラメラ型ベシクルを作製することに成功してきた。しかし、従来用いてきたポリペプチド由来のポリアニオンとポリカチオンからでは、厚さ 15 nm 程度のナノ PIC 膜が閉じてベシクルになるか [1]、ラメラ構造を基本要素とする３次元ネットワーク状組織体（いわゆるコアセルベート）にしかならず [2]、単独のナノシートとして得ることはできていなかった。本研究では、ポリ-L-リシン（PLL）をカチオン成分、生体分子であるアデノシン三リン酸（ATP）をアニオン成分として PIC 形成するとα-helix 形成を伴うコアセルベートを与えることをヒントに、PEG-*b*-PLL を用いてα-helix を含む硬い PIC 膜を形成させ、ナノシート構造を作製することを試みた。

カチオン性ポリマーとして分子量約 2,000 の PEG 鎖と重合度約 70 の PLL からなるブロック共重合体 PEG-*b*-PLL、アニオン性物質として ATP（荷電数: –4）、アデノシン二リン酸（ADP; 荷電数: –3）、アデノシン一リン酸（AMP; 荷電数: –2）、グアノシン三リン酸（GTP; 荷電数: –4）、三リン酸ナトリウム（STP; 荷電数: –5）、5-phospho-D-ribose-1-diphosphate disodium salt（PRDP; 荷電数: –5）を用い、荷電比が 1:1 になるように 50 mM リン酸バッファー（pH 7.4）中で PIC 形成を行った（最終的な全ポリマー濃度 1.0 mg/mL）。Cy3 で蛍光標識した PEG-*b*-PLL を用い、ATP と混合して得られた PIC を蛍光顕微鏡、透過型電子顕微鏡により観察し、動的光散乱により分析したところ、ミクロンサイズの粒子形成が確認され、１辺の長さが 1 μm 程度の正六角形（ヘキサゴン）構造体の形成が確認された（Fig. 1）。さらに wet 状態での原子間力顕微鏡（AFM）測定から、厚みが約 20 nm で均一なナノシートであることがわかった。従来のベシクルの膜厚が約 15 nm 程度であることから、このヘキサゴンナノシートは、PEG 層にサンドイッチされた PIC 膜であると推定される。また、CD 測定から、α-helix 形成が確認された。次に、ADP と AMP を用いて PEG-*b*-PLL と PIC 形成を行った。しかし、DLS 測定では有意な粒子形成が、CD 測定ではα-helix 形成が確認できなかった。一方で、GTP、STP、PRDP を用いるとα-helix 形成が認められ、PRDP からは ATP の時と同様のヘキサゴンナノシートの形成が、GTP と STP からはより小さなヘキサゴンの凝集体が得られた。以上より、あるサイズ以上のポリリン酸が PLL 鎖のα-helix 形成を誘起し、それが閉じないナノシート形成に必須であることがわかった。また、ポリリン酸部の荷電の強さや、それ以外の部位の二次的相互作用がα-helix 形成後の集合化に影響を及ぼすことが示唆された。

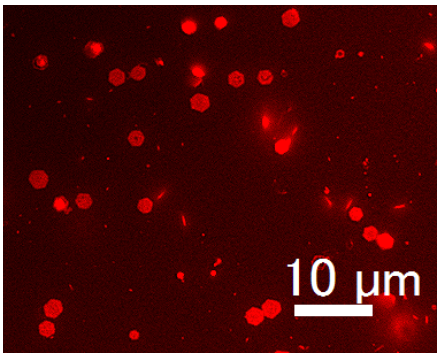


Fig. 1 A representative fluorescence micrograph of PIC particles obtained from PEG-*b*-PLL and ATP.

1) Y. Anraku, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 1631–1636.
2) A. Wibowo, et al., *Macormolecules* **2014**, *47*, 3086−3092

エルゴステロール濃度によるリポソームの相分離状態と機械学習による分類

○依田毅[1]（[1]青森産技八工研）

Ergosterol concentration determined phase separation in liposomes and classification of phase-separation state using by machine learning (Hachinohe Industrial Research Institute Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center [1]) YODA, Tsuyoshi[1]

【背景・目的】

細胞膜を構成する脂質は、大まかに不飽和脂質、飽和脂質、ステロールに分けられることが知られていた。細胞膜上には飽和脂質とコレステロールが豊富な領域“ラフト”が有るという仮説が提唱されている[1]。脂質を混合して作製されたモデル細胞膜小胞であるリポソーム上では相分離ドメイン構造として観察されてきた。動物細胞に特有のステロールはコレステロール(Chol)であり、酵母細胞特有のステロールはエルゴステロール(Erg)である。細胞サイズリポソームを用いて Erg 濃度の影響を調査した研究はなかったが、Chol との違いを調べようと考えた。そこで、Erg の濃度に応じて、不飽和脂質、飽和脂質、Erg からなる細胞サイズリポソームの相分離ドメイン構造が、Chol の場合とどのように異なるかを明らかにしたいと考えた。

また、細胞サイズリポソームの相分離ドメイン構造の決定は観察者が決定していたが、この手順を自動化できるのではないかと考えた。最近使われている機械学習による画像識別ツール Teachable machine を用いて、このドメイン構造の画像解析で自動的に識別できるかどうかを調べ、観察による結果決定と一致するかどうかを調べた。

【結果・考察】

室温で観察した結果、Erg 含有リポソームでも Chol 含有リポソームと同様に相分離ドメイン構造を持つリポソームが観察された(図 1)。Erg 含有リポソームでの固体秩序相(Solid ordered, (So)) /液体無秩序相(Liquid disordered (Ld))相分離は、Chol 含有のそれよりも広い濃度範囲であった。対照的に、Erg 含有リポソームでの液体秩序相(Liquid ordered (Lo)) / Ld 相分離およびリポソーム形成の濃度範囲は、Chol 含有リポソームのそれよりも狭かった。これは Erg の化学的構造に基づくものであり、酵母がより広い温度域など様々な環境下で活動できることとも関わっているのではないかと考察した。

さらに本研究では、機械学習により細胞サイズリポソーム上の So / Ld および Lo / Ld、ドメイン構造を持たないリポソームの識別を試みた。分類を見直すことや教師データ数を増やすことで、観察による結果と機械学習による判別結果の一致度が改善されることが分かった[2]。

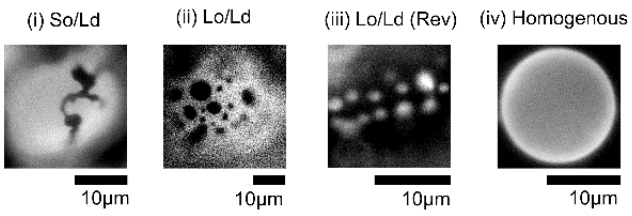


図 1 観察された相分離ドメイン構造を持つリポソーム(i) 固体秩序相(Solid ordered, (So)) /液体無秩序相(Liquid disordered (Ld)) 相分離 (ii),(iii) 液体秩序相(Liquid ordered (Lo)) / Ld 相分離及び(iv)相分離ドメイン構造を持たない均一なリポソーム。[2]

【謝辞】本研究は公益財団法人コニカミノルタ科学技術振興財団、公益財団法人松籟科学技術振興財団、公益財団法人インテリジェント・コスモス学術振興財団、科学研究費若手研究の助成によって行われた。深く謝意を表する。

【参考文献】[1] K.Simons and E. Ikonen *Nature* 1997 [2] T. Yoda, *submitted*

Oral Session

Sat. Sep 10, 2022 2:40 PM - 3:40 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 5:40 AM - 6:40 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Molecular recognition/Sugars, Lipids/DDS

Chair: Yoshiyuki Manabe (Osaka University, Graduate School of Scinece)

2:40 PM - 3:00 PM JST | 5:40 AM - 6:00 AM UTC

[1C-05] Cell-cell aggregates formation by the ion-pair-enhanced target-directed strained-diyne

*Moeka Yoshinaga[1], Kohei Kitagawa[1], Manami Takeuchi[1], Hiroshi TSUGAWA[1], Hitoshi TAKEMAE[2], Masayuki TERA[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

3:00 PM - 3:20 PM JST | 6:00 AM - 6:20 AM UTC

[1C-06] Thermo-responsive intracellular delivery of polymeric micelle by arginine density switching

*Sota Yamada[1], Eita Sasaki[1], Kenichi Nagase[1], Kenjiro Hanaoka[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University)

3:20 PM - 3:40 PM JST | 6:20 AM - 6:40 AM UTC

[1C-07] Prodrug activation based on the reaction with acrolein in cancer

*Kazuki Terashima[1], Ambara R. Pradipta[1], Katsunori Tanaka[1,2] (1. Department of Chemical Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, RIKEN Cluster for Pioneering Research)

イオン対形成を駆動力とした標的指向性歪みジインによる細胞-細胞凝集体の作製

○吉永萌華[1]・北川浩平[1]・竹内愛美[1]・津川裕司[1]・竹前等[2]・寺正行[1]（[1]東農工大院工、[2]東農工大農）

Cell-cell aggregates formation by the ion-pair-enhanced target-directed strained-diyne (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1], Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology[2]) YOSHINAGA, Moeka[1]; KITAGAWA Kohei[1]; TAKEUCHI Manami[1]; TSUGAWA, Hiroshi[1]; TAKEMAE, Hitoshi[2]; TERA, Masayuki[1]

生体直交反応は生体分子を化学修飾する有用な手法であり、歪み促進型アジド-アルキン付加環化反応 (SPAAC) 等が知られている。分子内に二つの歪んだアルキンを有するジベンゾシクロオクタジイン (CODY) は、二度の SPAAC 反応によりアジド二分子を自発的に連結できる[1]。しかし、CODY の疎水性や化学的不安定性は、生体分子への応用において課題となっていた。当研究室では、CODY に様々な極性官能基を有する側鎖を導入し、水溶性を向上させた WS-CODY 類を開発している[2]。そこで本研究では、WS-CODY 側鎖の電荷と標的分子との静電相互作用による反応加速効果を分子レベルで検証し、これに立脚した難接着性細胞の細胞-細胞間接着を検討した。

まずカチオン性、アニオン性の側鎖をそれぞれ有する WS-CODY (**1**, **2**) を合成し、中性およびアニオン性アジド低分子との反応速度定数を測定した。その結果、**1** とアニオン性のアジドの組み合わせで反応速度が顕著に増大し、WS-CODY とアジド分子の側鎖間でのイオン対形成により連結反応が加速することを見出した (Fig.1A)。そこで、このイオン対形成による反応加速効果を利用しタンパク質のラベル化を試みた。中性条件下で負に帯電しているα1-酸性糖タンパク質および正に帯電しているリゾチームのリジン残基の一部をアジド修飾後、両者を混合し **2** とアジド蛍光分子を作用させたところ、リゾチーム選択的なラベル化に成功した (Fig.1B)。以上より、WS-CODY はアジド基との生体直交性を保持しつつ、優れた標的指向性を有していることが分かった。最後に、WS-CODY を介した細胞同士のクロスリンクを試みた。まずヒト肺癌由来の難接着性細胞株である PC-9 に *N*-アジドアセチルマンノサミンを添加培養し、代謝的に細胞表面にアジド基を導入した[3]。アジド標識した PC-9 細胞に対し **1** を作用させ、さらにアジド標識 PC-9 細胞と混合、遠心処理することで細胞凝集体の形成を確認した (Fig.1C, D)。当該の細胞凝集体を 48 時間培養後に RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った結果、細胞間接着関連遺伝子の発現量が増加していることを見出し、WS-CODY による細胞間の共有結合が生物学的な細胞接着因子を誘導していることが示唆された。

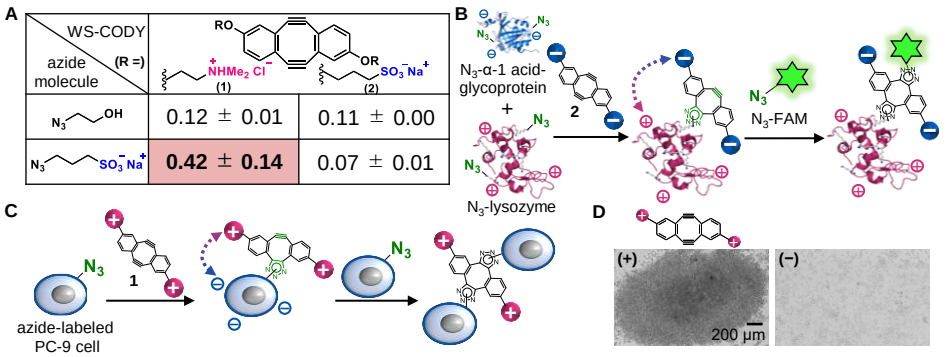


Fig.1 (A) The apparent second-order reaction rate constants (M^{-1} s^{-1}) between WS-CODYs and the azide molecules. (B) Schematic illustration of protein labeling. (C) Schematic illustration of PC-9 cell adhesion. (D) Image of cell aggregation by WS-CODY (**1**).

[1] I. Kii *et al*., *Org. Biomol. Chem*., **8**, 4051 (2010); [2] M. Tera *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*., **57**, 15405 (2018); [3] C. R. Bertozzi *et al*., *Science*, **287**, 2007 (2000).

アルギニン密度の温度スイッチングによる高分子ミセルの細胞内送達

○山田創太・佐々木栄太・長瀬健一・花岡健二郎（慶應大院薬）

Thermo-responsive intracellular delivery of polymeric micelle by arginine density switching (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University) YAMADA, Sota; SASAKI, Eita; NAGASE, Kenichi; HANAOKA, Kenjiro

温度や光、pH といった刺激に応答して細胞内取込を誘導する技術により、薬物を標的組織に選択的に送達することが可能である。特に、細胞膜透過ペプチド (CPP: Cell Penetrating Peptide) は強力な取込促進効果を示すため、CPP の活性制御が盛んに研究されている。これまでに報告されている代表的な手法として、CPP に保護基を導入することで活性をオフにし、刺激に応答した脱保護によって活性をオンにスイッチさせる戦略が一般的に知られている。しかしながら、刺激後に再びオフに戻すことは難しく、生体内では血流に運ばれて刺激部位（標的組織）以外にも取込まれる懸念がある。

そこで本研究では、刺激に応答して CPP 活性を可逆的にスイッチできる薬物キャリアの開発を目指した。ここで我々は、オリゴアルギニンが一定の残基数以上で、急激に CPP 活性を発現することに着目した。この残基数を局所密度と捉えて、閾値をまたいで「アルギニン密度を変化」させることで CPP 活性を制御する戦略を考案した（**図 1**）。密度を変化させる仕組みとして、温度に応答して伸び縮みする温度応答性高分子を利用した。具体的には、アルギニンを低密度で鎖中に導入した温度応答性高分子を表面に有し、内部に疎水性化合物を搭載できるナノ粒子（高分子ミセル）を設計した。

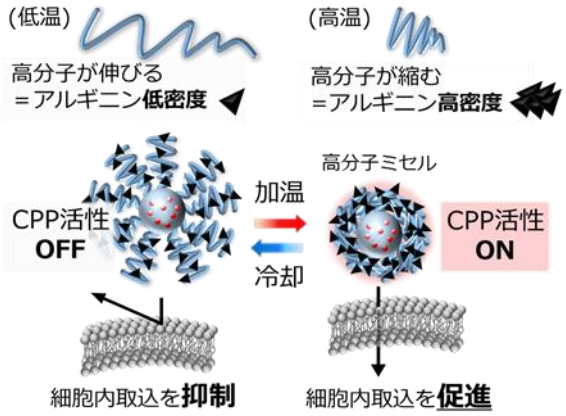


図1 アルギニン密度変化によるCPP活性制御

高分子ミセルの応答温度を約 40°C に調節することで、生理的温度である 37°C（低温）における細胞内取込を抑制した。一方、臨床でも適用可能な 42°C（高温）に加温した時には、高分子の収縮に伴うアルギニン密度の上昇を介して、CPP 活性をオンにスイッチさせ、高分子ミセルの細胞内取込を促進させた。さらに、培養細胞に高分子ミセルを処置して加温 (42°C) と冷却 (37°C) を繰り返したところ、取込の促進は加温中のみ確認され、加温を止めると取込はほとんど起こらなかった（**図 2**）。このように、温度に応答した CPP 活性の可逆的なスイッチングに成功した。

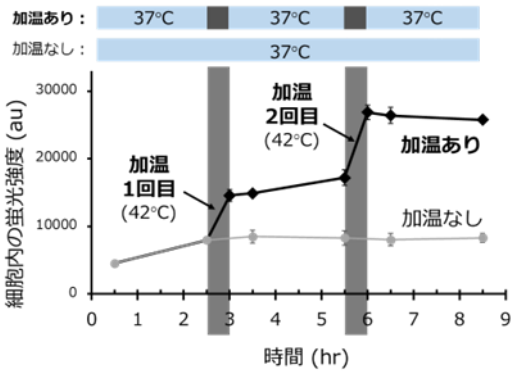


図2 温度による細胞内取込の可逆的な制御

最後に、*in vivo* において標的組織へのターゲティング能を評価した。正常マウスに高分子ミセルを尾静脈投与して左耳を局所加温したところ、高分子ミセルの集積率は加温した左耳で有意に増大した（**図 3**）。このように、温度に応答した組織選択的な送達を達成した。

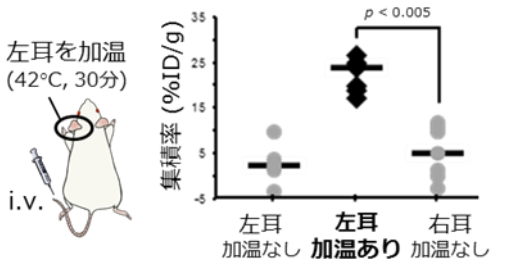


図3 *in vivo*における温度応答性ターゲティング

本研究で開発した高分子ミセルは、局所加温との併用により、任意の標的へ薬物送達できると期待される。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

がん代謝物との反応を基盤とするプロドラッグ法

○寺島一輝[1]・Ambara R. Pradipta[1]・田中克典[1,2]（[1]東工大物質理工、[2]理研 開拓研究本部 田中生体研）

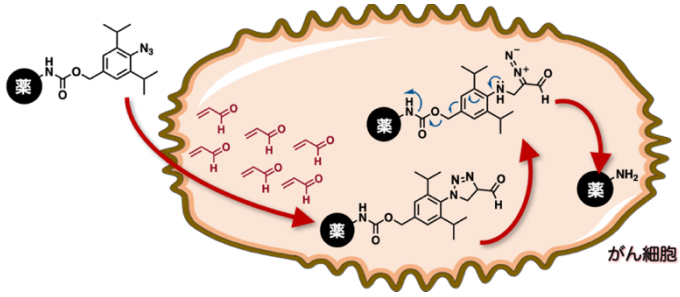
Prodrug activation based on the reaction with acrolein in cancer (School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology[1], Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, RIKEN, Cluster for Pioneering Research[2]) TERASHIMA, Kazuki[1]; AMBARA R. Pradipta[1]; TANAKA, Katsunori[1,2]

がん治療における化学療法は、抗がん剤の投与によりがん細胞の増殖、転移を防ぐ有用な治療法である。しかしながら抗がん剤は、がん細胞が正常細胞と比較して代謝が活発であることを利用して、細胞毒性化合物をがん組織に優先的に作用させる場合が多く、正常細胞にも少なからず作用し、副作用を起こす。正常細胞への毒性を減らすためには、抗がん剤を選択的にがん組織に送達する必要がある。

当研究室では以前、がん細胞においてアクロレインが特異的に大量発現していることを発見した[1)]。さらに、2 位と 6 位にイソプロピル基を導入したフェニルアジド分子によりアクロレイン分子を選択的に補足できることを発見し、フェニルアジド分子に蛍光基を結合させることでがんを診断する方法を確立した。本研究では、フェニルアジドとアクロレイン分子が反応した後、アジド基が電子豊富なアミノ基に変換されることを利用することとした。すなわち、薬剤分子をカルバメートリンカーを通してフェニルアジドで保護しておき、がん細胞内でアクロレインと反応した後、活性な薬分子を放出することで選択的ながん治療を行うプロドラッグ法を考案した。(Fig.1)。

出発物の 2,6-ジイソプロピルアニリン分子から 6 段階を経て抗がん活性分子のプロドラッグ体の合成を行った。抗がん活性分子としては Mitomycin C, Doxorubicin 等を採用した。いずれの段階も良好な収率で合成を進めることができた。合成したプロドラッグを用いて、A549, HeLa, MCF-10A 細胞に対する毒性試験を行ったところ、元の薬剤分子と比較して、正常細胞である MCF-10A では細胞毒性が大きく低下した一方で、がん細胞である A549,HeLa においては変わらず強い細胞毒性を示した。このことから合成したプロドラッグ分子はがん細胞でのみアクロレインと反応して活性を示すことが確認された。さらに、プロドラッグを用いて A549 を発現させたマウスに対しての腫瘍内、及び静脈投与による動物実験を行った。薬分子を直接投与した場合、マウスに危篤な副作用を起こし大変短い期間で死亡してしまったが、プロドラッグ体を投与した場合には副作用は確認されず強い抗がん活性を示すと共に、長期に渡り高い生存率を保った。このことから我々は、がん細胞で特異的に発現しているアクロレインとの選択的な反応を利用したプロドラッグ技術の開発に成功した[2)]。

Fig1. Prodrug activation mechanism based on the reaction with cancer endogenous acrolein



1) T. Tanei, A. R. Pradipta, K. Morimoto, M. Fujii, M. Arata, A. Ito, M. Yoshida, E. Sagitbatalova, A. Kurbangalieva, J.-I. Ikeda, E. Morii, S. Noguchi and K. Tanaka, *Adv. Sci*., 2019, **6**, 1801479

2) A. R. Pradipta, P. Ahmadi, K. Terashima, K. Muguruma, M. Fujii, T. Ichiro, S. Maeda, K. Tanaka, Chem Sci, 2021,12,5438-5449

Oral Session

Sat. Sep 10, 2022 3:50 PM - 4:50 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 6:50 AM - 7:50 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Molecular recognition/Sugars, Lipids/DDS/Medical biology

Chair: Rie Wakabayashi (Faculty of Engineering, Kyushu University)

3:50 PM - 4:10 PM JST | 6:50 AM - 7:10 AM UTC

[1C-08] Effect of functional porphyrin positions against accumulation in cancer cells

*Toshifumi Tojo[1], Koshi Nishida[1], Ayano Niiuchi[1], Takeshi Kondo[1,2], Makoto Yuasa[1,2] (1. Faculty of Science and TEchnology, Tokyo University of Science, 2. Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science)

4:10 PM - 4:30 PM JST | 7:10 AM - 7:30 AM UTC

[1C-09] Design of weakly acidic pH-responsive histidine derivative incorporated liposomes

*Ayumi Kashiwada[1], Narumi Taoka[1], Yukiha Chijimi[1], Misaki Kobayashi[1] (1. College of Industrial Technology, Nihon University)

4:30 PM - 4:50 PM JST | 7:30 AM - 7:50 AM UTC

[1C-10] Induction of Programmed Cell Death in Cancer Cells Induced by Hybrid Compounds of Cyclometalated Iridium Complexes and Triptycenes with Peptides and Mechanistic Study

*Shin Aoki[1,2,3], Kenta Yokoi[1], Kohei Yamaguchi[1], Mayuk Nii[1], Chandrasekar Chandrasekar [2,3] (1. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2. Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science, 3. Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science)

がん細胞集積性におけるポルフィリン官能基修飾位置の効果

○東條敏史[1]・西田光志[1]・新内綾乃[1]・近藤剛史[1,2]・湯浅真[1,2]

（[1]東理大理工、[2]東理大総研）

Effect of functional porphyrin positions against accumulation in cancer cells (Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science[1], Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science[2]) TOJO, Toshifumi[1]; NISHIDA, Koshi[1]; NIIUCHI Ayano[1]; KONDO Takeshi[1,2]; YUASA Makoto[1,2]

18π 共役系を有するポルフィリンは、生体内に存在するタンパク質との親和性が高いことが知られている。がん細胞はエンドサイトーシスの活発化に伴い、積極的にタンパク質を取り込むことが明らかになっており、タンパク質と結合したポルフィリンの能動的な取り込みに起因するポルフィリンのがん細胞集積性が示唆されている。その特徴を利用してがん診断における分子イメージングや光線力学療法への応用研究がなされている。一方で、ポルフィリンの官能基修飾位置を吟味した分子設計は十分に検討されていない。ポルフィリンには官能基を修飾できる位置が 2 種類存在し、それぞれ meso 位、β 位と呼ばれている。官能基修飾位置によりがん細胞集積性が変化するのか系統立った研究は十分に行われておらず、有効な修飾位置を精査することにより既存品以上にがん細胞に集積して高い機能性を有するポルフィリン誘導体を創造できる可能性を秘めている。以上を踏まえて、ポルフィリンの官能基修飾位置とがん細胞集積性の相関関係を明らかにすることを本研究の目的とした。

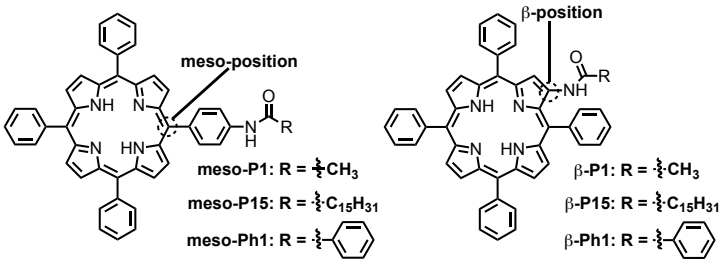


Fig 1. Structures of porphyrin derivatives

評価化合物として、アルキル基(炭素数: 1, 15)およびフェニル基を meso 位と β 位にそれぞれ有するポルフィリン誘導体を選定した (Fig 1)。これらの化合物をヒト乳がん細胞(MCF-7)に添加してインキュベーションした後に、細胞溶解液を調整して蛍光測定することにより集積したポルフィリン量を算出した。その結果、アルキル基を有するポルフィリンにおいては、炭素数によらず meso 位修飾型ポルフィリンの方が高いがん細胞集積性を示した。一方で、フェニル基を有するポルフィリンにおいては、β 位修飾型ポルフィリンの方が高いがん細胞集積性を示し、がん細胞集積性において官能基の種類により優位な修飾位置が異なることが示唆された (Table 1)。次に、血中タンパク質のひとつであるアルブミンとポルフィリン誘導体の親和性を評価するために、蛍光消光法を用いてアルブミン-ポルフィリン間の結合定数を算出した。その結果、結合定数の序列はがん細胞集積量の序列と一致した (Table 1)。以上より、ポルフィリンの官能基修飾位置によりアルブミンとの親和性が変化することにより、ポルフィリンのがん細胞集積性が変化することが示唆された。

Table 1. Accumulation of Porphyrin derivatives in MCF-7 cells (incubation time: 6 h) and binding constants between albumin and porphyrin derivatives

	Accumulation in cancer cell (μM)	Binding constant ($L \cdot mol^{-1}$)
meso-P1	5.66×10^{-2}	3.81×10^{4}
β-P1	4.46×10^{-2}	2.86×10^{4}
meso-P15	4.50×10^{-2}	3.12×10^{4}
β-P15	1.66×10^{-2}	1.98×10^{4}
meso-Ph1	5.53×10^{-2}	3.95×10^{4}
β-Ph1	14.7×10^{-2}	4.46×10^{4}

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

弱酸性 pH 応答性ヒスチジン誘導体導入リポソームの設計

○柏田　歩・田岡成美・縮　雪羽・小林美咲（日本大生産工）

Design of weakly acidic pH-responsive histidine derivative incorporated liposomes (College of Industrial Technology, Nihon University) KASHIWADA, Ayumi; TAOKA, Narumi; CHIJIMI, Yukiha; KOBAYASHI, Misaki

リポソームはその良好な生体適合性や生分解性から，化学療法における薬物または遺伝子送達担体として実用化されているとともに，現在でも広く研究がなされている。適切なサイズに調整されたリポソーム担体は EPR 効果を利用した細胞レベルでの物質送達において有効である。しかしながら，標的細胞付近に到達後，リポソームがエンドソーム膜内に取り込まれた際にその酸性環境において担持物質とともに分解に至ることが懸念される。すなわち、エンドソームにおける弱酸性条件下でリポソームから内封物質を放出させ，サイトゾルに移行させるための応答性付与が不可欠となる。そこで，エンドソーム脱出促進のための戦略として，pH 応答性脂質膜攪乱分子を脂質二重層中に導入したリポソームの設計が効果的であると考える。

われわれは pH 応答性脂質膜攪乱分子として種々のアルキル鎖長を有するヒスチジン誘導体（Cn-His : n = 8, 12, 18）を設計し，リポソームの脂質二重層中への導入を試みた。ヒスチジンのイミダゾール基の p*K*a は 6.0 付近であるため，生理条件下においては Cn-His は脂質膜の秩序を乱すことなく，脂質二重層中に存在すると考えられる。一方，エンドソーム環境下に相当する弱酸性条件下ではイミダゾール基のプロトン化により Cn-His は脂質膜の秩序を大きく乱すことが予想され，リポソームからの担持物質放出を引き起こすことが期待される。

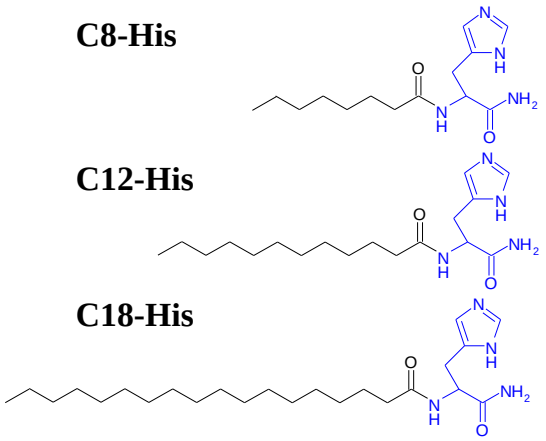


Figure 1 Structure of sensitizer molecules (Cn-His).

Cn-His（n = 8, 12, 18）をそれぞれ 1.0 mol% 含む DOPC リポソームの内水相に消光濃度のカルボキシフルオレセイン（CF）を封入し，生理条件に相当する pH 7.5 およびエンドソーム環境に相当する pH 5.5 の緩衝液中における CF の放出挙動を評価した。その結果，C8-His および C12-His を含む DOPC リポソームに関しては pH 5.5 における顕著な CF の放出挙動が認められた。しかしながら，より顕著な CF 放出挙動が観測された C8-His 導入系では pH7.5 においてもわずかながら CF の不要な漏出が認められた。そこで，リポソーム構成脂質依存性の評価や新規な Cn-His 誘導体の設計に関して試みたので，講演において報告する。さらに，弱酸性条件下における C8-His または C12-His の脂質二重層秩序の乱れへの寄与について評価を行うため，DOPC リポソームの脂質二重層にナイルレッド（NR）を導入し，pH の異なる条件下での NR 放出挙動を評価した結果に関しても併せて報告する。

本研究における成果は新規なドラッグ・デリバリー担体としてのエンドソーム環境応答性リポソームの創製に寄与できるものと考える。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

シクロメタレート型イリジウム錯体とトリプチセンのペプチドハイブリッド化合物によるがん細胞のプログラム細胞死誘導とメカニズム解析

○青木伸[1,2,3]・横井健汰[1]・山口晃平[1]・新居真由香[1]・Chandrasekar Balachandran[2,3]
（[1]東京理大薬、[2]東京理大総合研究院、[3]東京理大生命研）

Induction of Programmed Cell Death in Cancer Cells Induced by Hybrid Compounds of Cyclometalated Iridium Complexes and Triptycenes with Peptides and Mechanistic Study (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science[1], Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science[2], Research Institute for Biomedical Sciences, Tokyo University of Science[3]) AOKI, Shin[1,2,3]; YOKOI, Kenta[1]; YAMAGUCHI, Kohei[1]; NII Mayuka[1]; BALACHANDRAN Chandrasekar[2,3]

プログラムされた細胞死（Programmed Cell Death, PCD）は、固体の生命維持のために遺伝子によって制御された細胞死であり、発生時の形態形成や恒常性維持、がん、自己免疫疾患、ウィルス感染症等と密接に関わっている。従来、細胞死は「PCD としてのカスパーゼ依存性 apoptosis」と「受動的な死＝necrosis」が知られていたが、最近 necroptosis、autophagic cell death、paraptosis など多様な PCD 様式が明らかになり、それらを利用するがん治療に期待が寄せられている[1)]。例えば apoptosis 耐性を獲得したがん細胞の細胞死を誘導するために、異なる PCD を誘起する薬剤の開発が重要である。

我々は、シクロメタレート型イリジウム(Ir(III))錯体と塩基性ペプチドのハイブリッド化合物(Ir(III) complex-peptide hybrids as amphiphilic peptide conjugates, IPH-ACs)が、Jurkat 細胞の paraptosis[2)]を誘導することを見出した[3)]。これらの化合物は死細胞中で発光強度が増大するので、IPH-ACs は paraptosis 誘導剤と死細胞検出剤という二つの機能を有している。この paraptosis 誘導機構の解析を行ったところ、IPH-ACs が小胞体とミトコンドリアの膜融合（または膜接合）、小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+}輸送、ミトコンドリア膜電位低下、細胞内小器官の液胞化を誘導し paraptosis を誘導することがわかった。

次に、IPH-AC の中心骨格である Ir 錯体を有機分子であるトリプチセンへ変更した triptycene-peptide hybrids as amphiphilic peptide conjugates, TPH-ACs)の設計と合成を行い、Jurkat 細胞に対して IPH-ACs より強い paraptosis 誘導活性を有することを見出した[4)]。また、IPH-ACs では抗がん活性が弱かった HeLa 細胞などに対しても paraptosis を誘導することを明らかにした。さらにそのメカニズムが、すでに報告されていた celastrol というテルペノイドによる paraptosis[5)]と異なることから、celastrol による PCD を paraptosis I、IPH-ACs や TPH-ACs による PCD を paraptosis II と定義した[3e,g)]。本発表では、これらの結果について報告する予定である。

(1) (a) Lee, D., *et al. Pharm. Therap.,* **2016**, *162*, 120-133. (b) Wang, Y., *et al*. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *118*, 109203.
(2) Spernandio, S., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14376–14381.
(3) (a) Hisamatsu, Y., *et al. Bioconjugate Chem.* **2015**, 26, 857-879. (b) Yokoi, K., *et al. ACS Omega* **2020**, 5. 6983-7001. (c) Balachandran, C., *et al*. *Molecules* **2021**, *27*, 7028 (32 pages). (d) Haribabu, J.*, et al. Eur. J. Inorg. Chem.* **2021**, *2021*, 1796-1814. (e) Yokoi, K., *et al. Biochemistry* **2022**, *61*, 639-655. (f) 青木ら, 有機合成化学協会誌 **2021**, *79*, 1113–1124. (g) Aoki, S., *et al. Top. Curr. Chem.* **2022**, in press.
(4) Yamaguchi, K. *et al. Bioconjugate Chem.* **2022**, *33*, 691-717.
(5) (a) Wang, W. B., *et al. J. Cell Physiol.* **2012**, *227*, 2196-2206. (b) Yoon, M. J., *et al. Oncotarget* **2014**, *5*, 6816-6830.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Poster Short Talk

Sat. Sep 10, 2022 5:00 PM - 6:00 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 8:00 AM - 9:00 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Poster short talks (P41-P59)

[P41] Selective Recognition of Unprotected Peptides by the Closed Cavity of a Polyaromatic Capsule

*Mayu Shuto[1] (1. Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech)

[P42] A Photoswitchable fluorescent Probe Using a Photochromic Quencher with High Photostability Assisted by Protein-Surface Modification

*Kenji Torii[1], Yuichiro Hori[2], Kazuya Kikuchi[1,3] (1. Graduate School of Engeering, Osaka University, 2. Faculty of Sciences, Kyushu University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[P43] Induction of protein–sugar weak interactions by co-encapsulation within a self-assembled spherical cage

*Miri Tadokoro[1], Takahiro Nakama[1], Makoto Fujita[1,2] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Molecular Science)

[P44] Self-assembly of Imidazolyl Zinc Porphyrins in Lipid Bilayer Membrane

*Yuto Iura[1] (1. Graduate School of Science, Tokyo University of Science)

[P45] Characterization and Reactivity Studies on a Series of Rare Cu(II)-halide Complexes Having Distorted Tetrahedral Geometries as Model Complexes of Type 1 Copper Centers

*Lan Yang[1], Yuma Morimoto[1], Hideki Sugimoto[1], Shinobu Itoh[1] (1. Osaka University)

[P46] Construction of artificial hemoprotein multimers based on metal coordination to recognize biomolecules

*Hiroaki Inaba[1], Yuma Shisaka[1], Garyo Ueda[1], Erika Sakakibara[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Hiroshi Sugimoto[2], Osami Shoji[1] (1. Graduate school of Science, Nagoya University, 2. RIKEN SPring-8)

[P47] Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing photoinduced elimination of axial ligand of metallophthalocyanines

*Kohei Nogita[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P48] Energy-independent lipid-membrane permeation of co-assemblies formed through complementary interaction

*Hiroki Obayashi[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1,2], Masahiro Goto[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P49] Analysis of *O*-glycan type oligosaccharides in prostate cancer cells under hypoxia and elucidation of their functions in cell migration using saccharide primer method

*Daiki Yamamoto[1], Takeo Kosaka[2], Mototsugu Oya[2], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University, 2. Keio University School of Medicine)

[P50] NMR analysis using H/D isotope shifts to explore the hydration behavior of carbohydrates

*Hiroaki Tatsuoka[1], Takumi Yamaguchi[1,2] (1. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University)

[P51] Profiling of glycans in animal cells by the saccharide primer method and correlation analysis with influenza virus susceptibility

*Mayu Okuda[1], Kazuma Ohgata[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P53] Exploration of drug-resistant factors in gastric circulating tumor cells by single-cell transcriptome analysis

*Yoshiko Kano[1], Mayuko Horikawa[1], Fumiaki Koizumi[2], Tatsu Shimoyama[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital)

[P54] Heterogeneous expression of unique genes in magnetotactic bacteria toward morphological control of magnetic nanoparticles

*Chihiro Miura[1], Nanami Shinohara[1], Tadashi Matsunaga[1,2], Atsushi Arakaki[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology)

[P55] Whole-Cell Biocatalysts Harboring P450 Enzymes Triggered by Decoy Molecules for Microbial Degradation of Environmental Pollutants

*Fumiya Ito[1], Shinya Ariyasu[1], Masayuki Karasawa[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P56] Development of perfluorocarbon-encapslated elastic nanoparticles for ^{19}F MRI contrast agents

*Yuki Konishi[1], Fuminori Sugihara[2,3], Masafumi Minoshima[1], Kazuya Kikuchi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ., 3. Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

[P57] Creation of transdermal malaria vaccine and analysis of immune response

*Keisuke Tanaka[1], Kosuke Minamihata[2], Rie Wakabayashi[2], Noriho Kamiya[2,4], Masahiro Goto[2,3,4] (1. Kyushu University Graduate School of Engineering, 2. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 3. Next Generation Transdermal Absorption Center, 4. Center for Future Chemistry and Innovation)

[P58] Development of novel ionic liquid nanoparticle formulations and transdermal delivery of nucleic acid drugs

*Kiyohiro Toyofuku[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1], Masahiro Goto[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University)

[P59] Preparation of the fusion protein of VHH antibody and amphiphilic OLE-ZIP and evaluation of its capsule formation property

*Kousuke Takahashi[1], Taiki Nishiyama, Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

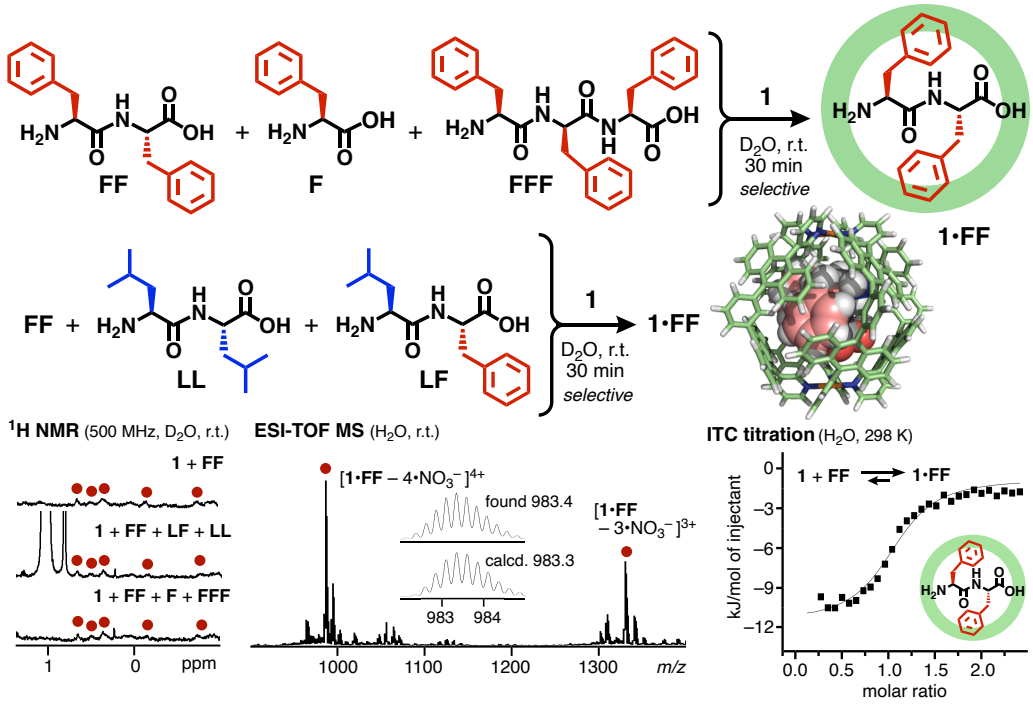
芳香環カプセルの閉鎖空間を活用した非保護ペプチドの選択的識別

○首藤真優・湯浅茉奈・角田瑠輝・吉沢道人（東工大・化生研）

Selective Recognition of Unprotected Peptides by the Closed Cavity of a Polyaromatic Capsule (Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech) SHUTO, Mayu; YUASA, Mana; SUMIDA, Ryuki; YOSHIZAWA, Michito.

アミノ酸およびペプチドは必須の生体分子である。人工レセプターによるそれらの識別は盛んに研究されているが、そのオリゴマーは複雑な非対称構造を持ち、高度に水和するために、正確に認識することは非常に困難である。これまで、チューブやケージ状の人工レセプターが開発されているが、開放空間のためにペプチドの長さの識別は、ほとんど達成されていない[1)]。本研究では、複数のアントラセンパネルに囲まれた球状の閉鎖空間を有する芳香環カプセル **1**[2-4)]を利用することで、非保護ジペプチドの長さと残基のわずかな違いの識別を達成したので報告する。

まず、カプセル **1** の重水溶液に、フェニルアラニン（**F**）と二量体 **FF** と三量体 **FFF** を等量ずつ加えて室温で 30 分攪拌した。その ^{1}H NMR スペクトルでは、内包された **FF** の脂肪族シグナルが –1 ~ 1 ppm に観測された。ESI-TOF MS スペクトルで、二量体の 1 分子内包体 **1•FF** に由来する分子イオンピーク m/z = 983.4 [**1•FF** – 4NO_3^-]$^{4+}$ が観測され、**FF** の選択的内包を達成した。同条件でカプセル **1** と **FF**、ロイシン-フェニルアラニン（**LP**）、ロイシン二量体（**LL**）を混合した場合、内包体 **1•FF** が選択的に生成した。また、25 ºC における ITC 測定により熱力学的パラメータを求めた結果、**1•FF** の形成によるエンタルピー変化 ΔH = –9.9 kJ/mol、エントロピー変化 TΔS = 18.7 kJ/mol、ΔG = –28.6 kJ/mol が見積もられた。すなわち、内包挙動はエントロピーおよびエンタルピー駆動であることが示された。さらに、結合定数（K_a）は 1.03×10^5 M^{-1} であり、アスパルテーム（$K_a = 1.3 \times 10^4$ M^{-1}）とテストステロン（$K_a = 4.5 \times 10^7$ M^{-1}）の間の結合力であることが判明した。一方、**1** と **F** の相互作用は ITC 測定で観測されなかった。



1) J. N. Martins, J. C. Lima, N. Basílio, *Molecules* **2021**, *26*, 106; 2) N. Kishi, Z. Li, K. Yoza, M. Akita, M. Yoshizawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11441; 3) M. Yamashina, M. Akita, T. Hasegawa, S. Hayashi, M. Yoshizawa, *Science Adv.* **2017**, *3*, e1701126; 4) M. Yamashina, T. Tsutsui, Y. Sei, M. Akita, M. Yoshizawa, *Science Adv.* **2019**, *5*, eaav3179.

タンパク質表面修飾を利用した光スイッチング蛍光分子の光安定性の向上

○鳥井健司[1]・堀雄一郎[2]・菊地和也[1,3]（[1]阪大院工、[2]九大院理、[3]阪大免フロ）

A Photoswitchable fluorescent Probe Using a Photochromic Quencher with High Photostability Assisted by Protein-Surface Modification (Graduate School of Engineering, Osaka University[1], Faculty of Sciences, Kyushu University [2], Immunology Frontier Research Center, Osaka University) TORII, Kenji[1]; HORI, Yuichiro[2]; KIKUCHI, Kazuya[1,3]

光照射により蛍光特性が可逆的に変化する光スイッチング蛍光分子は、タンパク質の動態を局所的に追跡することや RESOLFT や MINFLUX などの超解像蛍光イメージングにおいて、非常に有用なツールである。しかしながら、合成された光スイッチング蛍光分子の多くは親水性の低さから、生体環境中で分子間(内)凝集を引き起こし、光安定性を低下させる大きな要因となっている。そのため、未だ半永久的な可逆応答を示す光スイッチング蛍光分子の開発は難しい課題である。近年、多数のカルボン酸を導入することで、水溶性を向上させた蛍光性ジアリールエテンが開発されたが、細胞膜の透過性が乏しいために生細胞への応用はなされていない[1]。また、スピロピランを用いた光スイッチング蛍光分子も開発されているが、熱異性化により厳密な光制御ができないことが問題となっている[2]。そこで、本研究では水溶液中でも高い光安定性を保つことが可能な「タンパク質表面修飾支援型光スイッチング戦略(Protein-surface-assisted photoswitching strategy)」を確立した(Fig 1)。まず初めに、熱異性化しないフォトクロミック分子としてフリルフルギミド(以降 FF)[3] を蛍光消光基として導入した、光スイッチング蛍光分子 FF-TMR を開発した。FF は開環体と閉環体の 2 つの状態に可逆的に光異性化し、閉環体では可視領域に吸収帯を持つ。FF-TMR は光照射により閉環体に異性化すると、蛍光色素と FF 間の FRET により、蛍光消光を引き起こす (Fig 2)。FF-TMR をタンパク質表面に修飾させたところ、水溶液中でも可逆的な蛍光スイッチングを示し、顕著な光安定性の向上が認められた。本学会では、FF-TMR の詳細な光学物性と、タンパク質表面修飾戦略が光スイッチング蛍光分子にもたらす物性の変化について議論する。

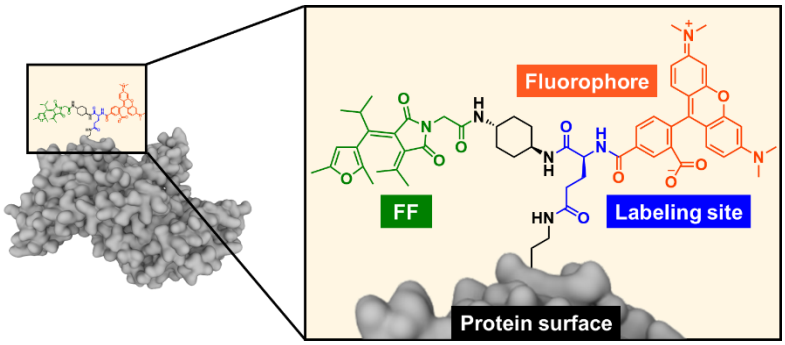


Fig 1. Graphical image of “Protein-surface-assisted photoswitching strategy” and chemical structure of photoswitchable fluorescent probe, FF-TMR.

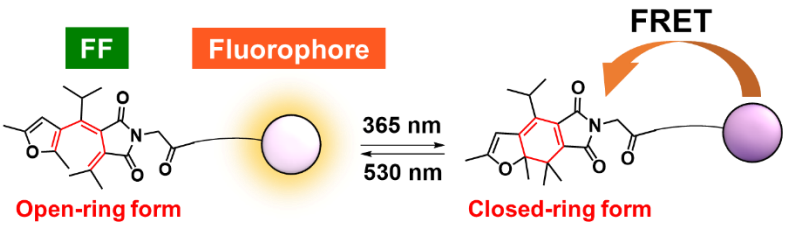


Fig 2. Photoswitching mechanism using furylfulgimide (FF).

1. (a) B. Roubinet, et al, *Angw. Chem. Int. Ed.* **55**, 15429 (2016). **(b):** K. Uno, et al, *J. Am. Chem. Soc*. **141**, 16471 (2019).
2. (a): X. Chai, et al, *J. Am. Chem. Soc*. **142**, 18005 (2020). **(b):** A. T. Frawley, et al, *Chem. Sci*. **11**, 8955 (2020).
3. (a): Y. Yokoyama, *Chem. Rev.* **100**, 1717 (2020). **(b):** D. Lachmann, et al, *Eur. J. Org. Chem*. **31-32**, 5018 (2019).

自己集合球状錯体への共包接によるタンパク質－糖鎖の弱い相互作用の誘起

○田所美璃[1]・中間貴寛[1]・藤田誠[1,2]（[1]東大院工、[2]分子科学研究所）

Induction of protein–sugar weak interactions by co-encapsulation within a self-assembled spherical cage

(Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Institute for Molecular Science[2]) Miri Tadokoro[1]; Takahiro Nakama[1]; Makoto Fujita[1,2]

タンパク質と糖鎖の間にはたらく弱い相互作用は、免疫作用や細胞同士の情報伝達をはじめ生体内の重要な役割を担っている。しかし、その過渡的・動的な相互作用に基づくタンパク質－糖鎖複合体は、従来の構造解析手法では観測が困難であり、その構造的な解明が強く求められている。

当研究室では、配位子(L)と Pd(II)イオン(M)の自己集合で形成する $M_{12}L_{24}$ 球状錯体へのタンパク質の包接を報告してきた[1,2]。包接タンパク質は $M_{12}L_{24}$ 錯体内に隔離されることで安定化し、その凝集前の変性構造を観測することができた。我々は、この錯体の直径 5 nm の一義内部空間が、近接効果により包接したタンパク質と糖鎖の間の弱い相互作用を誘発し、その複合体を観測するのに適した場になると考えた。そこで本研究では、タンパク質－糖鎖複合体の構造解析を目指し、$M_{12}L_{24}$ 自己集合球状錯体にタンパク質と糖鎖を共包接することで、その弱い相互作用を誘起できることを実証した(図 1)。タンパク質と糖鎖を共に錯体へ包接し、糖鎖の結合による酵素活性の阻害を観測することで相互作用の誘起を評価した。

はじめに、タンパク質と糖鎖を球状錯体に共包接する手法を検討した(図 1a)。タンパク質と糖鎖をそれぞれ配位子に縮合し、Pd(II)イオンと自己組織化させることで錯体へ包接することを考えた。そこで、タンパク縮合用の配位子に加え[1]、還元的アミノ化で糖鎖を接合した配位子を 4 種類合成した(図 1b)。^{1}H DOSY NMR で自己拡散係数を測定し、錯形成前後のタンパク質と糖鎖の見かけの大きさを評価することで共包接を確かめた。この手法でリゾチームや小麦胚芽レクチンと糖鎖の共包接を達成した。

次に、糖と包接したリゾチームの酵素活性を測定し、錯体への閉じ込めによる弱い相互作用の誘起を検証した(図 1a)。共包接し近接した単糖または二糖が活性部位へ結合することで、糖鎖を加水分解するリゾチームの酵素能が阻害されると期待した。*N*-アセチル-D-グルコサミン(K_d = 27 mM)、*N,N'*-ジアセチルキトビオース(K_d = 0.27 mM)をリゾチームと共に錯体へ包接し、その酵素活性を蛍光標識された基質の加水分解反応により測定した。その結果、糖との包接体の活性は、遊離のリゾチームまたはリゾチームのみの包接体よりも著しく低下した。一方、遊離の糖の存在下では、酵素反応の阻害はほとんど見られなかった。このように、包接した場合にのみ短い糖鎖が活性部位への基質の結合を阻害したことから、共包接によるタンパク質と糖鎖の間の弱い相互作用の誘起が確かめられた。

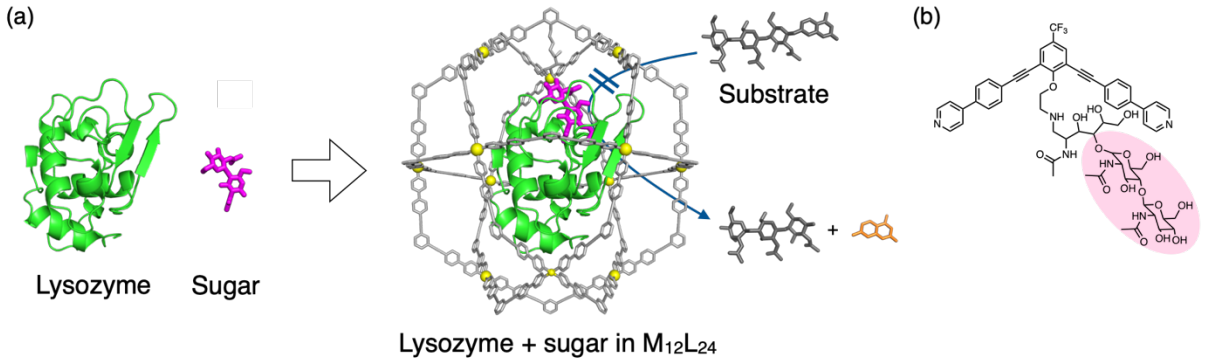


Figure 1 (a) Induction of lysozyme–sugar weak interactions that inhibit the enzymatic activity through co-encapsulation within a self-assembled $M_{12}L_{24}$ cage. (b) Chemical structure of a sugar-conjugated ligand.

1) D. Fujita *et al., Chem* **2021**, *7*, 2672–2683. 2) D. Fujita *et al., Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1093.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

リポソーム二重膜内で自己組織化するイミダゾリル亜鉛ポルフィリン

○井浦悠斗[1]・安原主馬[2]・佐竹彰治[1]（[1]東京理科大院理、[2]奈良先端大物質）

Self-assembly of Imidazolyl Zinc Porphyrins in Lipid Bilayer Membrane (Graduate School of Science, Tokyo University of Science[1], Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology[2]) IURA, Yuto[1]; YASUHARA, Kazuma[2]; SATAKE, Akiharu[1]

細胞膜の機能化はバイオ関連化学分野で注目されている。我々は置換基の導入方向制御が容易なポルフィリン分子の自己組織化を用いて新奇な二分子膜修飾法を検討した。イミダゾリル亜鉛ポルフィリン (ImZnP) は非配位性有機溶媒中でイミダゾールと亜鉛の相補的な配位による頭-頭型二量体を形成することが知られている。一方でポルフィリン類は水中や疎水的な環境では表面積を減らすように集積しやすい性質がある。そこで ImZnP の親水性と疎水性のバランスを調整することができれば、水中で部分的な配位と集積が共存する頭-尾型配位ポリマーを形成する可能性があると考えた。本研究では、頭と尾部に任意の置換基を導入するためにアルキニル基とマレイミド (MI) 誘導体を導入した両親媒性のイミダゾリル亜鉛ポルフィリンを合成し、二分子膜中で頭-尾型配位ポリマー (J-会合ポリマー) を形成することを目的とした。（図１）

頭部のイミダゾール部にプロパルギル基、尾部にマレイミド基、横に伸びる置換基としてトリエチレングリコール鎖を有する ImZnP 合成し、頭部、尾部にいくつかの親水性基および疎水性基を導入した。これらを PC リポソームへ添加し、紫外可視光吸収スペクトルで解析することによってポルフィリンの会合形態を調査した。

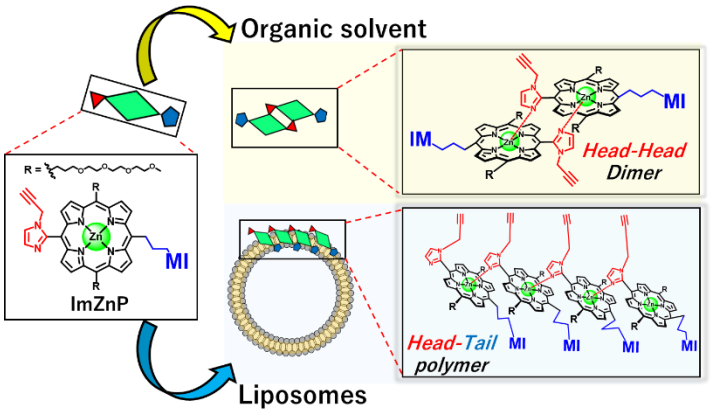


Fig 1. Head-Head Dimer and Head-Tail Polymer Composition.

頭部にポリエチレングリコール (PEG) 鎖を導入した場合、水溶性が高く二分子膜への導入は起こらなかった。一方、尾部に疎水性置換基を導入した場合、頭-尾型配位ポリマーが伸長しなかった。結果、頭部がプロパルギル置換、尾部がフラン保護されたマレイミド基の ImZnPFu を用いた場合にリポソームとの相互作用が起こり、ポリマーの伸長が観測された。

自己組織化の時間変化を調査するために、直径 100 nm の POPC (相転移温度−3℃) リポソーム (500 μM) に 25℃で ImZnPFu の DMSO 溶液を 12 μM になるように添加し、30 分間連続的に UV - vis スペクトルを測定した。添加直後、頭-頭型二量体ではない会合体が観測され、その後 3 分程度頭-尾型配位ポリマーの伸長が観測された。これ以降のスペクトル変化は添加 30 分後までは起こらなかった。一方、リポソーム無しの緩衝溶液中では添加 3 分以降も頭-尾型配位ポリマーの伸長が止まらず徐々に沈殿を生じた。これらの結果から ImZnPFu はリポソームと相互作用することで限定的な伸長を起こし、沈殿が抑えられることが分かった。このリポソーム／ImZnPFu 複合体にトリトン X-100 を添加し、リポソームを破壊したところ、全ての自己組織化体が頭-頭型二量体のスペクトルに変換されたことから、ImZnPFu はリポソームと化学変化等を起こしておらず、異なる自己組織化形態をとっていたことが確認された。

次に、DPPC (相転移温度 41℃) リポソームに対して 25℃で ImZnPFu を添加したところ、POPC リポソームの時よりも、頭-尾型配位ポリマーの伸長速度が 30 倍程度低くなった。膜の流動性がポリマーの伸長速度に影響を与えたことから、ImZnPFu はリポソーム二分子膜において自己組織化していることが明らかとなった。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

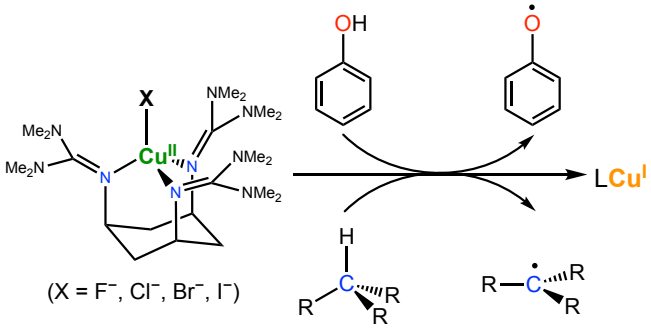
酵素活性中心を模倣した歪んだ四面体構造を有する銅(II)-ハロゲン錯体の特性と反応性の評価

○楊 瀾・森本祐麻・杉本秀樹・伊東忍（阪大院工）

Characterization and Reactivity Studies on a Series of Cu(II)-halide Complexes Having Distorted Tetrahedral Geometry as Model Complexes of Biological Reaction Centers (Graduate School of Engineering, Osaka University[1]) YANG, Lan; MORIMOT, Yuma; SUGIMOTO, Hideki; ITOH, Shinobu.

Owing to generally accessible I/II redox couple and bioavailability, copper containing enzymes play a wide variety of roles in biological systems. To get insights into the chemical properties of mononuclear copper reaction centers with a tetrahedral geometry in dopamine β-monooxygenases (DβM), peptidylglycine α-hydroxylating monooxygenase (PHM), and blue copper proteins,[1] model complexes having tetrahedral geometry need to be developed. However, such Cu(II) complexes having tetrahedral structure are very rare. In this study, we prepared Cu(II) complexes with the series of halide ion as external ligand $[Cu^{II}(TMG_3tach)(X)]^+$ ($X = F^-$, Cl^-, Br^-,I^-) by using a tridentate ligand TMG_3tach, consisting with strongly electron donating substituents TMG (tetramethylguanidine) and a rigid *cis*, *cis*-1, 3, 5-triaminocyclohexane (tach) framework.[2] In contrast to the biomimetic mononuclear tetrahedral Cu(II) complexes supported by well-known Tp (hydrotrispyrazolylborate) ligands which easily changed the geometry from tetrahedral geometry to square-pyramidal geometry upon addition of a slight amount of a coordinating solvent such as DMSO and DMF,[3] our Cu(II) complexes supported by TMG_3tach can undergo ligand exchange reactions with maintaining the tetrahedral geometry. Thus, the present system will provide an ideal platform for the reactivity study of the Cu(II) complexes having tetrahedral geometry.

In this study, we explored the physicochemical properties and reactivity of the Cu(II) complexes in order to evaluate the effects of halide ligands. Mechanistic studies on the reactions with 1,4-cyclohexadiene and phenol derivatives are conducted to show that hydrogen atom transfer mechanism is involved in the oxidation of former substrate whereas proton transfer/electron transfer (PT/ET) mechanism is involved in the oxidation of latter substrate. In addition, DFT calculations on all four Cu(II)-halide complexes have been executed to get further insights into the effect of halide ligands on the Cu(II) complexes having a distorted tetrahedral geometry.



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

生体分子の認識を目指した金属配位に基づく人工ヘムタンパク質多量体の構築

○稲葉大晃[1]・四坂勇磨[1]・上田我竜[1]・榊原えりか[1]・有安真也[1]・愛場雄一郎[1]・杉本宏[2]・荘司長三[1]（[1]名大院理、[2]理研 SPring-8）

Construction of artificial hemoprotein multimers based on metal coordination to recognize biomolecules

(Graduate School of Science, Nagoya University[1], RIKEN SPring-8 [2]) INABA, Hiroaki[1]; SHISAKA, Yuma[1], UEDA, Garyo[1], SAKAKIBARA, Erika[1], ARIYASU, Shinya[1], AIBA, Yuichiro[1], SUGIMOTO, Hiroshi[2], SHOJI, Osami[1]

生体内で様々な機能を担うヘムタンパク質のヘムを人工金属錯体に置換する手法は、ヘムタンパク質の機能改変において強力な手法である。しかし、一般的にヘムタンパク質のヘム結合部位は、ヘムに最適化されているため、ヘムと大きく構造の異なる金属錯体とヘムタンパク質の複合化は困難である。そこで当研究室では、緑膿菌などの一部のグラム陰性菌が分泌するヘム獲得タンパク質 HasA に着目した。HasA は、溶媒に露出した特殊なヘム結合部位を有するため、鉄テトラフェニルポルフィリン（Fe-TPP）のようなヘムと比較して疎水性が高く、嵩高い合成金属錯体を複合化可能である[1] [2]。一方で、TPP 誘導体のような meso 位置換ポルフィリンは、対称性の高い分子構造を活かし、ピンセット型やカプセル型の分子の骨格に利用されており、分子認識などの機能発現を達成している。そこで本研究では、ポルフィリン誘導体を骨格として HasA を多量化することで HasA を分子認識ユニットとして機能させ、タンパク質で覆われた空間を利用した生体分子の認識を目指した（**図 1**）。

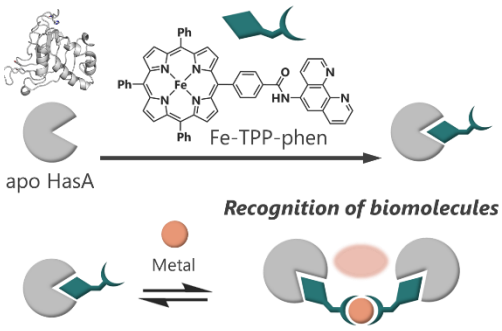


図 1　金属配位による HasA の多量化と分子認識の概念図

Fe-TPP HasA の結晶構造から Fe-TPP のフェニル基が溶媒に露出していることに着目し、配位子であるフェナントロリン（phen）を連結した Fe-TPP-phen（**図 1**）を HasA と複合化することで、金属配位による HasA の多量化が可能であると予想した。大腸菌発現後、ヘムを取り除いた HasA（apo HasA）に対して、合成した Fe-TPP-phen を滴下することで複合化を行った。Cu キレートカラムとサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって精製を行い、UV/Vis スペクトルと ESI-TOF-MS から目的の Fe-TPP-phen HasA 複合体の形成を確認した（**図 2**）。得られた人工 HasA の phen に配位させる金属イオンとして Ni^{2+}を選択し、$NiCl_2$ を添加した溶液を SEC によって分析した。その結果、HasA 2 量体と考えられる溶出位置に新たなピークが出現したため、Ni^{2+}と phen の錯形成によって HasA 2 量体の形成が示唆された（**図 3**）。現在は、その他の金属イオンによる多量化と、得られた HasA 多量体の構造解析について検討中である。

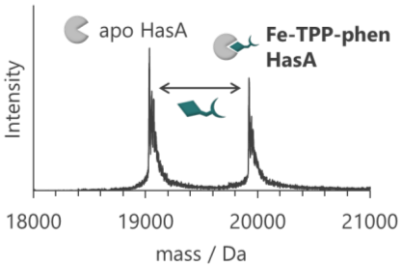


図 2　Fe-TPP-phen HasA の ESI-TOF-MS

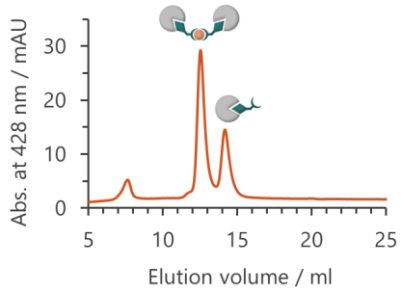


図 3　Fe-TPP-phen HasA に $NiCl_2$ 添加後の SEC

[1] C. Shirataki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2862-2866. [2] Y. Shisaka *et al.*, *ChemBioChem.* **2022**, e202200095.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

近赤外光による金属フタロシアニンの軸配位子脱離を利用するアクティベータブル光音響造影剤の開発

○野北康平・三木康嗣・大江浩一（京大院工）

Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing photoinduced elimination of axial ligand of metallophthalocyanines (Graduate School of Engineering, Kyoto University) NOGITA, Kohei; MIKI, Koji; Ohe, Kouichi

光音響イメージング（PAI）は、生体内深部組織を高い分解能で可視化できる低侵襲的なイメージング法として近年注目されている。金属フタロシアニン（MPc）類は吸収した近赤外光エネルギーを熱として放出しやすく、効率的に PA 信号を発することができるため、PAI 用造影剤への応用が期待されている。当研究室ではこれまでに、ベシクルを形成した両親媒性 MPc（**MPcPEG**、Figure 1a）に近赤外光（λ＝730 nm）を照射すると、MPc の中心金属が持つ水溶性軸配位子が脱離し、軸配位子として水酸基を持つ水溶性の低い MPc（**MPcOH**）が生成し、凝集が進むことで光音響信号が増大することを明らかにした。一方、無秩序に凝集した **MPcPEG** の自己集合体に近赤外光を照射しても軸配位子の切断はほとんど観測されず、光音響信号の増大も起きなかった。本研究では、ベシクルを形成した **MPcPEG** の軸配位子が光照射に応答して切断される機構を明らかにするため、実験的、理論的なデータを基に考察を行った。

ベシクルを形成した **MPcPEG** に対し近赤外光を照射すると、**MPcOH** が生成すると共に軸配位子が脱離することを質量分析により確認した。このことから、光により誘起された **MPcPEG** の軸配位子の脱離反応には M-O-Si 部位の加水分解が関与していると予想した。そこで、軸配位子脱離の反応機構を明らかにするために DFT 計算を実施した。軸配位子を持つ MPc が水中で基底状態、励起状態、ラジカルアニオン、ラジカルカチオンのそれぞれの状態を取る場合に対して構造を最適化し、振動数解析を行った。基底状態と励起状態の MPc 二分子の Gibbs 自由エネルギーの和に対し、ラジカルアニオンとラジカルカチオンの MPc 二分子の Gibbs 自由エネルギーの和を比較すると、後者の方が小さいことが明らかになった。この結果から、励起した MPc に対し近接した MPc から一電子移動が起こり、ラジカルアニオンが生成する方が熱力学的に有利であることがわかった。ベシクルを形成した **MPcPEG** のように MPc 同士が十分近接している場合には、MPc 分子間で電子の授受が起こることで MPc ラジカルアニオンが発生し、周囲の水分子と反応して軸配位子の脱離が起こると考えられる（Figure 1b）。なお、**MPcPEG** は脱酸素条件下と通常濃度の酸素を含む空気下のどちらにおいても、光照射に応じた光音響信号の増大は同程度であった。このことは、軸配位子の脱離機構には一重項酸素の生成がほとんど影響しないことを示唆する。**MPcPEG** は生体内の酸素濃度や還元剤の有無に関わらず、外的要因である光照射に応答して信号を出すことから、実用的な近赤外光応答性 PAI 用造影剤として期待される。

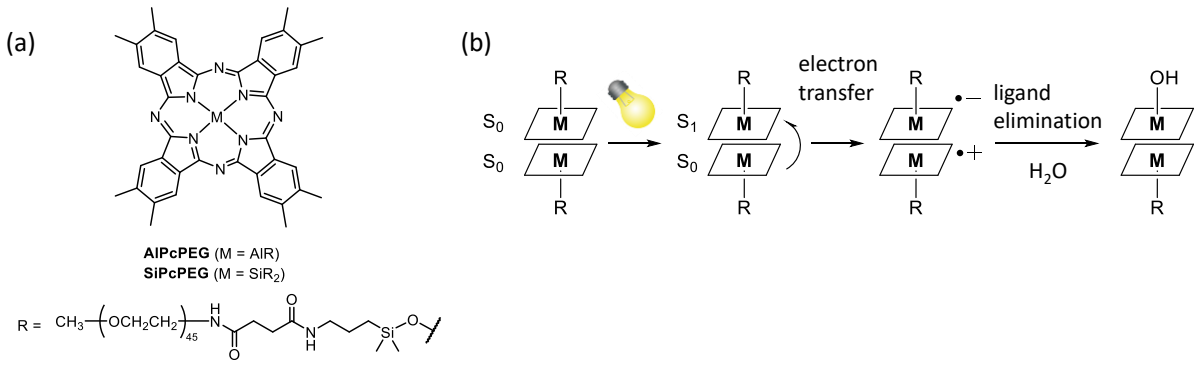


Figure 1. (a) Structure of **MPcPEG**. (b) Plausible mechanism of photoinduced cleavage of axial ligands.

相補的な相互作用を介して形成された共集合体のエネルギー非依存的な脂質膜透過

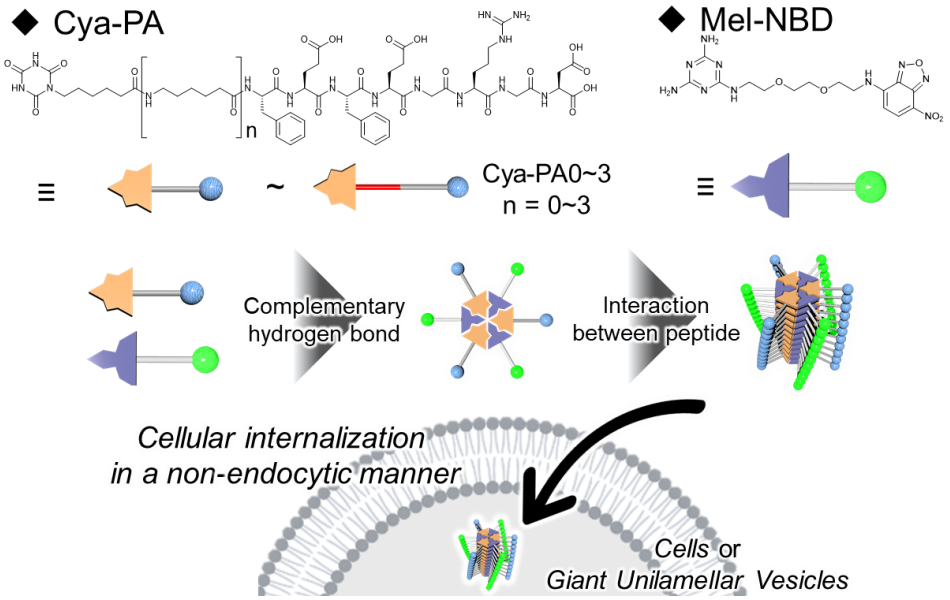
○大林洋貴[1]・若林里衣[1]・神谷典穂[1,2]・後藤雅宏[1,2]（[1]九大院工、[2]九大未来化セ）

Energy-independent lipid-membrane permeation of co-assemblies formed through complementary interaction (Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University[2]) OBAYASHI, Hiroki[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; KAMIYA, Noriho [1,2]; GOTO, Masahiro [1,2]

細胞外物質の細胞内移行経路は細胞内への移行効率を左右する。薬物・プローブ分子等の送達効率の最適化を目指す技術体系である DDS (Drug Delivery System) の観点から考えても、細胞内移行経路の制御は重要である。DDS キャリアの多くが経るエネルギー依存的なエンドサイトーシス経路は、内在化過程で酸性小胞への局在と分解が起こってしまう。一方、近年では、エネルギー非依存的に、細胞膜を直接透過し細胞質へと移行する (非エンドサイトーシス経路) 材料が報告されており、高効率な細胞内デリバリー法への適用が期待されている。しかしながら、本経路を取ると報告されている材料種は少なく、本経路に必要な物理化学的性質への理解や DDS キャリアへの応用は不十分な現状がある[1, 2]。

我々は最近、両親媒性ペプチド (PA) と蛍光プローブ分子 (NBD) からなる階層的な共集合系を報告した。本システムでは、シアヌル酸（Cya）とメラミン（Mel）という相補的な水素結合ペアをそれぞれ PA と NBD に導入した Cya-PA と Mel-NBD とを用いる。Cya-PA と Mel-NBD を混合すると、相補的な相互作用により共集合し、PA の設計に応じた形状に共集合し、形状に応じた細胞内移行を示すことが確かめられている[3]。本発表では、この共集合体の形状に応じた細胞内移行が共集合体と脂質膜との相互作用を起点とした非エンドサイトーシス経路によるものであることを報告する。まず、共集合体の迅速かつ直接的な細胞内有膜小器官（小胞体、ミトコンドリア）への移行を共焦点レーザー顕微鏡によるリアルタイム観察によって確かめた。さらに、人工脂質膜構造体を用いた実験においても、共集合体の形状に応じた膜透過が生じることを確かめた。ユニークな脂質膜透過能を有する本共集合体は将来的に、機能性材料を効率的に有膜細胞内小器官にデリバリーする手段としての応用が期待される。

1) W. He, S. Mitrangotri, et al., *Adv. Funct. Mater*., **30**, 1910566 (2020), 2) H. Nakamura and S. Watano, *KONA*., **35**, 49-65 (2018), 3) R. Wakabayashi et al., *Chem. Commun*, **55**, 6997–7000 (2019).



Molecular design and schematic illustration.

糖鎖プライマー法を用いた低酸素環境における前立腺がん細胞での O-グリカン型糖鎖の解析と細胞遊走性での機能解明

○山本大樹[1]・小坂威雄[2]・大家基嗣[2]・佐藤智典[1]（[1]慶應大理工、[2]慶應大医）

Analysis of *O*-glycan type oligosaccharides in prostate cancer cells under hypoxia and elucidation of their functions in cell migration using saccharide primer method (Faculty of Science and Technology, Keio University[1], Keio University School of Medicine[2]) YAMAMOTO, Daiki[1]; KOSAKA, Takeo[2]; OYA, Mototsugu[2]; SATO, Toshinori[1]

【背景】腫瘍組織内には低酸素の領域が存在する。血管から 100nm 以上離れた領域には酸素が拡散できず、周囲のがん細胞は低酸素状態に陥るが、低酸素誘導因子 (HIF-1α) が発現し低酸素環境に適応する。このようながん細胞は、高い悪性度を示す。前立腺がんは患者数が急増中のがんであり、前立腺がん組織内にも低酸素の領域が多く存在する。低酸素環境における前立腺がん細胞も高い悪性度を示す。そのため、低酸素環境における前立腺がんの悪性化の分子メカニズムの解明が必要である。糖鎖は、細胞のがん化や悪性化によって構造や発現量が変化する。中でも糖タンパク質である *O*-グリカンは、がんの転移や浸潤に関与する。しかし、低酸素環境における前立腺がん細胞に発現する *O*-グリカンの構造と機能は十分に理解されていない。そこで、本研究では低酸素環境における前立腺がん細胞に発現する *O*-グリカンの発現解析を行い、特徴的に発現する *O*-グリカンの機能を解析した。

【方法】 前立腺がん細胞を低酸素環境下で長期間継代培養し、Transwell migration assay および MTT assay を用いて細胞の悪性度を評価した。樹立した前立腺がん細胞の糖鎖解析を、糖鎖プライマー法を用いて LC-MS で行った。糖鎖プライマー法とは、細胞の発現糖鎖を簡便に獲得・解析可能な手法である。次に、低酸素環境が前立腺がん細胞において特徴的に発現増加した糖鎖の糖転移遺伝子を realtime RT-PCR 法を用いて解析した。最後に、低酸素環境において特徴的に発現増加した *O*-グリカンの糖転移遺伝子を、siRNA を用いてノックダウンすることで、低酸素環境における前立腺がん細胞の *O*-グリカンの機能を解析した。

【結果】低酸素環境下で樹立された前立腺がん細胞株は、HIF-1α を高発現し、低酸素環境下での細胞増殖能、高い遊走能を有していた。糖鎖プライマー法を用いた糖鎖の発現解析の結果、低酸素環境における前立腺がん細胞で特徴的に発現増加した *O*-グリカン型糖鎖が見出され、その糖鎖合成遺伝子が細胞遊走性の制御に関わっていることが示された。本研究で見出した *O*-グリカンおよび糖転移遺伝子は新規診断マーカーおよび創薬ターゲットの創出に寄与する。

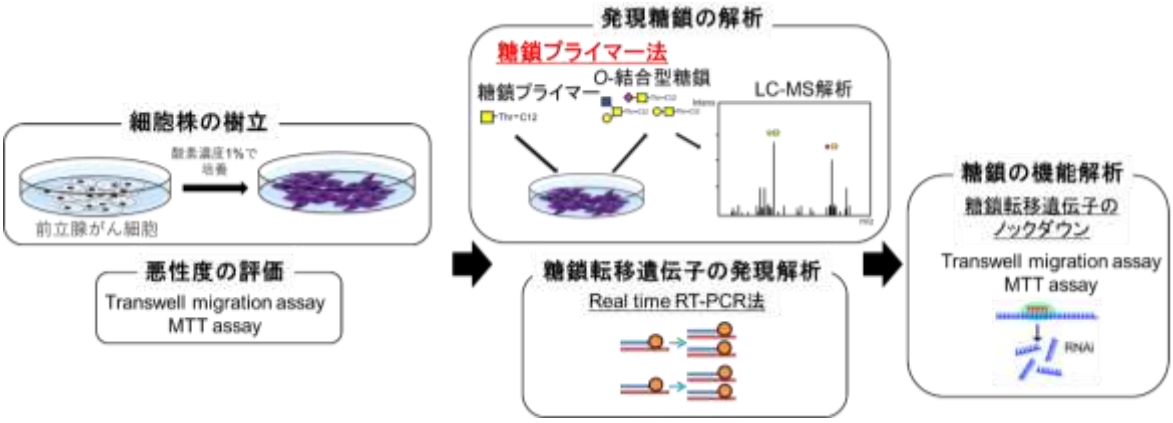


Fig. 研究の概要

H/D 同位体シフトを用いた糖の水和挙動の NMR 解析

○龍岡博亮[1]、山口拓実[1,2]([1]北陸先端大マテリアル、[2]名市大院薬)

NMR analysis using H/D isotope shifts to explore the hydration behavior of carbohydrates (School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology[1], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University[2]) TATSUOKA, Hiroaki[1]; YAMAGUCHI, Takumi[1,2]

生体内の糖鎖は、糖鎖同士やタンパク質との相互作用を通して、免疫応答など多くの生命現象に関与している。また、抗体をはじめバイオ医薬品の多くは糖タンパク質であり、糖鎖が特性の重要な因子となっている。そのため、糖鎖の分子認識機構の詳細を知ることは、生体機能のメカニズム解明に通じるとともに、糖鎖を応用した医薬品開発に向けた新たな分子設計指針を与えるものと期待される。私たちは、糖鎖の構造–機能相関の解明を目指した動的立体構造解析に取り組む中で、糖鎖の構造と溶媒和の関連に着目してきた。糖鎖が関与する分子認識における親和性や選択性には、糖鎖の配列や立体構造に加え、水和構造も密接に影響していると考えられる。しかし、糖鎖の水和に関しての解析法は限られており、未だ知見は少ない。本研究では、核磁気共鳴(NMR)法を用いて水との相互作用解析を行い、糖の水和挙動の探査に取り組んだ。

糖鎖の溶媒和には、糖分子内の水酸基の配向が重要であると考えられる。しかし、水溶液中の水酸基のプロトンは交換が速く、^{1}H NMR 計測のみでは水酸基の詳細な情報を得ることは困難である。そこで、H /D 同位体シフトを利用した ^{13}C NMR 計測に着目した。一般に、^{13}C-OH と ^{13}C-OD では NMR シグナルのケミカルシフトが異なる(Fig 1)。このケミカルシフト差は、水酸基の H/D 交換速度に応じて観測されるため、この性質を利用して、糖と水との間の相互作用を解析できると考えた。そこで水酸基の配向が異なる各種単糖を対象に、NMR 解析を行った。

還元末端をメチル化した、α-グルコース(Glc)、α-マンノース(Man)、α-ガラクトース(Gal)を再結晶により精製し、実験に用いた(Fig 2)。H/D 交換速度を調整するために、有機溶媒を一定の割合で加えた DMSO/H_2O/D_2O の混合溶媒中で各単糖の NMR スペクトルを比較したところ、同位体シフトによる信号の分裂を観測することができた。さらに ^{13}C NMR スペクトルを温度を変えながら測定することにより、^{13}C-OH/OD シグナルが平均化される様子を観測した。その結果、マンノースの水酸基の H/D 交換速度がグルコースやガラクトースと比べて遅いことが分かった。一方、マンノース分子内の各水酸基の間には有意な差が見られなかったことから、水酸基の化学交換速度の違いは、糖が周囲の水のネットワークへ及ぼした影響を反映したものと考えられる。そこで、^{1}H NMR 計測を通して溶液中の水分子の挙動を調べると、マンノース溶液では他の単糖に比べて水－水間の相互作用が強く働くことが分かった。これらの結果から、マンノースがより広い水和圏を形成することが示唆された。また同位体シフトを利用した NMR 計測法が、糖鎖の水和挙動解析に有益な手法であることを示すことができた。

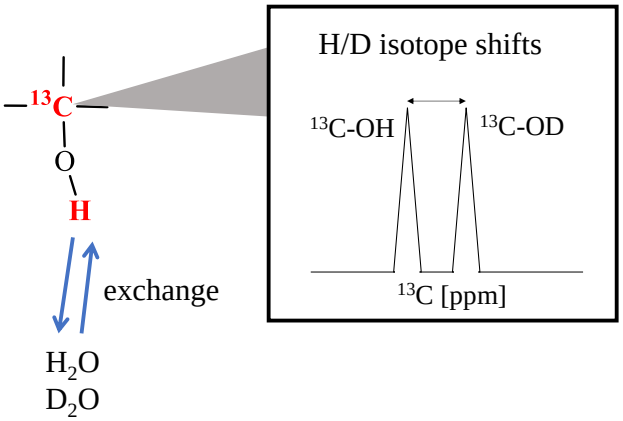


Fig 1. ^{13}C-NMR isotope shift for analyzing proton exchange of hydroxyl groups

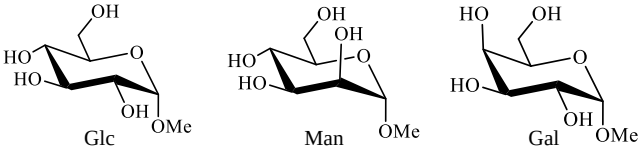


Fig 2. Chemical structures of the monosaccharides methyl α-glucose, methyl α-mannose and methyl α-galactose

糖鎖プライマー法を用いた動物細胞の糖鎖発現解析と インフルエンザウイルス感受性との相関解析

○奥田真由[1]・大形一真[1]・松原輝彦[1]・佐藤智典[1]（[1]慶大理工）

Profiling of glycans in animal cells by the saccharide primer method and correlation analysis with influenza virus susceptibility (Faculty of Science and Technology, Keio University[1]) OKUDA, Mayu[1]; OHGATA, Kazuma[1], MATSUBARA, Teruhiko[1], SATO, Toshinori[1]

インフルエンザウイルス（IFV）は、ウイルス表面のヘマグルチニン（HA）が宿主細胞の表面にある糖鎖を認識することで感染を開始する。IFV の受容体糖鎖として、*N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）含有糖鎖がよく知られているが、シアル酸以外の糖鎖も IFV 感染に影響を及ぼすことが近年報告されており[1]、IFV 感染に関わる新規糖鎖の発見は、感染予防や治療薬開発への意義がある。本研究では、動物細胞に発現する糖鎖を糖鎖プライマー法で獲得し、各細胞の IFV 感染の感受性の違いを realtime RT-PCR 法により測定した。次に、IFV 感受性と各糖鎖の発現量の相関解析を行うことで、IFV 感染に関与する糖鎖の探索を行った。

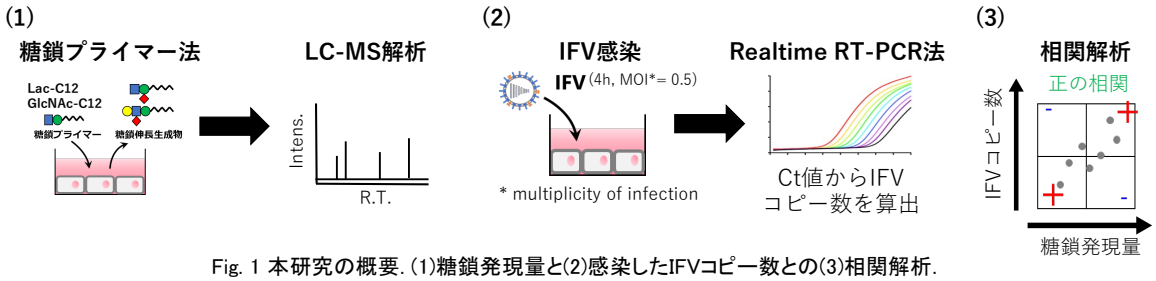


Fig. 1 本研究の概要. (1)糖鎖発現量と(2)感染したIFVコピー数との(3)相関解析.

8 種の動物細胞から得られた Lac-C12 プライマー由来糖鎖伸長生成物の構造を LC-MS で解析し、21 種類の酸性糖鎖と 16 種類の中性糖鎖が検出された。酸性糖では、主にガングリオシド系糖鎖、中性糖では、グロボ系糖鎖が多く発現していることを確認した。

次に、8 種類の動物細胞に H1N1 亜型 IFV などを感染させ、realtime RT-PCR 法により 4 時間後の IFV のコピー数を測定することで、細胞間の IFV 感染効率を比較した。その結果、H1N1 亜型 IFV では MDCK, A549, HEK293, hCK, Caco-2 細胞は感受性が高く、Vero, HeLa, CHO 細胞は感受性が低いことが示された（Fig. 2）。

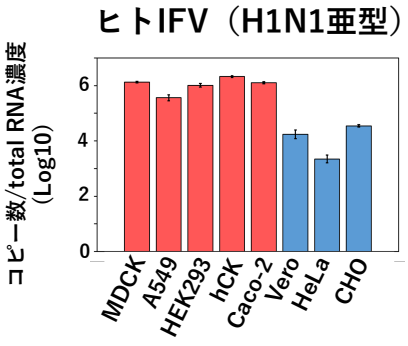


Fig. 2 realtime RT-PCR法により得られた各細胞に感染したIFVコピー数

最後に、各細胞の糖鎖発現量と IFV コピー数についてピアソンの積率相関分析を行い、IFV 感受性と有意に相関性がある糖鎖を探索した。その結果、IFV の受容体として知られている Neu5Ac を末端に含む複数の糖鎖に加えて、硫酸基を有する糖鎖で高い相関性が示された（Table 1）。また、これら以外にも受容体として注目されていなかった糖鎖でも高い相関性が見出された。これらの糖鎖が IFV の感染促進に関与することが示唆された。

Table 1 Lac-C12由来糖鎖発現量とIFVコピー数の相関解析

名称	構造（P：Lac-C12）	ピアソンの相関係数
A17	HSO_3 + P	0.85
A9	NeuAc-Hex-HexNAc-P	0.58
A13	NeuAc + Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-P	0.55
A2	NeuAcα2-6P	0.52
A1	NeuAcα2-3P	0.51
A15	3NeuAc + Hex-HexNAc-P	0.50
A18	HSO_3 + Hex-P	0.49
A6	NeuAc-NeuAc-P	0.25

[1] T. Takahashi, *et al., Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 809-816 (2015).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

単一細胞トランスクリプトーム解析による胃がん CTC の薬剤耐性因子の探索

○叶与詩子[1]・堀川万優子[1]・小泉 史明[2]・下山 達[2]・田中 剛[1]・吉野 知子[1]（[1]東京農工大院工、[2]がん・感染症センター都立駒込病院）

Exploration of drug-resistant factors in gastric circulating tumor cells by single-cell transcriptome analysis

([1]Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Disease Center Komagome Hospital) Kano, Yoshiko[1]; Horikawa, Mayuko[1]; Koizumi, Fumiaki[2]; Shimoyama, Tatsu[2]; Tanaka, Tsuyoshi[1]; Yoshino, Tomoko[1]

胃がんは世界で死亡率第 3 位のがん種であり、診断時 50%以上が進行性胃がんである。進行性胃がんの治療は化学療法が主流であるが、多くの患者が薬剤耐性を獲得し、薬剤の奏効率が低下することが問題である。薬剤耐性の原因となる機構は、細胞増殖能、極性や接着性を失う上皮間葉転換 (EMT) などが研究されているが、その全貌は明らかになっていない。そこで、薬剤耐性獲得のメカニズム解明に向け、がん組織の特徴を反映し、低侵襲に採取可能な血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell : CTC) に着目した。当研究室では、転移性胃がん患者由来 CTC のトランスクリプトーム解析を実施し、EMT 誘導が進んだ CTC が多く存在することを確認している [1)]。そこで、本研究では、薬剤耐性を示す転移性胃がん患者由来 CTC において、EMT に関連する遺伝子群のトランスクリプトームと薬剤耐性との関連を解析し、薬剤耐性に関わる遺伝子の探索を行った。さらに、絞り込んだ遺伝子の過剰発現により、胃がん細胞株における影響を評価した。

胃がん患者から分離した単一 CTC を用いて、EMT 関連因子及び関連経路 (NOTCH 経路)遺伝子を対象としたトランスクリプトーム解析を実施した。また、各患者の治療変更回数で CTC を分類し、薬剤耐性との関連を評価した。その結果、3 つのクラスター (Cluster A : 株化細胞、Cluster B、C : CTCs)に分類された (Fig. 1)。Cluster B は、治療変更回数の多い患者由来の CTC が多く、薬剤耐性を獲得した CTC の存在が示唆された。Cluster B で特に発現がみられた *NOTCH2NL* (*N2NL*)は、脳において NOTCH2 へ作用し NOTCH シグナルを増強することが報告されているヒト特異的な遺伝子であるが、知見は極めて乏しい。そこで、胃がん細胞株 MKN45 に *N2NL* を強発現させ、増殖能及び 5-フルオロウラシル （5-FU）への耐性を評価することで *N2NL* の機能解析を行った。その結果、野生型の MKN45 (MKN45-WT)、及びコントロールベクターを導入した形質転換体 (MKN45-EV)と比較して、*N2NL* 遺伝子を導入した形質転換体株 (MKN45-N2NL)での増殖能の上昇が示された (Fig. 2)。また、MKN45-WT 及び MKN45-EV と比較して MKN45-N2NL の 5-FU 耐性の向上が示された。以上の結果から、胃がん細胞株における N2NL の高発現は、NOTCH シグナルを増強し、薬剤耐性獲得につながることが示唆された。

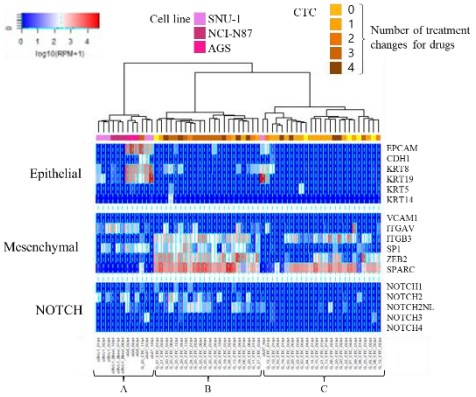


Fig. 1 Heatmap of gene expression associated with EMT in single gastric cancer cells.

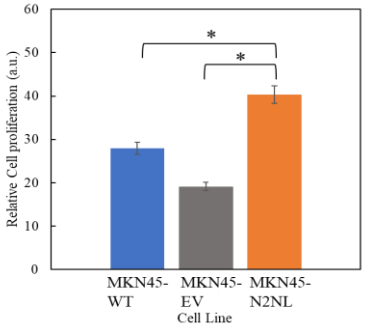


Fig. 2 Proliferation rate of MKN45-WT, MKN45-EV, and MKN45-N2NL for 120 h.

1) Negishi et al., *Commun Biol.* Jan 11;5(1):20. (2022)

磁気微粒子の形態制御に向けた磁性細菌固有の遺伝子群の異種発現

○三浦知優[1]・篠原奈々美[1]・松永是[1,2]・新垣篤史[1]（[1]東農工大院工、[2]JAMSTEC）

Heterogeneous expression of unique genes in magnetotactic bacteria toward morphological control of magnetic nanoparticles (Tokyo University of Agriculture and Technology[1], JAMSTEC[2]) MIURA, Chihiro[1]; SHINOHARA, Nanami[1]; MATSUNAGA, Tadashi[1,2]; ARAKAKI, Atsushi[1]

磁性細菌は、環境中の鉄イオンを取り込み、細胞内に直径約 40 nm のマグネタイト (FeO_3)から成る磁気微粒子を合成する水圏微生物である。穏和な条件下でサイズや形態の制御された磁気微粒子を合成することから、産業利用に向けた応用が期待されている。特にロッド状の磁気微粒子は形状磁気異方性により高保磁力であり、有用な磁性材料として注目されている。磁性細菌 *Desulfovibrio magneticus* RS-1 株は、ロッド状の磁気微粒子を合成することから、その磁気微粒子合成機構に関心が集まっている。しかし、RS-1 株における遺伝子組換え技術は未確立であり、ロッド状磁気微粒子の形態制御機構は未解明である。この解明に向けて、これまでに RS-1 株において、磁気微粒子合成に関連する磁性細菌に共通の遺伝子群の発現用ベクター (26.5 kb)の構築を行った。

本研究では、同ベクターをモデル磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株に同ベクターを導入し、RS-1 株由来の磁気微粒子合成に関連する遺伝子群を異種発現させることで、これらが磁気微粒子の形態に与える影響を評価することを目的とした (Fig.)。獲得した形質転換株において、RS-1 株由来の磁気微粒子合成に関連する遺伝子群の異種発現を確認した。磁気微粒子合成能を完全に失った AMB-1 遺伝子欠損株に同遺伝子群を異種発現させた形質転換株において、磁気微粒子合成能の回復は認められなかった。しかし、この株の培養液中に鉄を含む細胞外沈殿の形成が確認された。これは、導入遺伝子上に存在する推定鉄酸化酵素及び鉄トランスポーターをコードする遺伝子の機能によるものと考えられた。一方、AMB-1 野生株に同遺伝子群を導入した形質転換株では、野生株と比較して磁気微粒子数は約 1.7 倍、粒径は約 1.4 倍に増加していることが確認された。この結果より、AMB-1 株が有する磁気微粒子合成関連タンパク質に加え、導入遺伝子群に存在する結晶形成関連タンパク質が発現することで、粒子数及び粒径に影響したことが考えられた。本結果は、異種磁性細菌由来の磁気微粒子合成に関与する遺伝子群を導入し、その発現が表現型に影響を与えることを示した初の例である。

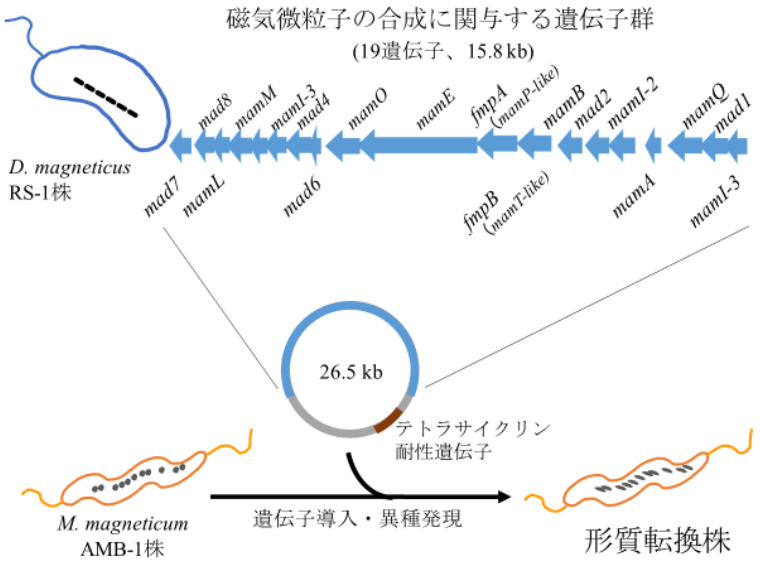


Fig. *D. magneticus* RS-1 株に由来する磁気微粒子合成関連遺伝子群の異種発現のストラテジー

環境汚染物質分解を目指した擬似基質添加 P450 発現細菌による菌体内反応

○伊藤史哉・有安真也・唐澤昌之・愛場雄一郎・荘司長三（名大院理）

Whole-Cell Biocatalysts Harboring P450 Enzymes Triggered by Decoy Molecules for Microbial Degradation of Environmental Pollutants (Graduate School of Science, Nagoya University) ITO, Fumiya; ARIYASU, Shinya; KARASAWA, Masayuki; AIBA, Yuichiro; SHOJI, Osami

環境汚染、特に土壌汚染の浄化手法には主に汚染土壌を取り除き清浄な土壌を埋め戻す掘削除去といった物理的手法が用いられている。一方で近年、低コストかつ省エネルギーな手法として微生物の浄化能を利用するバイオレメディエーションが注目を集めており、中でも汚染環境外で培養した有用微生物を投入し汚染物質を分解するバイオオーグメンテーション（Fig. 1）は、多環芳香族炭化水素やダイオキシンといった難分解性物質を迅速に浄化できる可能性が期待されている。しかしながら、生態系への影響評価が困難なため、現状では直ちに利用可能な菌株が限られている。

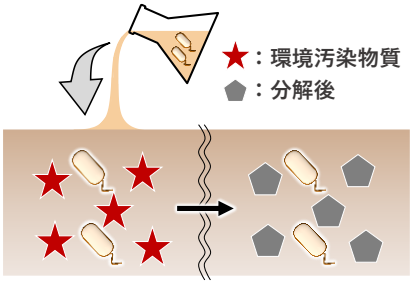


Fig. 1 バイオオーグメンテーション.

当研究室では生物界に広く分布するシトクロム P450 を対象とした研究を行ってきた。*Priestia megaterium* (*Bacillus megaterium*)由来の長鎖脂肪酸水酸化酵素 P450BM3 (CYP102A1)に対し、鎖長が短く反応しない偽物の基質を用いて酵素内に小さな反応空間を構築することで小分子の反応が可能となるという発想に基づき、擬似基質（デコイ分子）による「基質誤認識システム」を開発した[1]。酵素を誤作動させる本システムによりベンゼンなどの非天然基質水酸化が可能となった。また、*P. megaterium* そのものにデコイ分子を添加した場合においてもベンゼン等の水酸化が可能となることを明らかとしたことで[2]、デコイ分子を用いた環境汚染物質の微生物分解手法への道が拓かれた。ただし、上記の菌体内反応を達成した菌株は *P. megaterium* と遺伝子操作された大腸菌のみであり、バイオオーグメンテーション手法として幅広い環境へ適用するためには菌株の拡充が必要である。そこで本研究では P450 酵素を天然にて発現する多様な菌種へ本菌体内反応を展開することを目指した。

P450BM3 の近縁酵素を保有する 11 種の細菌をデコイ分子存在下におけるベンゼン水酸化反応の可否でスクリーニングしたところ、4 種の細菌が陽性を示し、中でも *Bacillus subtilis* ATCC 6051 が最高活性を示した（Fig. 2）。この菌種は P450BM3 近縁酵素を 2 つ有しており、各酵素をノックアウトした菌株の反応性を検証することで、CYP102A3 が水酸化反応を担っていることが示唆された。土壌に遍在し、モデル生物として広く研究されてきた *B. subtilis* による汚染物質変換が達成されたことで、生態系への影響を最小限に抑えた浄化手法につながることが期待される。

Screened species	CYP102
Bacillus subtilis	**A2, A3**
Bacillus cereus	A5
Bacillus licheniformis	A7
Bacillus thuringiensis	A8
Rhodopseudomonas palustris	A12, A13
Bacillus pumilus	A15
Rhodococcus erythropolis	C2
Azorhizobium caulinodans	K1
Streptomyces avermitilis	B2, D1
Actinosynnema pretiosum	F1
Saccharopolyspora erythraea	G2

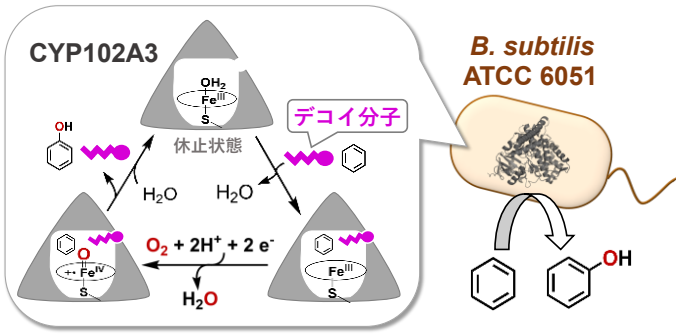


Fig. 2 用いた菌種および発現酵素（左）と *B. subtilis* ATCC 6051 によるベンゼン水酸化反応（右）.

1) O. Shoji *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6606–6610.　2) JP2020-092674A

パーフルオロカーボンを内包した弾性ナノ粒子型 ^{19}F MRI 造影剤の開発

○小西祐輝[1)]、杉原文徳[2、3)]、蓑島維文[1)]、菊地和也[1、2、5)]（[1)] 阪大院工、[2)] 阪大 IFReC、[3)] 阪大微研）

Development of perfluorocarbon-encapslated elastic nanoparticles for ^{19}F MRI contrast agents (Graduate School of Engineering[1], Immunology Frontier Research Center[2], Research Institute for Microbial Diseases[3], Osaka University) KONISHI Yuki[1]; SUGIHARA Fuminori[2, 3]; MINOSHIMA Masafumi[1]; KIKUCHI Kazuya[1, 2, 5]

MRI は核磁気共鳴現象を利用した画像化法で生体深部を非侵襲的に画像化することができる。中でも ^{19}F MRI は高感度の NMR 測定が可能で、生体内にほとんど存在しない ^{19}F を観測核種としている。そのため、水や脂肪などの生体分子由来のシグナルの影響を受けず、^{19}F MRI 造影剤の局在をイメージングすることができる。我々はこれまでに ^{19}F MRI 造影剤としてパーフルオロカーボン内包シリカナノ粒子を開発してきた[1]。このシリカナノ粒子は生体内でも高い感度を示し、その局在を ^{19}F MRI によって検出することが可能である。しかし、シリカナノ粒子をマウスに投与すると、目的組織ではない肝臓や脾臓から ^{19}F MRI シグナルが 2 週間以上にわたって観察され、ナノ粒子が体内に蓄積していると考えられた。長期間の蓄積は慢性的な炎症や発がんなどの副作用を引き起こす危険性がある。近年、ポリマーソームやナノゲルなどソフトなナノ粒子はがん組織での透過性が高いことが報告されており[2]、他の組織においても組織透過性が高いことが期待される。そこで本研究では、長期間の蓄積を抑制するため、シリカではなくソフトな材料であるポリマーで表面を被覆したナノ粒子（ポリマーナノ粒子）型 ^{19}F MRI 造影剤の開発を行った。

パーフルオロカーボンである PFCE を内包したミセルを作製し、その表面をポリアクリル酸で被覆した。作製した粒子のサイズは 160 nm 程度だった。^{19}F NMR を用い、溶液状態の PFCE と粒子に内包された PFCE の横緩和時間（T_2）を比較した。その結果、粒子内の PFCE は流動性を保持していることが分かった。また、高速 AFM（Atomic Force Microscopy）を用いた測定の結果、ポリマーナノ粒子は柔らかく、弾性を有していることが分かった。

今回開発したポリマーナノ粒子と従来のシリカナノ粒子の肝臓への蓄積量を同一個体のマウスで比較するためにマルチカラー^{19}F MRI[3]を行った。ポリマーナノ粒子由来のシグナルを赤色、シリカナノ粒子由来のシグナルを青色でそれぞれ示した（左図）。肝臓におけるシリカナノ粒子の蓄積量は投与後 2 週間でもほとんど変化が見られなかった。一方、ポリマーナノ粒子では投与後 2 週間で、肝臓からのシグナル強度が 8%程度まで減少した（右図）。これにより、ナノ粒子型造影剤における体内への長期間にわたる蓄積を抑制することができた。

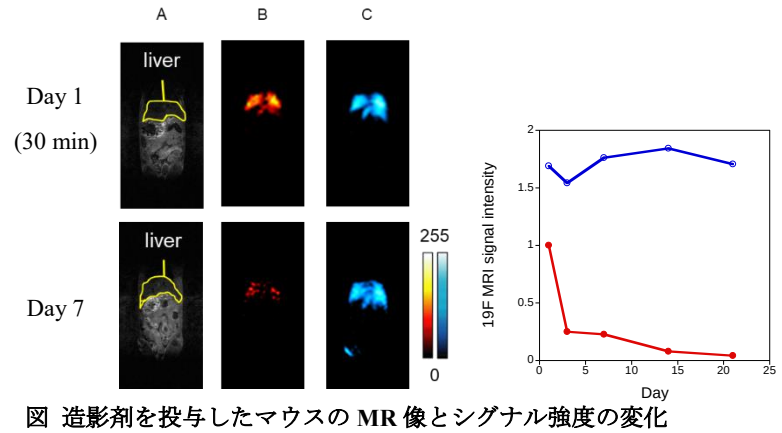


図 造影剤を投与したマウスの MR 像とシグナル強度の変化
A: ^{1}H MRI, B: ^{19}F MRI (ポリマーナノ粒子), C: ^{19}F MRI (シリカナノ粒子)
赤: ポリマーナノ粒子、青: シリカナノ粒子

【参考文献】[1] H. Matsushita *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2014**, *53*, 1008. [2] Y. Hui *et al*, *ACS Nano.*, **2018**, *12*, 2846. [3] K. Akazawa *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 16742.

経皮マラリアワクチンの創製及び免疫応答能の解析

○田中 敬佑[1]・南畑 孝介[2]・若林 里衣[2]・神谷 典穂[2,4]・後藤 雅宏[2,3,4]（[1]九大院工、[2]九大院工学研究院、[3] 次世代経皮吸収研究センター、[4]未来化学創造センター）

Creation of transdermal malaria vaccine and analysis of immune response (Kyushu University Graduate School of Engineering[1] , Graduate School of Engineering, Kyushu University[2], Next Generation Transdermal Absorption Research Center[3] , Center for Future Chemistry and Innovation[4]) Keisuke, Tanaka[1]; Kosuke , Minamihata[2] ; Rie , Wakabayashi[2,3] ; Noriho , Kamiya[2,4] ; Masahiro , Goto[2,3,4]

1. 緒言

マラリアは、マラリア原虫がハマダラカによって媒介され、吸血時にヒト体内へ侵入し、肝細胞および赤血球を破壊しながら増殖することで、貧血や、腎不全などを引き起こす感染症である。マラリアワクチンが必要とされる地域の多くでは医療体制が不十分であり、注射を行う医療従事者の不足や、注射によって生じる皮膚の損傷が新たな感染症の原因になるといった問題点が存在する。

本研究では、非侵襲的かつ簡便な、「塗るマラリアワクチン」の開発を目的とした。皮膚を介して抗原を体内に送達する戦略として Solid-in-oil (S/O) 化技術を選択した 。この技術は親水性分子を疎水性界面活性剤で被覆することで油中分散させる技術であり、皮膚に馴染みやすい油中へ分散させることで良好な皮膚浸透性が期待できる。本発表では、マラリア抗原である Pvs25 を内包した S/O 製剤の抗体産生能及びその免疫応答解析について報告する。

2. 実験

Pvs25 水溶液を L-195/cyclohexane 溶液へ加え、ホモジナイザーで高速撹拌することで W/O エマルションを形成させ、凍結乾燥を行った。凍結乾燥後の Pvs25/L-195 複合体を Isopropyl myristate 中に分散させ、Pvs25 を内包した S/O 製剤を調製した。BALB/c マウスの背部を除毛し、調製した S/O 製剤を添加したパッチを 24 h 貼付し、経皮投与を行った。投与から経時的に採血を行い、ELISA 法によって血清中に含まれる Pvs25 に対する IgG の定量を行った。また、別途経皮投与及び皮下注射をした群の皮膚を採取し、皮膚内の免疫細胞の挙動をフローサイトメトリーによって解析した。

3. 結果および考察

Fig.1 へ免疫化後のマウス血清中における抗体価 (Total IgG) 測定結果を、**Fig.2** へ皮膚中の免疫細胞の解析結果を示す。Injection 群では共に 18 日目以降の抗体価の減衰が確認された一方で、S/O 製剤では 46 日目まで抗体価が上昇するという現象が見られた。さらに両群とも、抗体価が維持された。この事から、S/O 製剤はアジュバントを使用した注射製剤と同等の免疫応答を誘導することが示唆された。

Fig.2 に皮膚組織中の活性化した樹状細胞 (DC) に対するフローサイトメトリーの結果を示す。ここでは免疫細胞の中で、CD80 という活性化マーカー分子を多く発現している DC の割合を表している。注射製剤と比較して、S/O 製剤を投与した群では優位に活性化状態にある DC の増加が確認された。 この結果より、S/O 化したマラリアワクチンは、皮膚内へ送達され、DC を強く活性化可能な製剤であることが示唆される。これらの結果から、Pvs25 を S/O 化することで、経皮マラリアワクチンとして利用できる可能性が示唆された。

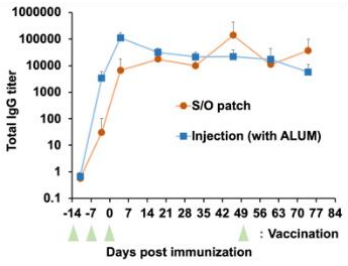


Fig.1 IgG 抗体価の測定結果

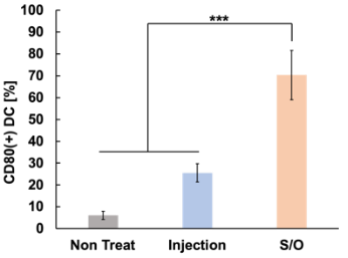


Fig.2 CD80 陽性免疫細胞の割合

新規イオン液体ナノ粒子製剤の開発と核酸医薬の経皮デリバリー

○豊福淳大[1]・若林里衣[1]・神谷典穂[1]・後藤雅宏[1]（[1]九大院工）

Development of novel ionic liquid nanoparticle formulations and transdermal delivery of nucleic acid drugs

(Graduate School of Engineering, Kyushu University[1]) TOYOFUKU, Kiyohiro[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; KAMIYA, Noriho[1]; GOTO, Masahiro[1]

核酸医薬はヌクレオチドから構成される医薬品であり、副作用を低減し得る新たな分子標的薬である。各投与経路の中でも、皮膚は最大面積を有し低侵襲的に薬物を適用するために有用な器官である。しかし、表皮最外層に位置する角層が高い疎水性とバリア機能を有しているため、親水性かつ高分子量の核酸分子の皮内移行性は極めて低い。さらに核酸は生体内の酵素で分解を受けやすく、また負に帯電した細胞膜を透過し難いため、作用部位である細胞質まで核酸を経皮送達するには DDS キャリアが不可欠である。近年、脂質ナノ粒子 (LNP) による核酸デリバリーが盛んに行われている[1)]。LNP は、脂質のエタノール溶液を水で希釈し溶解度を下げる「エタノール希釈法」により形成され、細胞内送達には有利なものの、水溶液中に分散しているため経皮送達のキャリアとしては適さない。そこで本研究では、経皮浸透促進効果を有するイオン液体 (IL)[2)]を用い LNP を形成した後、凍結乾燥により溶媒を除去してから油中分散させるという手法により、経皮核酸製剤「IL ナノ粒子」の開発を行った。

カチオン性リン脂質とアニオン性脂肪酸を反応させ、イオン交換により IL を合成した。この IL をエタノールに溶解させたものに、アンチセンス医薬 Trabedersen (ssDNA) の水溶液を加え素早く撹拌することで自発的に IL-核酸複合体を形成させた。この複合体を凍結乾燥し油状基剤 (Isopropyl myristate, IPM) に分散させたところ、透明な溶液が得られ、動的光散乱 (DLS) 及び TEM 観察により約 160nm の球状集合体の形成が確認された (**Fig. 2**)。

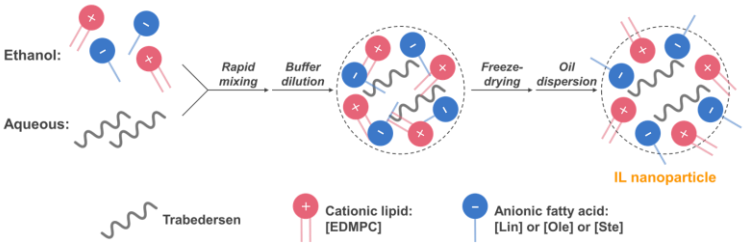


Fig. 1 Schematic illustration of IL nanoparticle preparation

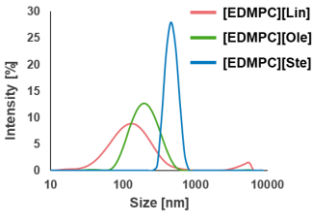


Fig. 2 Diameter of IL nanoparticle

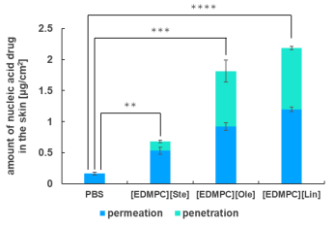


Fig. 3 Skin permeation of nucleic acid n = 3, mean ± SD, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

次に、フランツセルを用いて IL ナノ粒子のマウス皮膚への皮膚浸透性を定量評価したところ、水溶液と比較して有意に浸透量が向上したことが示唆された (**Fig. 3**)。これは、IPM や IL により角層脂質構造が擾乱されたためであると考えられる[3)]。また、TAMRA 標識核酸と NBD 標識リン脂質を用いて IL ナノ粒子を調製し、浸透後のマウス皮膚断面を CLSM で観察したところ、IL と核酸が複合体を形成した状態で角層を透過していることが示唆された。さらに、蛍光標識核酸を封入した IL ナノ粒子を B16 melanoma 細胞に添加し、Flow cytometry により核酸の細胞内送達性を定量評価したところ、核酸の細胞内送達試薬として汎用されている Oligofectamine を上回る細胞内取り込みが確認された。これは、カチオン性リン脂質と細胞膜表面との静電相互作用に起因すると考えられる。

1) X. Hou, T. Zaks, R. Langer *et al.*, *Nat. Rev. Mater.*, **6**, 1078–1094 (2021)
2) S. Uddin *et al.*, *Chem. Commun.*, **56**, 13756-13759 (2020)
3) A. Akinshina *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18**, 17446-17460 (2016)

VHH 抗体融合両親媒性蛋白質 OLE-ZIP の蛋白質調製と蛋白質カプセルの形成評価

○高橋孝介・西山泰貴・水野稔久*（名工大院工）

Preparation of the fusion protein of VHH antibody and amphiphilic OLE-ZIP and evaluation of its capsule formation property (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) TAKAHASHI, Kousuke ; NISHIYAMA, Taiki ; MIZUNO, Toshihisa

[緒言] ヒマワリの種子に存在する両親媒性蛋白質「オレオシン」は、疎水部ペプチド内部で折れ曲がり、両端にある親水部ペプチドが近づくことで、両親媒性が発揮されると推定されている。これまでの我々の検討から、この親水部をヘテロ二量体型コイルドコイルに置き換え、更に疎水部配列と長さを最適化した変異体「OLE-ZIP」へと redesign することで、リポソーム様の「蛋白質のみからなる二分子膜カプセル」が安定に形成できることを明らかとし、そのカプセル内孔へのゲスト蛋白質の高効率な内包化にも成功している(Fig. 1)[1]。さらに、OLE-ZIP の N 末端側に、IgG 抗体との親和性を持つ抗体結合蛋白質「Protein G」を融合した「ProG-OLE-ZIP」をカプセル作製のモノマー蛋白質として混合し、さらにカプセル表面を抗体修飾したところ、抗体と親和性の高い受容体を持った細胞内への取り込み誘導が可能となることも明らかとしている。しかし、実際に血中投与して利用する場面を想定した時に、蛋白質カプセル表面と抗体分子との結合が可逆的であるがために、血液中に多量に存在する別の抗体分子と入れ替わり、細胞標的能を失ってしまうことが危惧された。そこで本報告では、OLE-ZIP の N 末端側に、1 本鎖抗体として知られているラクダ抗体 VHH を融合した「VHH-OLE-ZIP」を設計し(Fig. 2)、こちらの発現精製と、エマルジョン法によってカプセル形成が可能か評価を行った。

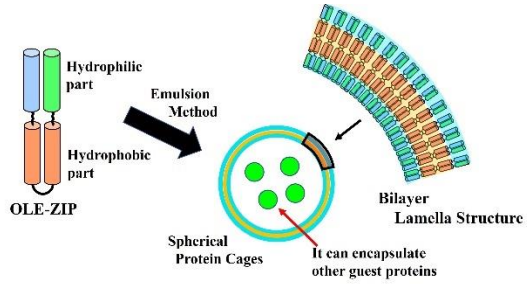


Fig. 1 Schematic illustrations of the amphiphilic bundled protein, OLE-ZIP, and the protein cages prepared from it. The OLE-ZIP protein cages can stably encapsulate guest proteins at the inside thereof.

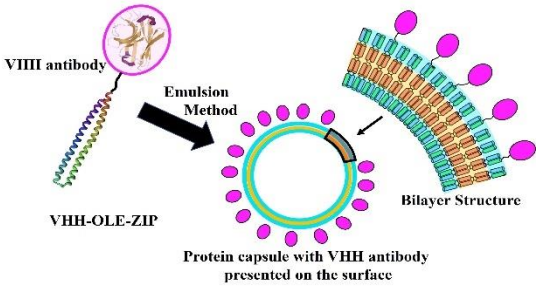


Fig. 2 Schematic diagram of an amphiphilic protein consisting of a single-chain antibody, VHH, fused to the N-terminal side of OLE-ZIP, and protein capsules from it.

[結果・考察] VHH-OLE-ZIP の発現プラスミドは、pET-21d(+)ベクターのマルチクローニングサイトへの遺伝子導入により構築し、大腸菌発現系にて生産した。そちらを精製したものを内水相前駆体溶液に溶解し、エマルジョン法にて作製を行った。DLS 測定からは、50~200 nm 程度の粒径のピークが観測され、さらに TEM による形態評価からは、100 nm 程度の二分子膜のシェルをもったカプセル形態も観察された(Fig. 3)。以上のことから、1 本鎖抗体である VHH を N-末端側に導入したとしても、OLE-ZIP はカプセル形成能を維持できることが明らかとなった。現在は蛋白質カプセルの熱安定性について評価を行っている。

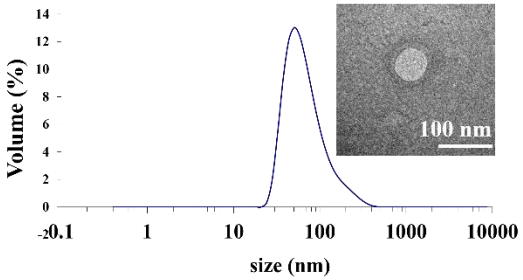


Fig. 3 DLS and TEM observations of the VHH-OLE-ZIP capsules prepared by emulsion method.

1) *Colloid and Interf. Sci. Commun.* **40**, 100352 (2021).

Poster Short Talk

Sat. Sep 10, 2022 6:00 PM - 6:30 PM JST | Sat. Sep 10, 2022 9:00 AM - 9:30 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Short talks free discussions (P41-P59)

6:00 PM - 6:30 PM JST | 9:00 AM - 9:30 AM UTC

Short talks free discussions

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 8:30 AM - 9:30 AM JST | Sat. Sep 10, 2022 11:30 PM - 12:30 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Peptides

Chair: Tsuyoshi Takahashi (Gunma University)

8:30 AM - 8:50 AM JST | 11:30 PM - 11:50 PM UTC

[2A-01] Organelle-targeted DNA delivery in plants using cell wall-loosening zwitterionic liquid and peptide-displaying micelle complexes

*Takaaki Miyamoto[1], Keiji Numata[1,2] (1. Biomacromolecules Research Team, RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

8:50 AM - 9:10 AM JST | 11:50 PM - 12:10 AM UTC

[2A-02] N-terminal modification of peptides and proteins via metal-mediated aldol reaction

*Kengo Hanaya[1], Yuki Morimi[1], Kazuaki Taguchi[1], Kazuaki Matsumoto[1], Yuki Wada[2], Masaki Kawano[2], Shuhei Higashibayashi[1], Takeshi Sugai[1] (1. Faculty of Pharmacy, Keio University, 2. Department of Chemistry, Tokyo Institute of Technology)

9:10 AM - 9:30 AM JST | 12:10 AM - 12:30 AM UTC

[2A-03] Intracellular construction of artificial phase-separated liquid droplets by YK peptide tagging

*Takayuki Miki[1], Masahiro Hashimoto[1], Hiroki Takahashi[1], Sae Nakayama[1], Hisakazu Mihara[1] (1. Tokyo Institute of Technology)

核酸を内包するペプチド提示ミセルと細胞壁を緩める双性型イオン液体を組み合わせた植物オルガネラへの DNA 送達

○宮本昂明[1]・沼田圭司[1,2]（[1]理研バイオ高分子、[2]京大院工）

Organelle-targeted DNA delivery in plants using cell wall-loosening zwitterionic liquid and peptide-displaying micelle complexes (Biomacromolecules Research Team, RIKEN Center for Sustainable Resource Science[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2]) MIYAMOTO, Takaaki[1]; NUMATA, Keiji[1,2]

植物への遺伝子（DNA）送達は、植物の形質改変に重要な役割を果たし、作物の増産による食糧の安定供給や、CO_2 を利用した低環境負荷な有用物質生産の実現に不可欠な基盤技術である。我々は、ペプチドを利用した植物への DNA 送達手法を提案しており、標的オルガネラ（核・ミトコンドリア・葉緑体）へ高い選択性で DNA を送達することに成功している。しかし、植物のオルガネラを高効率に改変するためには、DNA 送達効率を格段に向上させる必要があるとともに、植物細胞が備える細胞壁や細胞膜、細胞内での分解経路といった多重バリアを突破するツールの開発が求められる。我々は、DNA を内包し、表面には任意の機能性ペプチドを提示できるミセル型複合体を開発した[1)]。このミセルに細胞内への取り込みを誘起するペプチド[2)]と細胞質への移行を促すペプチド[3)]を提示させると、植物の細胞膜や細胞内での分解経路の克服が可能となり、高効率な DNA 送達が達成できることが明らかとなった[4)]。一方、植物細胞壁の克服は未解決の課題である。細胞壁では、分子間の水素結合により集合したセルロース微繊維が複雑なネットワークを形成する。このネットワーク構造のため、直径 50 nm を超える粒子は細胞壁を高効率に透過できない。我々が開発したペプチド提示型ミセルは 40-200 nm の粒子径分布を持ち、50 nm 以上の成分は細胞壁に阻まれるため、細胞壁の透過性向上がミセルによる DNA 送達効率の向上に重要と考えられる。我々は、細胞壁透過性を向上させるツールとして、双性型イオン液体（ZIL）に注目した。イミダゾリウムカチオンとカルボン酸アニオンが連結された ZIL は、分子間の水素結合を切断することでセルロースを溶解するため、植物細胞壁の透過性を向上させると期待される。ZIL の毒性を調べるため、シロイヌナズナの芽生えを ZIL 水溶液（0-800 mM）で 3 時間処理した後、Evans blue assay により細胞生存率を評価した。その結果、ZIL は 400 mM 以下の濃度では細胞毒性を示さないことが分かった。次に、ZIL 処理が細胞壁の透過性に与える影響を共焦点レーザー顕微鏡観察および蛍光消光アッセイにより調べた。その結果、400 mM ZIL で処理した子葉では、コントロールと比較して細胞壁中のセルロース微繊維の密度が局所的に低下しており、細胞壁の透過性は 2 倍ほど向上していた。続いて、葉緑体移行ペプチド（CTP）と膜透過ペプチド（CPP）を提示したミセル（CTP/CPP-MC）の DNA 送達効率に対して、ZIL 処理が与える影響を検討した。動的光散乱測定、ゼータ電位測定、および逆相 HPLC 分析から、CTP/CPP-MC は直径約 120 nm で正のゼータ電位（20 mV）を示し、CTP と CPP がそれぞれ 45%と 50%の割合でミセル表面のマレイミド基に結合していた。CTP/CPP-MC を ZIL 処理後（400 mM, 3 時間）および未処理のシロイヌナズナ芽生えに導入し、24 時間後のレポーター遺伝子の発現量を基準として葉緑体への DNA 送達効率を定量した。その結果、送達効率は ZIL 処理により約 2 倍向上することが明らかとなり、この効率向上は ZIL 処理後の芽生えにおいて CTP/CPP-MC が細胞壁を高効率に透過するためと推察された。以上から、ZIL 処理とペプチド提示型ミセルにより植物の多重バリアを克服した葉緑体への DNA 送達に成功した[5)]。

1) Miyamoto *et al.*, *Biomacromolecules*, **2019**, *20*, 653
2) Miyamoto *et al.*, *JACS Au*, **2022**, *2*, 223
3) Miyamoto *et al.*, *Biomacromolecules*, **2020**, *21*, 2735
4) Miyamoto *et al.*, *Nanoscale*, **2021**, *13*, 5679
5) Miyamoto *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, e202204234

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

金属イオンを用いたアルドール反応によるペプチド・タンパク質の N 末端アミノ酸の化学修飾

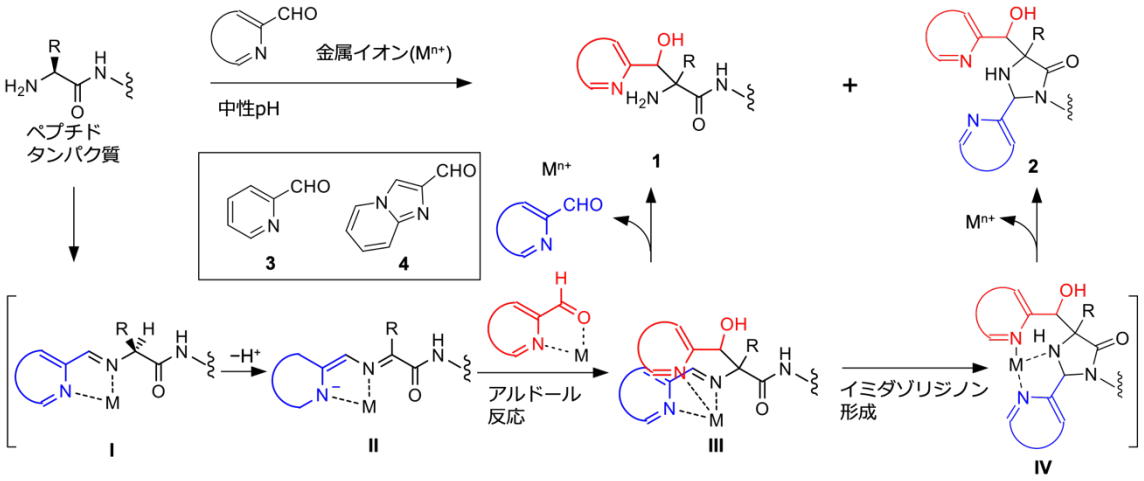
○花屋賢悟[1]・森見優希[1]・田口和明[1]・松元一明[1]・和田雄貴[2]・河野正規[2]・東林修平[1]・須貝威[1]（[1]慶大薬、[2]東工大理）

N-terminal modification of peptides and proteins via metal-mediated aldol reaction (Faculty of Pharmacy, Keio University[1], Department of Chemistry, Tokyo Institute of Technology[2]) HANAYA, Kengo[1]; MORIMI, Yuki[1]; TAGUCHI, Kazuaki; MATSUMOTO, Kazuaki; WADA, Yuki; KAWANO, Masaki; HIGASHIBAYASHI, Shuhei; SUGAI, Takeshi

ペプチドやタンパク質の特定の位置に薬物や蛍光分子などの人工分子を導入する手法（化学修飾法）は、創薬やケミカルバイオロジーの基礎研究において非常に重要である。しかし、ポリペプチド中の特定の位置のアミノ酸のみを化学修飾することは困難である。N 末端アミノ酸は一本のポリペプチド鎖につき 1 箇所しか存在しない。そのため、ここを選択的に化学修飾できれば導入する分子の位置および数を制御することができる。

我々は、金属イオンのルイス酸性を利用したアルドール反応による、N 末端アミノ酸の化学修飾法を見出した。[1)] アンジオテンシン II（H-DRVYIHPF-OH）に対し、pH 7.5 の緩衝液中、銅(II)イオンとアルデヒド **3** を作用させると、**3** が **2** 分子結合した **2** が主生成物として得られた。N 末端アミノ酸が **3** と反応して生成したシッフ塩基の錯体 **I** が脱プロトン化し（**I→II**）、**3** とアルドール反応した後、**III** の主鎖アミドの分子内求核付加によりイミダゾリジノン環が形成した（**III→IV**）と考えられる。第一段階のアルドール反応は、種々の生理活性ペプチドやタンパク質の N 末端アミノ酸上で進行した。しかし、続くイミダゾリジノン環の形成はポリペプチドに依存しており、結合する **3** の数を制御することは困難であった。

この問題点を解決すべく、芳香族アルデヒドと金属イオンの組み合わせをさまざまに変更した。すると、アルデヒド **4** とニッケル(II)イオンを用いると二段階目のイミダゾリジノン形成が著しく抑制された。2-アミノイソブタン酸アミド、アルデヒド **4**、ニッケル(II)イオンの複合体の X 線結晶構造解析の結果、主鎖アミドがニッケル(II)イオンに配位するため、分子内環化が抑制されたことが示唆された。



1) Hanaya, K. *et al. Chem. Eur. J.* **2022**, in press (DOI: 10.1002/chem.202201677).

YK ペプチドタグによる細胞内での人工相分離液滴モデルの形成

○三木卓幸・橋本匡浩・高橋広樹・中山彩恵・三原久和（東工大生命理工）

Intracellular construction of artificial phase-separated liquid droplets by YK peptide tagging (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) MIKI, Takayuki; HASHIMOTO, Masahiro; TAKAHASHI, Hiroki; NAKAYAMA, Sae; MIHARA, Hisakazu

細胞内では液-液相分離現象によって蛋白質や核酸が濃縮した液滴を生じ、遺伝子発現の制御や代謝反応などの多様な生命イベントを制御する。また、FUS や Tau 蛋白質などは液滴を介して病原性のフィブリルを形成することも知られ、相分離液滴の形成や維持の普遍的な分子メカニズムの解明が求められる。これまでの相分離液滴の研究は、天然に発見された個々の液滴のプロテオームを解析する研究や、in vitro での再構築実験により液滴形成に必須な蛋白質および配列を特定する研究が主であった。しかし、細胞内環境での相分離形成・維持の一般性ある分子機構の理解には、「in cell での相分離液滴の bottom-up 構築実験」が重要である。

これを実現するため、我々は細胞内で subμm－μm スケールの蛋白質集合体を人工構築する自己集合性ペプチドタグを開発してきた[1–3]。疎水性の Tyr と親水性の Glu と Lys を繰り返して設計された Y15 ペプチドは、その両親媒性の特徴から自己集積化し、アミロイド様のフィブリルを形成する。遺伝子工学的に Y15 ペプチドを任意の蛋白質に融合することで、細胞内で蛋白質集合体を構築できた[1]。しかし、Y15 タグによる集合体は剛直で不定形なゲル状であり液滴ではなかった。

我々は相分離液滴を形成するペプチドを開発するため、Y15 ペプチド間相互作用を不安定する戦略を考えた。種々の検討から、ペプチド間に静電反発を導入するために親水性残基を全てカチオン性の Lys にした YK ペプチド（Tyr と Lys の単純な繰り返し配列）が、液滴形成に有効的な配列であること見出した。YK13 ペプチド(YKYKYKYKYKYKY)を sfGFP に融合した YK13-sfGFP は核内で液滴を形成し、また核排出シグナル(NES)を連結した NES-YK13-sfGFP はサイトゾルで液滴を形成した。また、YK 鎖長が長くなるにつれ、液滴がより剛直になることが判明した。

相分離液滴の形成や維持には分子シャペロンが関わることが個々の事象で確認されており、その寄与が議論されている。そこで、我々は YK ペプチドを用いて、分子シャペロンを含む人工相分離液滴モデルを細胞内で作成し、液滴の形成・物性への影響を検討した。本研究では、HSP70 や HSP90 と相互作用するコシャペロン STIP1 を標的とし、NES-YK13-mCherry-STIP1 を HeLa 細胞内で発現した。その結果、細胞内で STIP1 が濃縮した液滴を形成し、その顆粒に HSP70 や HSP90 がリクルートされることが分かった。この細胞に、HSP90 の阻害剤である 17-AAG や NVP-AUY922 を添加した場合、流動性のない集合体が数多く形成された。対照的に、HSP90 を過剰発現した場合では、NES-YK13-mCherry-STIP1 による液滴形成が抑制され、液滴形成の頻度が低下した。以上の結果から、人工的な実験系においても、分子シャペロンが液滴から凝集体への相転移を抑制し、また過剰の分子シャペロンが存在する場合では、液滴形成を阻害することが確認された。

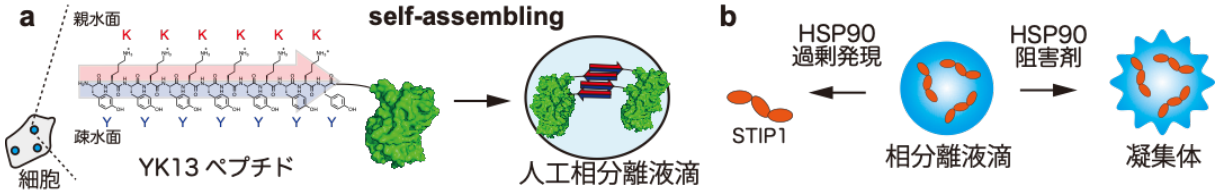


図 1. (a) YK13 タグによる細胞内での相分離液滴の形成、(b) HSP90 による相分離液滴の制御

(1) Miki, T.; Nakai, T.; Hashimoto, M.; Kajiwara, K.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3412.
(2) Miki, T.; Hashimoto, M.; Nakai, T.; Mihara, H. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 11228.
(3) Miki, T.; Kajiwara, K.; Nakayama, S.; Hashimoto, M.; Mihara, H. *ACS Synth. Biol.* **2022**.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 9:40 AM - 10:40 AM JST | Sun. Sep 11, 2022 12:40 AM - 1:40 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Peptides

Chair: Yuki Goto (Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[2A-04] WYP-rich macrocyclic peptide library

*Tomoshige Fujino[1], Taiga Sumi[1], Hiroshi Murakmai[1,2] (1. Department of Biomolecular Engineering Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[2A-05] Generation of Conformationally Constrained Helix-Loop-Helix Peptides Specifically Inhibit the Intracellular Human Proteome

*Daisuke Fujiwara[1], Masataka Michigami[1], Ikuhiko Nakase[1], Ikuo Fujii[1] (1. Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[2A-06] Development of curvature-sensing peptides for highly sensitive detection of extracellular vesicles

*Kenichi Kawano[1], Yuki Kuzuma[1], Fumiaki Yokoyama[2,3], Kouhei Kamasaka[2], Takuya Ogawa[2], Jun Kawamoto[2], Tatsuo Kurihara[2], Katsumi Matsuzaki[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 2. Institute of Chemical Research, Kyoto University , 3. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

WYP-rich 大環状ペプチドライブラリの構築

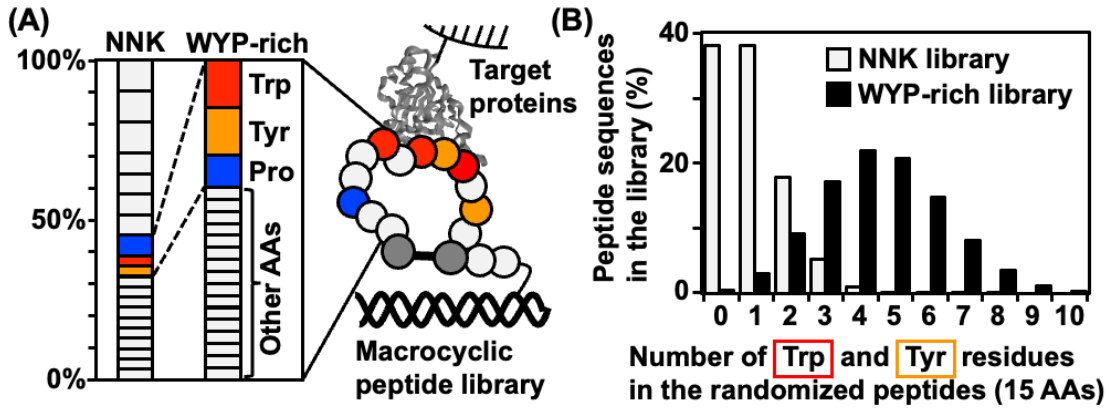
○藤野 公茂[1]・鷲見 大河[1]・村上 裕[1, 2]（[1]名大院工、[2]名大ナノライフ）

WYP-rich macrocyclic peptide library (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University[2]) Tomoshige Fujino[1]; Taiga Sumi[1]; Hiroshi Murakami[1, 2]

近年、進化分子工学を用いて、薬剤候補となる大環状ペプチドを取得する研究が注目されている。中でも、mRNA 提示法や我々の研究室で開発された TRAP 提示法 [1]は、非常に多様性の高いペプチドライブラリ（最大 10^14 種類）が得られる有力な手法である。一方で、例えば 15 残基のランダムアミノ酸を含むペプチド配列の理論的多様性を計算すると、天然アミノ酸 20 種の 15 乗で、約 10^19 種類となることから、実際は多様性の高い手法を用いても考え得る配列のほんの一部しか用意できないことが分かる（10^14 << 10^19 のため）。よって、同じ 10^14 種類を用意するのでも、どのような配列を重点的に用意するかの設計方針により、ライブラリのペプチド組成は、ほぼ別物になると言って良い。

本研究で我々は、ペプチドの設計方針を決める重要な要素として、ランダム部分に含まれるアミノ酸の出現率に着目した。通常、ランダムペプチドは、NNK (N = A, T, G, C; K = T, G)のコドンでコードされるため Ser, Leu, Arg の出現率が高くなるが、結合ペプチドの取得という観点でこれは適切だろうか。哺乳類 IgG の相補性決定領域のアミノ酸出現率では Tyr が高く [2]、我々の開発している人工抗体でも Trp, Tyr が高いことから、これらは結合への寄与が大きいアミノ酸と予想される。また、Pro は大環状ペプチドの構造的揺らぎを制限し結合を安定化するため、これも重要な構成要素と考えられる。

以上の考察に基づき本研究では、Trp, Tyr, Pro の出現率を 15, 15, 10%と高めた、WYP-rich 大環状ペプチドライブラリの構築を提案した（図 A）。このライブラリで 15 残基のランダムアミノ酸配列を考えると、Trp, Tyr の残基数は 4 を中心に分布する。一方、NNK ライブラリでは 0, 1 残基が大多数であることから、両ライブラリのペプチド組成が大きく異なることが分かる（図 B）。ここで我々の仮説通りに Trp, Tyr がペプチドの結合親和性に重要で、4 残基程度含まれることが強い結合に必要と仮定すれば、これを満たすペプチドの種類数は WYP-rich ライブラリで 20 倍も多いため、高親和性のペプチドの取得に有利であると予想される。現在、WYP-rich と NNK ライブラリを用いて、様々なタンパク質を標的に結合ペプチドの選択を試みている。両ライブラリの選択結果を比較することで、今回新たに提案した WYP-rich 大環状ペプチドライブラリの有用性について検証したい。



1) T. Ishizawa et.al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135(14), 5433.
2) M. Zemlin et.al., *J. Mol. Biol.* **2003**, 334(4), 733.

細胞内プロテオームを制御する立体構造規制 HLH ペプチド

○藤原大佑・道上雅孝・中瀬生彦・藤井郁雄（阪公大院理）

Generation of Conformationally Constrained Helix-Loop-Helix (HLH) Peptides Specifically Inhibit the Intracellular Human Proteome (Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University) FUJIWARA, Daisuke; MICHIGAMI, Masataka; NAKASE, Ikuhiko; FUJII, Ikuo

ヒト・プロテオームには 65 万種類のタンパク質間相互作用（PPI）の存在が予測されている。これらの PPI に対する特異的阻害剤は、医薬品として開発が期待できる。しかし、このような明確な目標があるにもかかわらず、細胞内 PPI に特異的な医薬品の創出は未だに困難である。重要な点として、細胞内 PPI をターゲットとする中分子医薬の開発には、主として 2 つの要件を満たす必要がある。1 つは細胞内送達・細胞膜透過性であり、もう 1 つはターゲット PPI 特異的な阻害活性である。我々はこれまでに、ヘリックス-ループ-ヘリックス（HLH）ペプチドを分子基盤として、PPI 阻害剤を獲得してきた（図 1）[1]。これらは高親和性・特異性・安定性を有し、医薬品として開発が期待できる。本発表では、細胞内 PPI に対する医薬開発を可能にする新基盤技術として、HLH ペプチドを分子基盤とする細胞内 PPI 阻害剤のラショナル・デザイン方法と、ターゲット・フォーカスド・ライブラリーを用いた特異的阻害剤獲得方法について報告する。

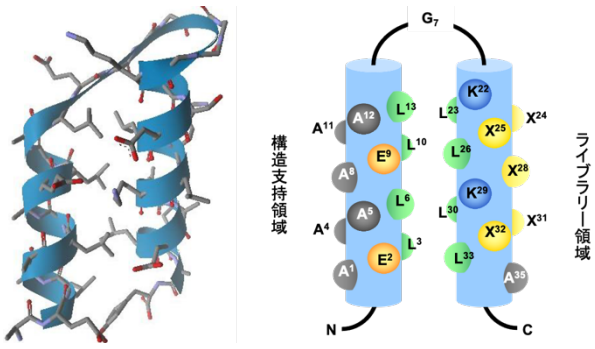


図 1. ヘリックス-ループ-ヘリックス（HLH）ペプチドの立体構造と、HLH ペプチドを基盤とするライブラリーの模式図．Leu 間の疎水性相互作用と Glu-Lys 間の静電相互作用により安定な構造をもち、任意のアミノ酸（X）をもつライブラリーを構築できる．

まず、細胞内 PPI 阻害活性をもつ HLH ペプチドの分子設計法として、細胞膜透過性と p53-HDM2 相互作用阻害活性をあわせもつ HLH ペプチド cHLHp53-R を設計した [2]。立体構造情報にもとづいて、4 つの p53 由来の結合残基を HLH ペプチドに移植した（エピトープ・グラフティング）。さらに、溶媒露出のアミノ酸をアルギニンに置換して細胞膜透過能を付与した（アルギニン・グラフティング）。このペプチド cHLHp53-R は、HDM2 に対する高親和性と p53-HDM2 相互作用阻害活性、並びに細胞膜透過性を示した。さらに、野生型 p53 発現がんに対して、細胞選択的な増殖阻害活性を示した。次に、阻害剤獲得が困難な標的タンパク質に対する、*De Novo* な選択的阻害剤獲得方法として、HLH ペプチドを分子基盤とする新規ターゲット・フォーカスド・ライブラリー法を確立した。プロテインキナーゼ（PK）に対するモデル・スタディ [3]の研究成果をここで述べる。PK には高度に保存された ATP 結合部位がある。ATP の構成要素であるアデノシンは、ATP 結合ポケットに選択的且つ弱く結合する。アデノシンをアンカー分子にもつ新規ファージ表層提示 HLH ペプチド・ライブラリーを作製し、Aurora Kinase A および I-kappa-B kinase epsilon（IKKε）に対するアフィニティ・セレクションを行った [3,4]。その結果、各キナーゼに対する選択的阻害剤の獲得に成功した。得られた阻害剤は、抗がん剤として応用が期待できる。

これらの画期的技術に関して、HLH ペプチドを分子基盤とする細胞内 PPI 阻害剤のラショナル・デザイン方法と、ターゲット・フォーカスド・ライブラリー構築方法・アフィニティセレクションを組み合わせることができる。即ち、多様な細胞内 PPI に対するオンデマンドな特異的阻害剤・中分子医薬シーズの獲得に貢献できる。高い波及効果をもつ技術と考えられ、さらなる技術進化が期待できる。

1) T.M.R. Rmanayake Mudiyanselage, *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **15**, 360 (2020); 2) D. Fujiwara, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 10612 (2016); 3) D. Fujiwara, *et al.*, *ChemBioChem*, **22**, 3406 (2021); 4) K. Mihara, *et al.*, *Peptide Science*, **114**, e24253 (2022)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

細胞外小胞の高感度検出を基軸とした曲率認識ペプチドの創製研究

○河野健一[1]・葛馬佑樹[1]、横山文秋[2,3]、釜阪紘平[2]、小川拓哉[2]、川本純[2]、栗原達夫[2]、松﨑勝巳[1]（[1]京都大院薬、[2]京都大化研、[3]東京大院理）

Development of curvature-sensing peptides for highly sensitive detection of extracellular vesicles (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University[1], Institute of Chemical Research, Kyoto University[2]) KAWANO, Kenichi[1]; KUZUMA, Yuki[1]; YOKOYAMA, Fumiaki[2]; KAMASAKA, Kouhei[2]; OGAWA, Takuya[2]; KAWAMOTO, Jun[2]; KURIHARA, Tatsuo[2]; MATSUZAKI, Katsumi[1]

細胞外膜小胞（EV）は細胞から分泌される脂質ナノ粒子であり、細胞間コミュニケーションで重要な役割を果している。EV はヒトの病気や細菌の病原性に関連している為、病気の診断やワクチンへの応用などバイオテクノロジー面で幅広く活用されている。EV の特性を理解する為には、細胞と EV の分離を必要とせず培養液中で EV を無傷の状態で検出する事が重要である。しかしながら、既存手法では検出に至る過程で多くの問題を抱えている。例えば、分泌細菌と EV の分離に汎用されている高速遠心分離は時間がかかるだけでなく、EV に過度な重力負荷がかかる為に EV の凝集や形状変化を引き起こす可能性がある。また、免疫沈降法は抗体を用いて EV に含まれる抗原を高感度で検出できる反面、抗原発現量に依存した評価法であり抗原欠損体の EV 検出には向かないデメリットがある。これらの問題に取り組むために、私たちは、分泌細胞から分離することなく培養液中の EV を簡潔で迅速に検出する手法の開発に取り組んだ。

本研究では、モデル細菌として、EV を大量に産生するグラム陰性菌 *Shewanella vesiculosa* HM13 を使用した[1]。これまでの研究で、脂質小胞の膜曲率に着目して、曲率感知タンパク質に由来する曲率認識ペプチド FAAV の開発に取り組んできた[2]。FAAV は、培養液中に分泌細菌が存在する夾雑環境下でも、EV に選択的に結合する事が分かった。FAAV は 1 分以内に EV を検出できるだけでなく、プロテアーゼ耐性を持っている為、培養液中で長時間の使用に耐えることができる。さらに蛍光/フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）を使用して、EV 量の変化を高感度で検出する方法を開発し（図 1）、培養液中での EV 検出に対する FAAV の潜在的な適用可能性を示す事に成功した[3]。

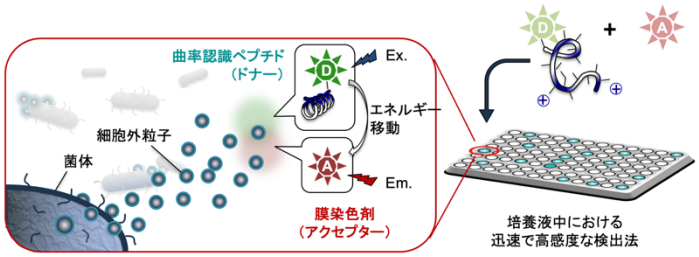


図 1 曲率認識ペプチドを用いた EV の高感度検出法

現在では、EV 高感度検出に向けた曲率認識ペプチドの新たな設計研究を行なっている。EV に対する結合親和性を改善する為に 5 種類の N 末端置換ペプチド FAAV（nFAAV）を設計して、EV 結合能を評価した。その結果、nFAAV5 において結合力の改善が見られた。nFAAV5 は培地に添加するだけで、細菌共存下でも EV 変化量を FAAV より 5 倍高い感度で検出する事が出来た[4]。さらに、分泌量の少ない菌株由来 EV への応用を探る為に、検出感度を高めた二量体化 nFAAV5(di-nFAAV5)を作製した。di-nFAAV5 は nFAAV5 と比べて 7 倍高い親和性を示した事から、EV 低分泌量の菌株への適応可能性を示す事が出来た。EV 分泌システムには厳密な制御機構が存在する可能性が高いが、その生産関連遺伝子については不明な部分が多い。本研究で開発した EV ハイスループット検出法を用いる事で、EV 生産関連遺伝子探索の効率化を図る事が可能になる。96 穴プレートで培養した個々の変異株から分泌される EV の生産量を効率的に定量し、EV 生産量に変化が見られた変異株の遺伝子解析への応用に成功したので報告する。

1) K. Kawano et al., ***Chem., Pharm. Bull.*** 67, 1131 (2019)
2) K. Kawano et al., ***J. Mol. Biol.*** 432, 5876 (2020)
3) K. Kawano et al. ***Chem. Pharm. Bull.*** 69, 1075 (2021)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Poster Short Talk

Sun. Sep 11, 2022 10:50 AM - 11:50 AM JST | Sun. Sep 11, 2022 1:50 AM - 2:50 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Poster short talks (P60-P79)

[P60] Creation of an enveloped artificial viral capsid through hydrophobic interaction

*Miu Hirahara[1], Kentarou Sakamoto[1], Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[P61] Development of RaPID system-based library vs. library selection

*Yuto Ohno[1], Alexander Vinogradov[1], Hiroaki Suga[1] (1. School of Science, The University of Tokyo)

[P62] Optical control of microtubule stabilization by spiropyran-modified Tau-derived peptides

*Minamo Sakaguchi[1], Hiroshi Inaba[1], Arif Md. Rashedul Kabir[2], Akira Kakugo[2], Kazuki Sada[2], Kazunori Matuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Science, Hokkaido University)

[P63] Molecular transport from viral replica embedded with gap junction-forming membrane proteins into liposomes and cells

*Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Yoshihiro Sasaki[2], Kazunari Akiyoshi[2], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P64] Direction-Switchable One-Pot Peptide Ligation for Chemical Protein Synthesis

*Koki Nakatsu[1], Akimitsu Okamoto[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University)

[P65] Selection of GM1-mimic Peptides by Phage-display Technology Using Acoustic Levitation

*Akiko Yoshida[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P66] Synthesis and Cancer-Cell-Selective Toxicity of a Dicopper(II) Complex with NLS-Peptide Attached Phenol-2,6-bis(amide-tether-tacn) Ligand

*Ami Kodama[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[P67] Design of peptide interface to expose the cytoplasmic side of the cell membrane on graphene

*Shogo Saito[1], Soichiro Tatematsu[1], Masayoshi Tanaka[1], Mina Okochi[1] (1. Tokyo Institute of Technology)

[P68] Selection of Peptides That Bind to MDM2 Protein Using an Engineered Split Intein

*Yutaro Watanabe[1], Tsuyoshi Takahashi[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Gunma University)

[P69] Development of an efficient chemical synthesis route for dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism

*Yuya Takahashi[1], Satomi Kori[2], Kyohei Arita[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. The university of nagoya, 2. Yokohama City University)

[P70] WYP-rich macrocyclic peptide library as a high quality library for *in vitro* selection

*Taiga Sumi[1], Tomoshige Fujino[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Guraduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P71] Development of the cyclic peptide which inhibit amyloid β aggregation induced by GM1 cluster on lipid raft

*Erika Miyamoto[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P72] Creation of antigen-modified peptide assemblies for activation of immune cells

*Yamaguchi Kyohei[1] (1. Graduate School of Engineering, KyushunUniversity)

[P73] Fabrication of emulsion vaccines based on enzyme reactive self-assembling peptides

*Ayato Higuchi[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P74] Construction of a stimuli-responsive hemoprotein-based hydrogel driven by folding and unfolding behaviors

*Kazuki Kageyama[1], Takahiro Urayama[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka university)

[P75] Development of Cysteine-selective Covalent Drugs Utilizing β-Fluorovinylsulfonamides

*Shunsuke Watanabe[1], Keisuke Tokunaga[1], Yuya Hirose[1], Yudai Tanaka[1], Naoya Shindo[1], Akio Ojida[1] (1. Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyushu university)

[P76] *De novo* chemogenetic approach for subtype selective regulation of dopamine receptor activity

*Shuntaro Kashiwa[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Nagoya University)

[P77] Biosynthesis of prostaglandin by the marine microalga with cyclooxygenase

*Miho Kikuchi[1], Nana Matsumoto[1], Yuki Tsuru[1], Yoshiaki Maeda[2], Tomoko Yoshino[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Faculty of Life and environmental Sciences, Tsukuba University)

[P79] AMPA-type glutamate receptor covalent inhibitor for light control at the synaptic level

*Akihiro Shibata[1], Kyohei Soga[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

疎水性相互作用を介したエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの創製

○平原未海・坂本健太郎・古川寛人・稲葉央・松浦和則（鳥取大院工）

Creation of an enveloped artificial viral capsid through hydrophobic interaction (Graduate School of Engineering, Tottori University) HIRAHARA, Miu; SAKAMOTO, Kentarou; FURUKAWA, Hiroto; INABA, Hiroshi; MATSUURA, Kazunori

ウイルスは、宿主細胞内で自己増殖することができる感染性のある超分子集合体であり、自身のゲノム核酸の周りをキャプシドタンパク質に被覆されたヌクレオキャプシド構造を有する。また、インフルエンザウイルスのようなエンベロープ型ウイルスは、ヌクレオキャプシド構造が脂質二分子膜で覆われた構造を有している。近年、自己集合性タンパク質・ペプチドを人工的に設計することで、ウイルス類似ナノカプセル構造を構築することが可能となってきている。これまで当研究室では、トマトブッシースタントウイルス由来の 24 残基β-Annulus ペプチドが水中で自己集合することにより、直径 30~50 nm の人工ウイルスキャプシドを創製してきた[1]。また、表面がアニオン性の人工ウイルスキャプシドをカチオン性脂質二分子膜と複合化することにより、静電相互作用によるエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの構築に成功している[2]。本研究では、キャプシド外部表面に配向するβ-Annulus ペプチドの C 末端側にジスルフィド結合を介して長鎖アルキル基を導入し、疎水性相互作用を介して脂質と複合化することで、エンベロープ型人工ウイルスキャプシドを創製した(Fig.1)。

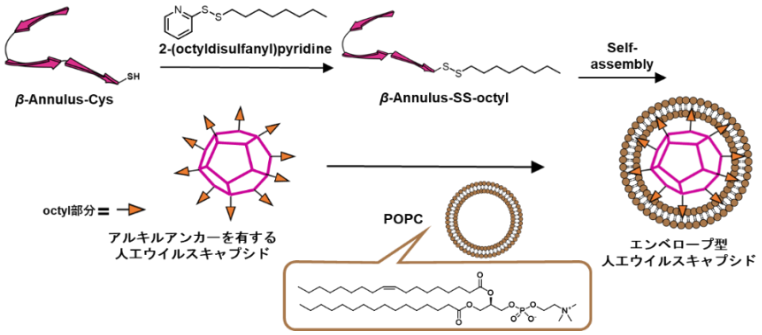


Fig.1 疎水性相互作用によるエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの創製

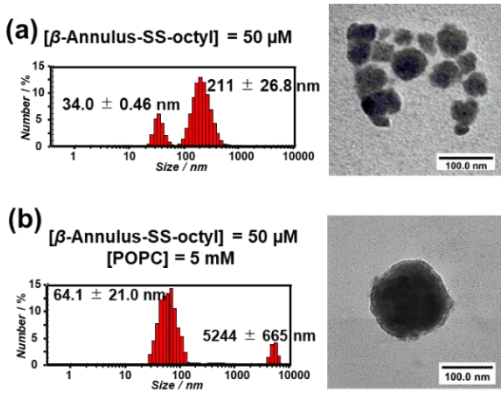


Fig.2 (a) β-Annulus-SS-octyl からなる人工ウイルスキャプシド及び(b) POPC 複合化人工ウイルスキャプシドの DLS 粒径分布及び TEM 像

10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 5%DMSO)中でのβ-Annulus-SS-octyl ペプチドの自己集合により、60~80 nm 程度の球状集合体が凝集した構造が確認された(Fig.2a)。これは、外側に配向したアルキル鎖同士の疎水性相互作用のために凝集したと考えられる。次に、octyl 鎖を表面に有するキャプシドと両性イオン脂質 POPC を水和法により複合化(peptide : POPC = 1 : 100)したところ、凝集成分がほぼ消失し、50~100 nm 程度の球状集合体が DLS 測定と TEM 観察において確認された (Fig.2b)。また、蛍光脂質を含む脂質二分子膜と蛍光標識したペプチドを用いた FRET 測定からも複合化に成功したことが示唆された。現在、β-Annulus-SS-octyl ペプチドの膜へのアンカリングを利用して、リポソームから「出芽」するエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの構築を検討している。

1) K. Matsuura, *Chem. Commun*. (Feature Article), **54**, 8944 (2018)
2) H. Furukawa, H. Inaba, F. Inoue, Y. Sasaki, K. Akiyoshi and K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **56**, 7092 (2020)

RaPID システムを用いたライブラリ vs.ライブラリセレクション系の構築

○大野湧仁[1]・Alexander Vinogradov[1]・菅裕明[1]（[1]東大院理）

Development of RaPID system-based library vs. library selection (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1]) OHNO, Yuto[1]; VINOGRADOV, Alexander[1]; SUGA, Hiroaki[1]

非天然アミノ酸の導入が可能で 10^{12} の多様性を示すペプチド探索プラットフォーム RaPID システムは、タンパク質に対するリガンドの創出[1]や、自己修飾ペプチドの創出[2]を可能としてきた。RaPID システムは活性のあるペプチドを取得することに成功しているものの、活性のあるペプチドの組み合わせを取得することはできない。しかし、ペプチドの組み合わせを最適化することは重要である。例えば、相互作用するタンパク質同士の接触面[3]や、酵素活性部位と基質ペプチド配列間[4]で共進化がみられ、相互的にアミノ酸配列が最適化している。非天然アミノ酸の導入が可能で、高い多様性を示すRaPIDシステムを用いることで、幅広い機能性ペプチドの組み合わせを確実に取得することができるのではないかと考えた。そこで本研究では、RaPID システムを用いたライブラリ vs.ライブラリセレクション系を構築した。

系の検証として、ペプチド間相互作用を起こす E3, K3 ペプチド[5]にそれぞれシステイン、クロロアセトアミドを導入してチオエーテルを形成させ、ペプチド共役体の選択的回収を試みた。E3, K3 ペプチドをコードする DNA を別々に転写、翻訳、逆転写した後に(Fig.1 ①–③)、それらを混合しペプチド間でチオエーテルを形成させた(Fig.1 ④)。その後、E3, K3 それぞれに持たせた HA タグ、 ビオチンの二段階で精製することで反応生成物を回収した(Fig.1 ⑤)。最後にそれぞれのライブラリに固有なプライマーを用いて PCR することでそれぞれの DNA を分離、定量した(Fig.1 ⑥)。その結果、近接効果でチオエーテル形成が加速する E3, K3 ペプチドを用いたときに、それらのスクランブル配列を用いたときと比べ顕著に高い DNA 回収率を示した。これによりペプチド共役体の選択的回収を達成した。

本研究で構築した RaPID システムを用いたライブラリ vs.ライブラリセレクション系は新規の相互作用するペプチドペアや、ペプチドタグ・プローブペアの開発に応用できると期待される。

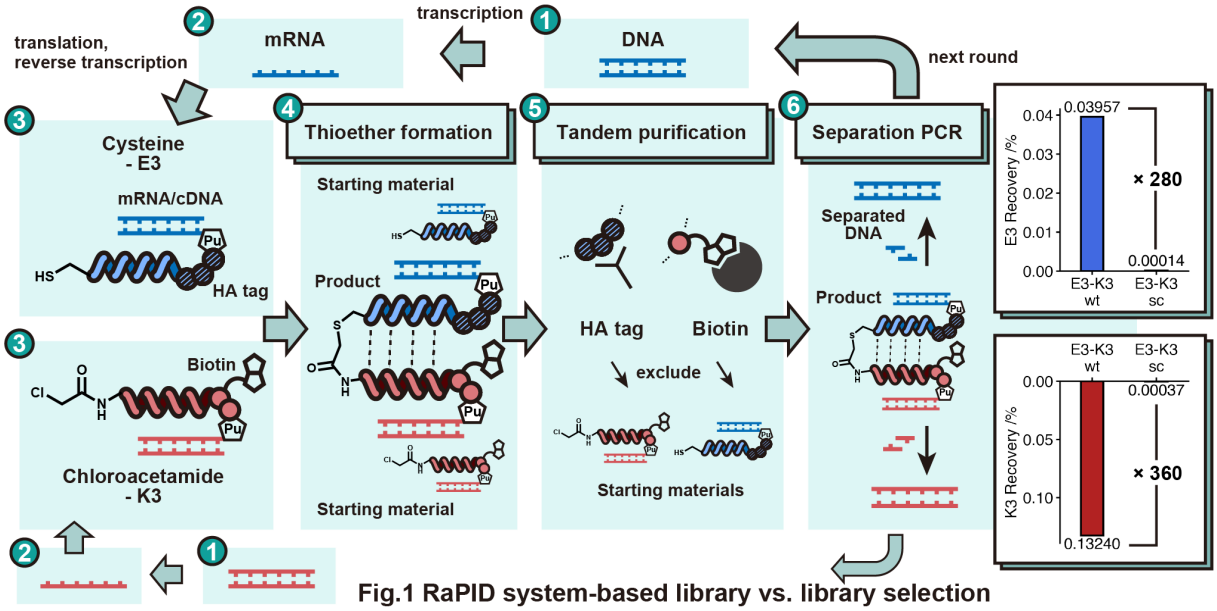


Fig.1 RaPID system-based library vs. library selection

[1] *Chem.Commun.* **53**, 1931 (2017); [2] *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 4741 (2021); [3] *Science* **365**, 185 (2019); [4] *BMC Evol. Biol.* **13**, 231 (2013); [5] *J. Biol. Chem.* **277**, 37272 (2002).

スピロピラン修飾 Tau 由来ペプチドによる微小管安定化の光制御

○阪口みなも[1]・稲葉央[1]・Arif Md. Rashedul Kabir[2]・角五彰[2]・佐田和己[2]・松浦和則[1]（[1]鳥取大院工、[2]北大院理）

Optical control of microtubule stabilization by spiropyran-modified Tau-derived peptides (Graduate School of Engineering, Tottori University[1], Graduate School of Science, Hokkaido University[2]) SAKAGUCHI, Minamo[1]; INABA, Hiroshi[1]; KABIR, Arif Md. Rashedul[2]; KAKUGO, Akira[2]; SADA, Kazuki[2]; MATSUURA, Kazunori[1]

細胞骨格の一種である微小管はチューブリンからなる中空構造体であり、細胞分化や形態、極性などの細胞機能に重要な役割を果たしている。抗がん剤の一種である Taxol は微小管内部のポケットに結合することで微小管を安定化し、がん細胞の分裂を抑制する。しかし、Taxol は構造が複雑であり化学合成による供給が難しいことや、水溶性が低いという問題点がある。当研究室では、微小管関連タンパク質 Tau を基に、微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド TP を開発した[1)]。さらに、より強く微小管に結合する環状 TP を開発し、その結合により微小管を安定化することに成功している[2)]。このことから、TP のチューブリンへの結合を外部刺激により可逆的に変化できれば、微小管の安定性や構造を制御できると考えられる。光異性化分子であるスピロピラン (SP)は UV 光照射によりメロシアニン (MC)に異性化し、可視光照射により SP に戻る。この 2 つは分子構造と極性が大きく異なることから、ペプチドやタンパク質に組み込むことでその構造を光制御することができる[3)]。したがって、SP を TP に組み込むことで、微小管への結合や構造を可逆的に光制御する新たな手法になると期待できる。本研究では、SP を異なる位置に修飾した TP を構築し、光異性化により微小管構造を光制御することを目指した(Fig. 1)。

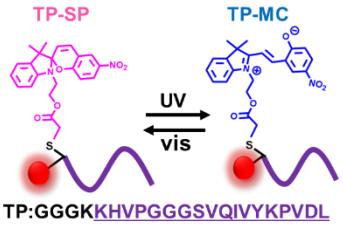


Fig. 1. TP-SP, TP-MC の光異性化

まず、TP の異なる位置に Cys を導入した C-TP (N 末端に Cys), V13C-TP, V16C-TP, Y17C-TP を Fmoc 固相法により合成し、N 末端に赤色蛍光色素を導入した。次に各ペプチドの Cys に SP を修飾した TP-SP を合成し、逆相 HPLC による精製、MALDI-TOF-MS による同定を行った。UV 光照射による TP-SP の MC 体 (TP-MC)への異性化および可視光照射による TP-SP への異性化を UV-vis 測定により確認した。共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM)により、これらペプチドの微小管への結合を確認した。次に、一般的に不安定な微小管を形成する GTP を用いた微小管への影響を評価したところ、C-TP-SP, V16C-MC, Y17C-MC を複合化させた場合は Taxol と同様に長く安定な微小管を形成し、それ以外のペプチドを複合化させた場合は、凝集または短く不安定な微小管を形成することが明らかとなった (Fig. 2)。したがって、SP-TP/SP-MC の光異性化により微小管の安定性を制御することに成功した。

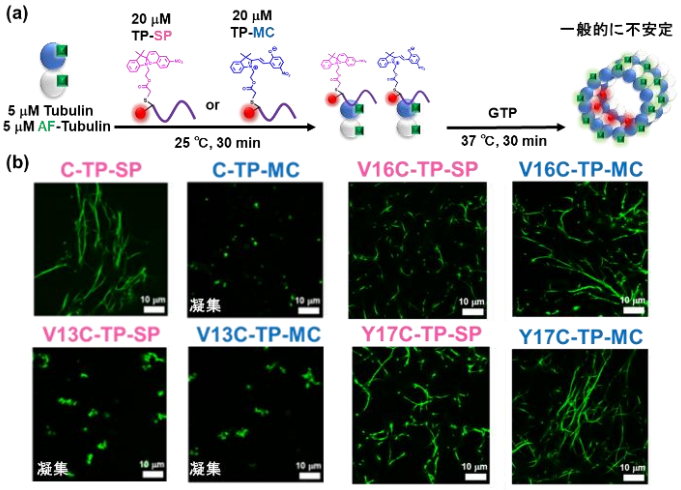


Fig. 2. (a) TP-SP および TP-MC を複合化した GTP 結合型微小管の構築スキームおよび (b) CLSM 像

1) H. Inaba, T. Yamamoto, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Chem. Eur. J.*, **24**, 14958 (2018)
2) H. Inaba, M. Nagata, K. J. Miyake, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Polm. J.*, **52**, 1143 (2020)
3) R. Klajn, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 148 (2014)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

ギャップジャンクション形成膜タンパク質を搭載したウイルスレプリカを用いたリポソーム・細胞への分子輸送

○古川寛人[1]・稲葉央[1]・佐々木善浩[2]・秋吉一成[2]・松浦和則[1]（[1]鳥取大院工、[2]京大院工）

Molecular transport from viral replica embedded with gap junction-forming membrane proteins into liposomes and cells (Graduate School of Engineering, Tottori University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2]) FURUKAWA, Hiroto[1]; INABA, Hiroshi[1]; SASAKI, Yoshihiro[2]; AKIYOSHI, Kazunari[2]; MATSUURA, Kazunori[1]

コロナウイルスやインフルエンザウイルスなどのエンベロープ型ウイルスは、ゲノム核酸がタンパク質集合体であるキャプシドに内包された構造（ヌクレオキャプシド）を脂質二分子膜のエンベロープが覆ったナノ複合体であり、その表面に宿主細胞への感染及び出芽に関与する機能性膜タンパク質を搭載している。最近我々は、キャプシドの外側に配向するC末端側にGluを付与したβ-Annulusペプチドの自己集合からなるアニオン性人工ウイルスキャプシドとカチオン性脂質二分子膜との複合化により、エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの構築に成功している[1]。本研究では、無細胞タンパク質発現により膜タンパク質コネキシン(Cx43)を搭載させたエンベロープ型ウイルスレプリカを構築し、Cx43 間のギャップジャンクション構造を介した Cx43 発現ジャイアントリポソーム(GUV)や細胞内への物質輸送を検討した(Fig. 1)[2]。

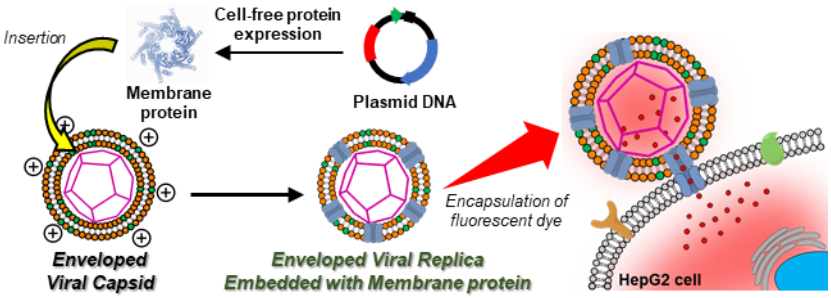


Figure 1. Schematic illustration of construction of enveloped viral replica embedded with Connexin-43 and transport of fluorescent dye into HepG2 cell.

エンベロープ型キャプシド存在下で、Cx43-pDNA を用いた無細胞タンパク質発現により、Cx43 搭載ウイルスレプリカを構築した。次に、蛍光色素 TMR を内包した Cx43 搭載ウイルスレプリカを作製し、Cx43 発現 GUV 及び HepG2 細胞への分子輸送を CLSM 観察により評価した。その結果、Cx43 搭載ウイルスレプリカを用いた場合は GUV 及び細胞内部で強い蛍光像が観察された(Fig. 2A)。画像解析により内部の蛍光強度分布を比較すると、Cx43 搭載ウイルスレプリカは未搭載のものと比べ、有意に高い蛍光強度分布を示した(Fig. 2B)。以上の結果より、機能を保持した状態でウイルスレプリカ上に Cx43 が搭載され、ギャップジャンクションを介して GUV・細胞内へ分子輸送されたことが示唆された。

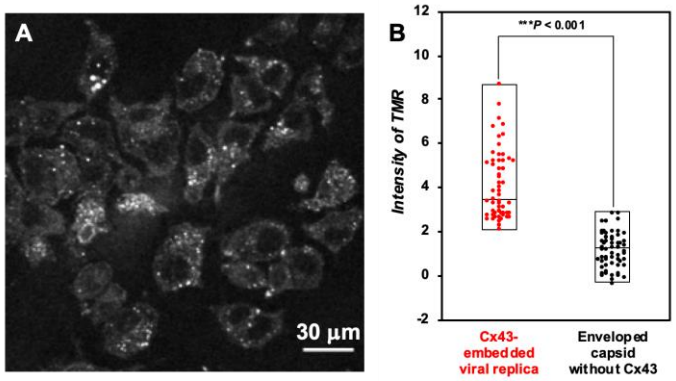


Fig 2. (A) CLSM image of transport of TMR from Cx43-embedded viral replica into HepG2 cells. (B) Box plot of the fluorescence intensity distribution of TMR in HepG2 cells.

1) H. Furukawa, H. Inaba, F. Inoue, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **56**, 7092 (2020)
2) H. Furukawa, H. Inaba, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, *RSC Chem. Biol.*, **3**, 231 (2022)

連結方向切り替え可能な One-Pot ペプチド連結法によるタンパク質化学合成

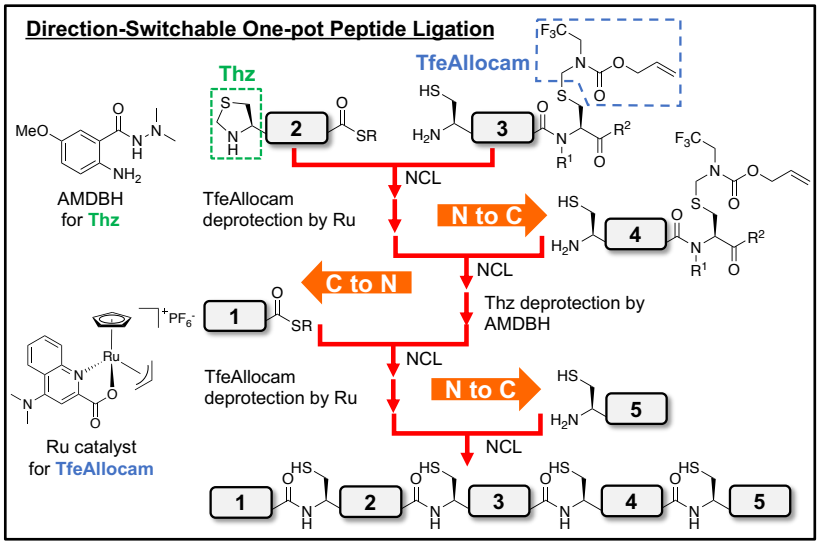
○中津幸輝[1]・岡本晃充[2]・林剛介[1]・村上裕[1,3]（[1]名大院工・[2]東大院工・[3]名大ナノライフ）

Direction-Switchable One-Pot Peptide Ligation for Chemical Protein Synthesis (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[2], Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University[3]) NAKATSU, Koki[1]; OKAMOTO, Akimitsu[2]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1,3]

「タンパク質化学合成法」は、一般的な遺伝子工学的手法では導入困難な非タンパク質性アミノ酸を、部位特異的かつ多重に組み込んだ特殊タンパク質の合成を可能にする。タンパク質化学合成においては、固相合成したペプチド断片同士の連結反応が合成上重要なステップとなっており、中性の水溶液という温和な条件で N 末端システインペプチドと C 末端チオエステルペプチドが連結される Native Chemical Ligation (NCL)[1]がよく使用される。

多数のペプチド断片を効率的に連結するため、精製を介さず複数断片を連結する「one-pot ペプチド連結法」が複数の研究グループのので開発されており、我々のグループを含め種々の one-pot 連結法が報告されている。しかし、これまでの手法は、C 末端チオエステル活性制御による N-to-C 方向(N 末端側から C 末端へ)連結、もしくは N 末端システイン活性制御による C-to-N 方向連結の 2 種類のうち片方向の連結に限定されている。これら連結方向を切り替えながらの one-pot ペプチド連結法も理論上は考えられるが、N-to-C と C-to-N の 2 種類の直交的な one-pot 連結法の組み合わせが必要となるため開発は困難であり、報告例は全くない。タンパク質化学合成においては、ペプチドの連結方向により合成の成否が左右される場合が多く、この未達成の one-pot 連結法である「連結方向切り替え可能な(Direction-Switchable) one-pot 連結法」開発の意義は大きい。

本発表では、新規 allyl 系システイン保護基である TfeAllocam [*N*-(2,2,2-trifluoroethyl) allyloxycarbonylaminomethyl] 基と金属錯体(Pd 錯体[2], Ru 錯体[3])を用いた新たな N-to-C one-pot 連結法を報告し、この新手法に我々が開発した Thz (thiazolidine) 基と 2-aminobenzamide 型脱保護剤を用いた C-to-N one-pot 連結法[4]と組み合わせることで達成した、連結方向切り替え可能な one-pot ペプチド連結法(図参照)の詳細を報告する。さらに本手法による、ジユビキチン化ヒストン H3 の化学合成についても報告する。



(1) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. *Science* **1994**, *266*, 776.
(2) Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 16533.
(3) Kamo, N.; Kujirai, T.; Kurumizaka, H.; Murakami, H.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 5926.
(4) Nakatsu, K.; Okamoto, A.; Hayashi, G.; Murakami, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* in press.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

音響浮揚を用いたファージ提示法による GM1 模倣ペプチドの獲得

○吉田顕子・松原輝彦・佐藤智典（慶應大理工）

Selection of GM1-mimic Peptides by Phage-display Technology Using Acoustic Levitation (Faculty of Science and Technology, Keio University) YOSHIDA, Akiko; MATSUBARA, Teruhiko; SATO, Toshinori

【緒言】

ファージ提示法は、標的分子に結合するペプチドをライブラリー群から効率よく選別する手法である。しかし、この手法で使用するファージ粒子が反応容器に対し非特異的に吸着してしまい、選別効率が低下するという課題がある。我々は以前に、全方位非接触の界面を実現可能な音響浮揚技術に着目し、浮揚した液滴内で酵素反応やクリック反応が効率的に進行することを見出した[1]。この音響浮揚技術をファージ提示法に応用すれば、反応容器を使用しない親和性選択が可能となり、選別効率のさらなる向上が期待される。そこで本研究では 96 穴プレートを使用する従来法と、音響浮揚を使用する浮揚法の 2 通りでファージ提示法を行い、両手法から得られたペプチドの機能を比較した。標的分子はガングリオシド GM1 を受容体として認識するコレラトキシン B サブユニット（CTB）を用い、2 つの手法で得られた GM1 構造を模倣するペプチドの配列が異なることを期待した。

【方法および結果】

本研究では 7 残基のペプチドを提示するファージライブラリーを使用し、GM1 ミセル溶液で溶出を行う親和性選択を 4 ラウンド実施した。浮揚法では①ファージと CTB の相互作用、②CTB に結合したファージの溶出の 2 段階を浮揚液滴内で行った（Fig. 1）。ラウンドの進行により、従来法、浮揚法ともに回収率の上昇が見られたため、4 ラウンド目からファージのクローニングを行った。ファージ ELISA により、従来法と浮揚法からそれぞれ CTB 結合性ファージクローンを同定した。これらのファージが提示するペプチドを化学合成し、ABC（avidin-biotin peroxidase complex）法により CTB 結合親和性を評価した。従来法から得たペプチドでは CTB に結合しなかったのに対し、浮揚法から得たペプチドは CTB 結合親和性を示した。さらに、このペプチドは CTB と GM1 の結合を阻害する活性を有しており、GM1 の機能を模倣する可能性が示された。

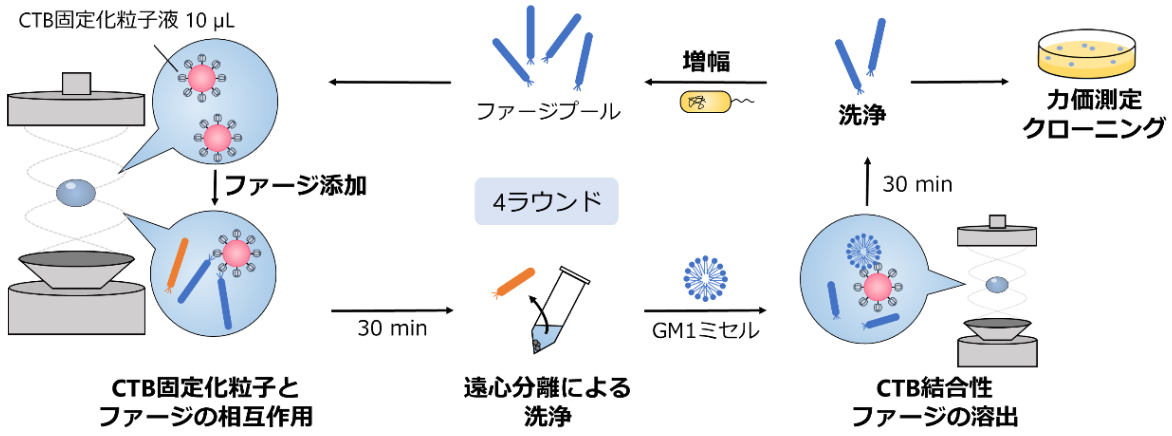


Fig. 1　浮揚した液滴内における親和性選択（浮揚法）.

Reference
1) T. Matsubara, *et al.*, *Adv. Sci.*, **8**, 2002780 (2020).

核導入ペプチドを持つ二核銅(II)錯体の合成及びその抗がん活性評価

○児玉愛実・畑真知・人見穣・小寺政人（同志社大院）

Synthesis and Cancer-Cell-Selective Toxicity of a Dicopper(II) Complex with NLS-Peptide Attached Phenol-2,6-bis(amide-tether-tacn) Ligand (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) KODAMA, Ami; HATA, Machi; HITOMI, Yutaka; KODERA, Masahito

現在、細胞障害性抗がん剤であるシスプラチンなどの白金製剤が広く臨床利用されている。これらは、DNA の guanine や adenine 塩基に結合して DNA を屈曲させ、複製・転写を抑制して抗がん活性を示す。しかし、これらは、正常細胞の guanine や adenine 塩基にも同様に作用するため、がん細胞選択性を示さず、深刻な副作用を生じることが問題である。この副作用の軽減に向け、正常細胞には作用せず、選択的にがん細胞を死滅させる抗がん剤の開発が求められている。

これまでに我々は、がん細胞選択的な抗がん剤開発のため、がん細胞の特異的な微小環境(弱酸性 pH、高い抗酸化剤濃度)に着目した。その中で、*p*-cresol の 2,6 位に 1,4,7-triazacyclononane (tacn)を amide-tether で結合させた二核化配位子 Hbtamide の二核銅(II)錯体[Cu_2(μ-OAc)(OAc)$_2$(btamide)] (**1**)を開発し、抗がん活性を評価してきた。**1** は正常細胞よりもがん細胞に 3 倍以上高い細胞毒性を示し、がん細胞選択的に高い細胞毒性を示すことを見出した[1]。しかし、がん細胞である HeLa 細胞株に対する IC_{50} 値は 47 μM であり、シスプラチンの IC_{50} 値 2.33 μM と比較して毒性が低い。そこで今回は、**1** の更なる細胞毒性向上を目指し、核標的能を有する核移行性シグナル(NLS)ペプチドの導入を検討した。NLS ペプチドとして、核への局在化が報告されている SV40T 抗原のアミノ酸配列(VKRKKKP)を持つものを選択した[2]。さらにクリック反応による Hbtamide への NLS ペプチドの導入を可能にするため、NLS ペプチドの N 末端に Cys を導入した。これを開発すれば、核へ局在化・細胞への集積量の増加を実現し、より効率的に **1** のがん細胞選択的な細胞毒性の発現が期待できる。

本研究では、Fig. 1 に示す Hbtamide-P2-NLS とその二核銅(II)錯体 [Cu_2(μ-OAc)(OAc)$_2$(btamide-P2-NLS)] (**2**)を設計・合成したので報告する.

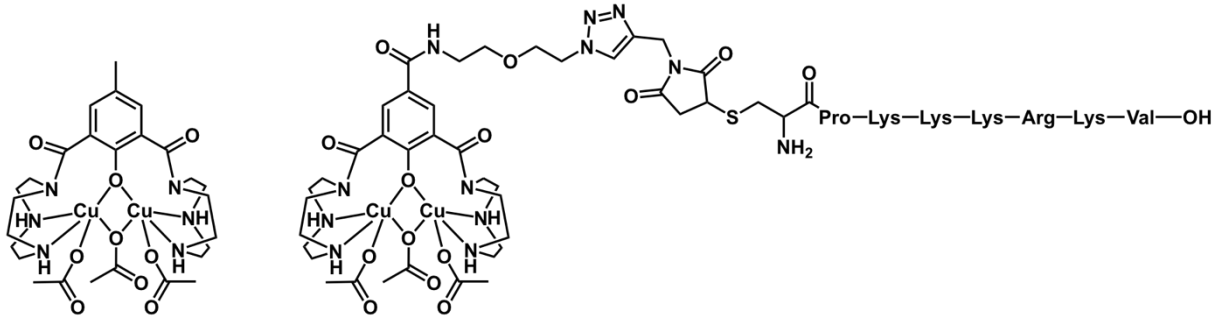


Figure 1. Chemical structures of **1** (left) and **2** (right)

[1] 畑 真知氏, 2020 年度 同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻修士論文
[2] F. Noor, A. Wstholz, R. Kinscherf, N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2481–2485

グラフェン上に細胞質側の細胞膜を露出させるペプチド界面の設計

〇齊藤彰吾・立松宗一郎・田中祐圭・大河内美奈（東京工業大学物質理工学院）

Design of a peptide interface to expose the cytoplasmic side of the cell membrane on graphene

(Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo institute of Technology) SAITO, Shogo; TATEMATSU, Soichiro; TANAKA, Masayoshi, and OKOCHI, Mina

【目的】

生体膜にはイオンチャネル等の多種類の膜タンパク質が存在し、これらはしばしば創薬ターゲットとしても用いられることから、機能や応答の計測やイメージング法の開発が進められている。イオンチャネルを標的とした人工細胞膜デバイスの開発を中心に様々な刺激や薬剤応答の評価がさかんに行われてきたが、実際に細胞の生体膜を用いた応答計測には課題があった。本研究では、次世代エレクトロニクス材料として注目されるグラフェンなどの二次元ナノ材料上で細胞の培養界面を構築した。脂質膜に対して強い相互作用をもつペプチドとグラフェン結合性ペプチドを連結した二機能性ペプチドを用いて、高配向性熱分解グラファイト（HOPG）上に自己組織的にペプチドを修飾した。このペプチド界面上で細胞培養後、浸透圧ショックを行うことで、ペプチド界面によって細胞の底面膜が保持された状態で細胞を破砕し、グラフェン上に細胞膜界面を構築した。

【方法】

細胞膜と強く相互作用する配列の探索には、ペプチドアレイを用いた。ペプチドアレイは、既報の膜透過性ペプチド 14 配列と膜融合性ペプチド 3 配列を候補とし、これをスポット合成することで作成した。各ペプチドの評価は、蛍光染色した NIH-3T3 細胞を PBS 中でペプチドアレイ状に播種し、結合した細胞数の計数により行った。グラフェン結合性配列は、グラフェンとのπ-π相互作用が報告される既知配列から選抜し、原子間力顕微鏡を用いた被覆率を評価した。次に、グラフェン結合性配列と細胞膜結合性配列を連結したペプチドを合成し、ペプチド溶液をグラフェンと同様の表面構造を有する HOPG 上に滴下することで自己組織的にペプチド界面を構築した。このペプチド界面上に NIH-3T3 などの細胞を播種し、培養した。ペプチド界面は、結合細胞のカウントにより算出した接着率と、蛍光試薬を用いて算出した細胞生存率によって評価した。HOPG 上での細胞底面膜の露出は、細胞核および膜を染色後、培養液を氷冷した超純水に置換することで浸透圧ショックを行った。HOPG 上の細胞底面膜は、PBS 洗浄後、蛍光顕微鏡および走査型電子顕微鏡で観察した。

【結果および考察】

ペプチドアレイを用いた結合試験より、細胞膜に強く結合するペプチドとして、 SIV ペプチド (AVFVLGFLGFLATAGKKK) が選抜された。また、FEFQFNFK ペプチドは、グラフェン上に安定に結合したことから、グラフェン結合性ペプチドとして用いた。 SIV ペプチドとグラフェン結合ペプチドを連結した二機能性ペプチドを HOPG 上に滴下することにより、安定した細胞接着がみられ、細胞培養が可能となった。このペプチド界面上の細胞に対して浸透圧ショックを行ったところ、細胞破砕によりしたところ、細胞核が抜け、細胞底面膜が露出する様子が蛍光顕微鏡により観察された。さらに走査型電子顕微鏡による観察では、細胞底面膜の微細な線維状や球状の構造が確認された。今後は、生体膜デバイスの開発により、膜受容体などの膜タンパク質の高感度での活性計測について検討する。

分割インテインを活用したMDM2タンパク質に結合するペプチドの探索

○渡辺雄太郎・高橋剛（群馬大院理工）

Selection of Peptides That Bind to MDM2 Protein Using an Engineered Split Intein (Graduate School of Science and Technology, Gunma University) WATANABE, Yutaro; TAKAHASHI, Tsuyoshi

E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 タンパク質は、がん抑制タンパク質 p53 と結合してその転写活性化能の抑制を誘導している。いくつかのがんでは、MDM2 の遺伝子の増幅や MDM2 の過剰発現により、p53 の機能が強く阻害されている。そのため、MDM2 に結合することで、p53 の機能の回復を可能とする化合物の探索が精力的に行われている。

一方、分割インテインは、2 つのポリペプチド鎖（エクステイン）を protein trans-splicing (PTS) で連結させる酵素様のタンパク質である。当研究室ではこれまでに、改変型分割インテインに、相互作用するペプチドとタンパク質を融合することで、ペプチド–タンパク質間の相互作用に依存して PTS 反応が進行する系を構築した。本研究では、エクステインにカナマイシンキナーゼである aminoglycoside3'-phosphotransferase (APH) の分割体を用い、大腸菌のカナマイシン耐性を指標としたペプチド–タンパク質間相互作用検出系の構築を目的とした。また、構築した検出法を用いて、ペプチドライブラリから MDM2 タンパク質に結合するペプチドの探索法への応用を試みた。

最初に、MDM2 に解離定数（K_d）約 3 nM で結合する PMI (TSFAEYWNLLSP) ペプチドと MDM2 を用いたモデル実験を行った (1)。APH の N 側断片、N インテイン、MDM2 を連結した融合タンパク質（APHN-IntN-MDM2）と、PMI、C インテイン、APH の C 側断片を融合したペプチド（PMI-IntC-APHC）を設計した。PMI 配列の 2、3、7、9、10 残基目をそれぞれ Ala に置換し、MDM2 との結合親和性を変化させたペプチドを設計した。対応する遺伝子をコードしたプラスミドで大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、ITPG 存在下で発現誘導した後、カナマイシン含有寒天培地で培養した。カナマイシン濃度 20 μg/mL では、K_d が 1 μM 以下のペプチドを発現する大腸菌は生存した。一方、カナマイシン濃度 320 μg/mL では、K_d が 10 nM 以下のペプチドだけが生存した。以上から、ペプチドと MDM2 との結合親和性と、大腸菌のカナマイシン耐性に相関があることが分かった。

次に、12残基からなるペプチドライブラリを構築し、MDM2と結合するペプチドの探索を試みた。APHN-IntN-MDM2とペプチドライブラリ遺伝子を配置したIntC-APHCを大腸菌で発現させ、カナマイシン含有寒天培地で培養した。生育した大腸菌からプラスミドを抽出し、ペプチド配列を解析した。カナマイシン濃度160 μg/mLから獲得したコロニーは、同一の配列のクローンが複数みられた。また、各ペプチドとも、MDM2との結合に重要なi残基目のPhe、i+4残基目のTrp、i+7残基目のLeu（またはPhe）が保存されていた。このことから、得られたペプチドは、MDM2との結合能をもつことが示唆された。

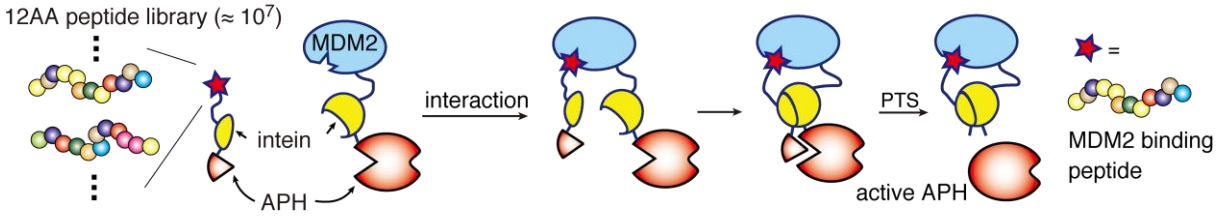


図 . PTS 反応を用いた MDM2 に結合するペプチドの探索の概略図 .

1) C. Li., et al., *J. Mol. Biol.*, **398**, 200-213 (2010).

維持メチル化機構解明を目指したジユビキチン化 PAF15 タンパク質の効率的化学合成ルートの開拓

○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]横市大院医）

Development of an efficient chemical synthesis route for dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University[2]) TAKAHASHI, Yuya[1]; KORI, Satomi[2]; ARITA, Kyohei[2]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1]

「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 1)を組み合わせたものであり、メチル化やアセチル化、ユビキチン（Ub）化などの翻訳後修飾を有するタンパク質の作製を可能にする。本研究では、DNA 維持メチル化において重要な働きを担う Ub 化が 2 カ所に入った PAF15 タンパク質（PAF15Ub2）2)の合成ルートを開拓することを目的とした。

第 1 世代の合成ルートでは、全長 262 アミノ酸からなる PAF15Ub2 を計 5 つのペプチド断片に分割し、N 末端側から C 末端側へ向けてペプチド順次連結させる形で合成を行ったが、生成物の収率が 0.07%、純度が 18 %であり、その後の生化学実験に用いることができなかった。そこで、これらの問題点を解決するため合成ルートを変更することとした(Fig. 1A)。第 2 世代の合成ルートでは変更点として、まず合成ルート全体を、ペプチド 6 と 9 を別々に作製する「収束的合成ルート」へと変更した。また、セグメント 1、2、3 を途中で精製を介さずに連結する「ワンポットライゲーション法」を用いてペプチド 6 の収率の改善を図った。さらに、セレノシステインをセグメント 4 に導入することで、セグメント 5 の配列中に存在するシステインを残しながら選択的にアラニンへと変換が可能となる。結果として、セグメント 1、2、3 のワンポットライゲーションでは収率 41%で得られ、以前のスキームと比較すると、約 4 倍の収率向上に成功した。そして、得られた 6 を脱硫反応により 7 に変換したのち、単離した 7 と 9 の連結反応とセレノシステインからアラニンへの変換をワンポットで行った結果、この 2 段階反応の収率が 22 %で目的の PAF15Ub2 を得ることに成功し、SDS-PAGE 解析によって得られた PAF15Ub2 が高純度であることが明らかとなった(Fig. 1B)。反応経路全体の収率は 4.6 %となり、第 1 世代の合成ルートと比較して約 60 倍の収率の向上に成功した。

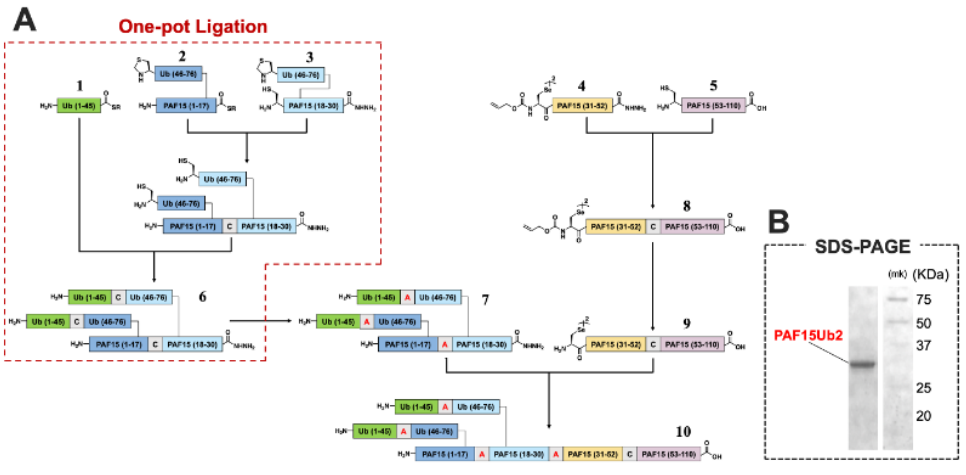


Fig 1. Synthesis of PAF15Ub2. (A) New ligation scheme of PAF15Ub2. (B) Result for SDS-PAGE analysis.

1) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science*, **266**, 776 (1994)
2) A. Nishiyama, D. B. Mulholland, S. Bultmann, S. Kori, A. Endo, Y. Saeki, 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)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

WYP-rich 大環状ペプチドライブラリの構築と有用性の検証

○鷲見大河[1]・藤野公茂[1]・村上裕[1,2]（[1]名大院工、[2]名大ナノライフ）

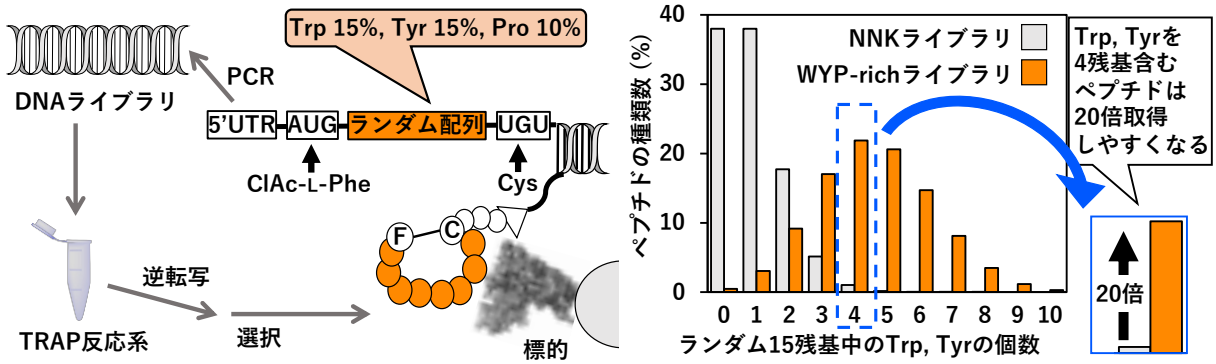
WYP-rich macrocyclic peptide library as a high quality library for *in vitro* selection ([1]Graduate School of Engineering, Nagoya University, [2]Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University) Taiga Sumi,[1] Tomoshige Fujino,[1] Hiroshi Murakami[1,2]

大環状ペプチドは、高い特異性と合成の容易さから、新たな中分子創薬モダリティとして注目されている。進化分子工学的手法では、高い多様性を持ったライブラリから結合力の強い大環状ペプチドの創製が可能であり、中でも、mRNA 提示法や、我々の研究室で開発した TRAP 提示法 (図左) を用いて調製される大環状ペプチドライブラリは [1)]、10〜100 兆種類程度と非常に高い多様性を持っている。

ライブラリでは、多様性が高いほど、高い親和性・特異性を持つ大環状ペプチドが得られることは明らかであるが、質についてはどうであろうか。通常、ライブラリをコードする DNA は、20 種類の天然アミノ酸を網羅しつつ、各アミノ酸の出現割合を均一化し、終止コドンの出現割合を低くするため、NNK (N=A/T/G/C, K=T/G) の繰り返し配列で合成する。しかし、親和性の高い大環状ペプチドの取得を目的とした場合、NNK から得られるアミノ酸組成が適切であるかはまだ検証されていない。一方で、抗体や人工抗体の結合ループのアミノ酸組成を調べた研究では、Trp, Tyr が多く含まれることが知られており [2)]、この 2 つのアミノ酸は、結合に有利に働くと考えられている。

本研究では、抗体や人工抗体と同様に大環状ペプチドにおいても、Trp, Tyr が結合に有利に働くという仮説を立てた。また、環状ペプチドが標的となる分子と結合するには一般的に構造が制限された方が良いと考えられており、ペプチド中の Pro の割合を高めることで構造がより安定になると考えた。これらの仮説を検証するため、Trp, Tyr, Pro の含有率を高めた大環状ペプチドライブラリ (WYP-rich ライブラリ、図左) を構築した。ここで、ランダム配列が 15 残基のペプチドに含まれる Trp, Tyr の残基数を考えると (図右) 、従来の NNK ライブラリでは 0 または 1 残基のものが 8 割近くを占めるのに対し、WYP-rich ライブラリでは 4 残基を中心とした分布となる。Trp, Tyr をペプチド中に 4 残基程度含むことが結合に有利に働くと仮定すれば、このようなペプチドの種類数は、これまで使用されてきた NNK ライブラリに比べて WYP-rich ライブラリで 20 倍も多くなる。よって、WYP-rich ライブラリでは結合力の高いペプチドが得られる可能性が高まると考えられる。

本発表では、上記の仮説を検証するために WYP-rich ライブラリと NNK ライブラリを調製し、様々な標的タンパク質に対し TRAP 提示法による選択を行った結果と、選択後に次世代シークエンスにより得られた配列群を解析した結果について報告する。



1）T. Ishizawa et.al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135(14), 5433.
2）T. Kondo et.al., *Sci. Adv.* **2020**, 6(42), eabd3916.

脂質ラフト上の GM1 に誘起された Aβ 凝集を阻害する環状ペプチドの開発

○宮本恵里花・松原輝彦・佐藤智典（慶應大理工）

Development of the cyclic peptide which inhibit amyloid β aggregation induced by GM1 cluster on lipid raft

(Faculty of Science and Technology, Keio University) MIYAMOTO, Erika; MATSUBARA, Teruhiko; SATO, Toshinori

【緒言】アミロイドβタンパク質 (Aβ) は凝集することで細胞に毒性を呈し，アルツハイマー病 (AD) の発症および進行に深く関与する．毒性凝集体の形成は，神経細胞膜表面上のガングリオシドに誘起されることが知られている．Aβ が脂質ラフト上のガングリオシドクラスターに結合して構造変化を起こし，さらなる凝集の起点となる凝集核を形成する [1]．我々は以前に，ファージ提示法により GM1 結合性ペプチドを同定し，ペプチドが折れ曲がった立体構造を形成して膜上の GM1 に結合すること，Aβ 線維化の阻害能を有することを明らかにした [2, 3]．ペプチドは環化することで，構造安定性や結合能の向上が期待できる．そこで本研究では，分子内架橋により側鎖間で環化した GM1 結合性環状ペプチドを設計し，脂質ラフトを模倣した平面脂質二分子膜を用いて機能評価を行った．

【方法】 GM1 存在下での p3 の立体構造をもとに、近接する 2 残基を Cys に置換したペプチドを Fmoc 化学で合成し，空気酸化により GM1 に結合する環状ペプチド cy-p3 を得た．脂質ラフトを模倣した人工膜として 10%GM1 含有脂質膜 (GM1/sphingomyelin (SM) /cholesterol (chol), 10:45:45) を基板上に写し取り，ELISA 法や表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で結合能を評価した．次に，10%GM1 含有脂質膜をリン脂質を被覆したマイカ基板上に写し取って脂質二重膜を作製し，膜上で 1 μM $Aβ_{42}$ とペプチドを 37 ℃で 24 h 相互作用させ，膜表面のトポグラフィーを原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した．さらに，10%GM1 含有リポソームを作製して $Aβ_{42}$ と相互作用させ, チオフラビン T (ThT) アッセイにより $Aβ_{42}$ 凝集の経時的変化を観察した．

【結果】GM1 結合性ペプチド p3 と環状ペプチド cy-p3 の 10%GM1 含有膜との結合能を SPR 法で評価した結果，解離定数はそれぞれ 0.64 μM および 0.23 μM で，環化後も結合能が維持されていた．次に 10%GM1 含有膜にペプチドと 1 μM $Aβ_{42}$ を同時に相互作用させて AFM 観察を行ったところ，観察される $Aβ_{42}$ 線維の長さがペプチド存在下で減少した. p3 と cy-p3 の $Aβ_{42}$ 凝集に対する阻害能 IC_{50} はそれぞれ 9.7 pM，92 fM であり，ペプチドの環化によって 100 倍向上した．さらに，ThT アッセイから，ペプチドは凝集量の抑制効果に加え，$Aβ_{42}$ が凝集核を形成する時間を延長する効果が示された．

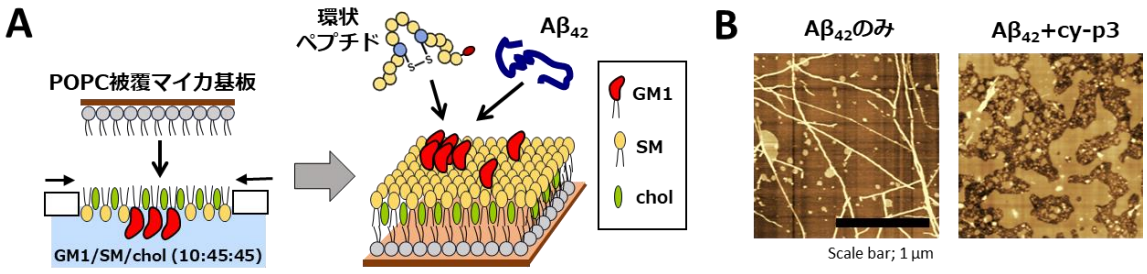


Fig. 1 (A)脂質二重膜の作製と環状ペプチドの $Aβ_{42}$ 凝集阻害能の評価, (B) GM1 含有膜上で誘起される $Aβ_{42}$ 凝集に対するペプチドの阻害能 (同時投与) の AFM 観察.

References
1) K. Yanagisawa, *et. al.*, *J. Neurochem.*, **116**, 806-812 (2011).
2) K. Fujitani, *et. al.*, *Carbohydr. Res.*, **29**, 2258-2264 (2017).
3) T. Matsubara, *et. al.*, *ACS. Chem. Neurosci.*, **13**, 1868-1876 (2022).

免疫細胞の活性化に向けた抗原修飾ペプチド集合体の創製

○山口恭平[1]・若林里衣[2]・神谷典穂[1, 2]・後藤雅宏[1, 2]（[1]九大院工、[2]九大未来化セ）

Creation of antigen-modified peptide assemblies for activation of immune cells (Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University [2]) Yamaguchi, Kyohei[1]; Wakabayashi, Rie[1]; Kamiya, Noriho[1, 2]; Goto, Masahiro[1, 2]

免疫細胞の一種である B 細胞は、病原体の抗原に特異的な抗体を産生することで感染症等から身を守るための生体防御反応における中心的な役割を担っている。B 細胞は細胞膜上に B 細胞受容体 (BCR) を発現しており、この BCR が病原体上の抗原を認識しクラスター化することで活性化され、抗体産生が行われる。そのため、人為的な B 細胞の活性化は免疫療法やワクチン開発につながると期待される。

本研究では、B 細胞を活性化させる材料として両親媒性ペプチド (PA) が水中で形成する自己集合体に着目した。PA 集合体は抗原修飾 PA を導入することで抗原が修飾された PA 集合体を調製することができる。上述の通り、B 細胞の活性化には BCR のクラスター化が重要であり、BCR の細胞膜上における可動性が必要である。これに対して、PA 集合体は自己組織化により形成される動的な構造体であり、PA 集合体上の抗原も移動することが可能であるため、B 細胞の活性化を誘導する材料として非常に有用であると考えた。

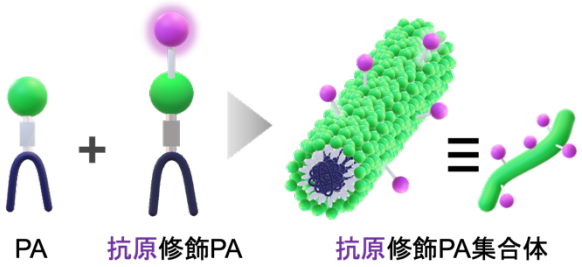


Fig 1. Preparation of antigen-modified PA assemblies.

以上の背景から、本研究では抗原修飾 PA 集合体を用いた B 細胞の活性化を目的とした。今回、モデル抗原として 4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸 (NP) を利用した。そして、材料部の制御として PA の疎水部の長さ、また、抗原部の制御としてスペーサーの長さが B 細胞の活性化に及ぼす影響を評価した。具体的には、疎水部に長さが異なるアルキル鎖 (C8, C10, C12, C14) を導入した 4 種類の PA として Cn-PA (n = 8, 10, 12, 14) 合成した。また、Cn-PA に NP を修飾した Cn-PA-NP (n = 8, 10, 12, 14) 、および、抗原修飾部位に長さの異なるスペーサーとして polyethylene glycol (PEG) を導入した Cn-PA-(PEG)m-NP (m = 2, 6) を合成した。これらを利用してアルキル鎖長およびスペーサー長が異なる NP 修飾 PA 集合体を調製した。これらの NP 修飾 PA 集合体を NP に対する BCR を発現する B 細胞に作用させることで活性化を試みた (**Fig. 2**)。本発表では、PA のアルキル鎖長およびスペーサー長が B 細胞の活性化に及ぼす影響を報告する。アルキル鎖長およびスペーサー長が異なる NP 修飾 PA 集合体を作用させることで B 細胞の活性化挙動に影響を及ぼすことが確認された。

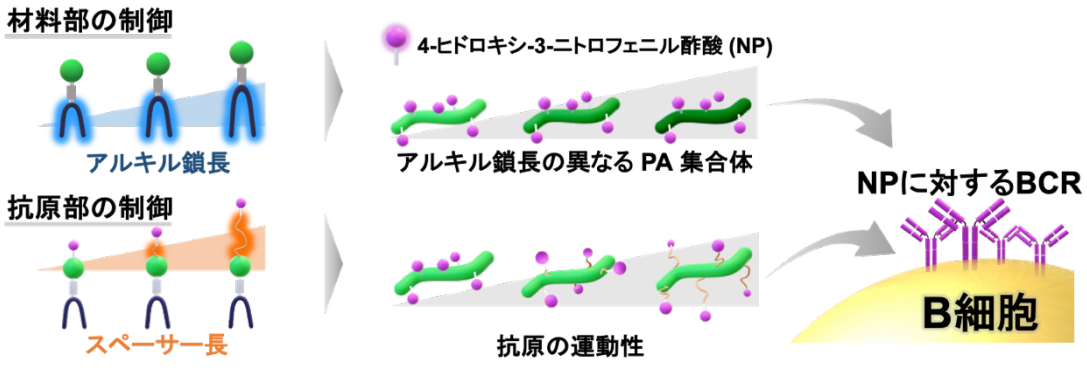


Fig 2. Schematic illustration of this study

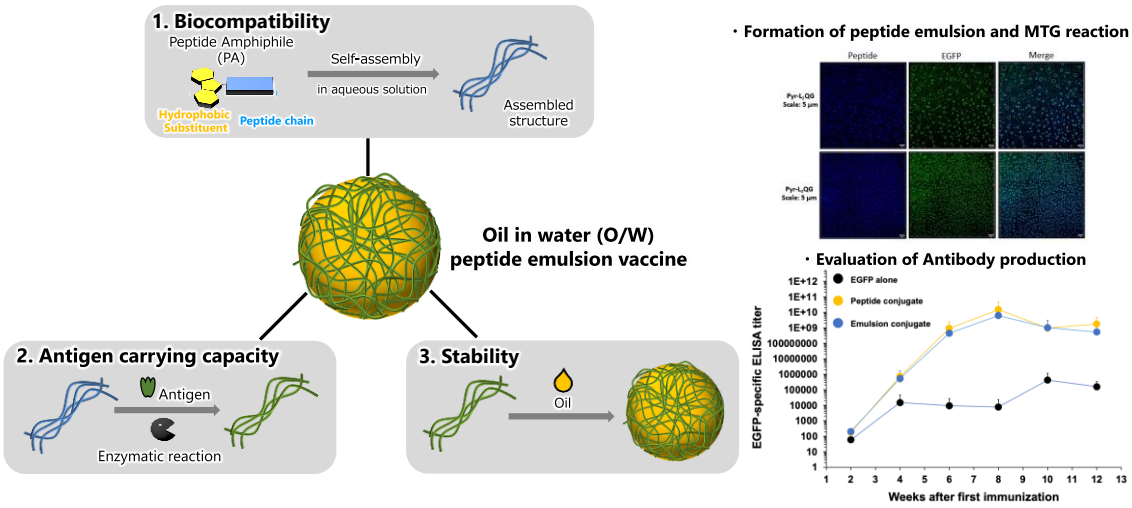
酵素反応性自己組織化ペプチドに基づくエマルション型ワクチンの創製

○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）

Fabrication of emulsion vaccines based on enzyme reactive self-assembling peptides. (Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University [2]) Higuchi, Ayato[1]; Wakabayashi, Rie[1]; Goto, Masahiro[1, 2]; Kamiya, Noriho[1, 2]

ワクチンによる高い免疫効果を得るためには、抗原と免疫増強効果を有する物質であるアジュバントの同時投与が重要である。Oil-in-water (O/W) 型エマルションは抗原と同時投与することでアジュバント効果を示すことが知られている。そこで本研究では、高い有効性を示す O/W 型エマルションワクチンの創製を目指す。この目的を達成するために界面安定化剤として両親媒性ペプチド (PA) が形成するナノファイバーの利用を考えた[1]。これまでに我々は、グルタミン残基とリジン残基もしくは1級アミンを架橋する酵素である微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) によるタンパク質の部位特異的反応を用いて、PA 集合体上へのタンパク質の集積化に成功しており[2]、この技術を用いることで O/W エマルション界面に存在する PA 構造体上に抗原を特異的かつ安定に担持できるため高い免疫効果が得られることが期待される。

本研究では、MTG 酵素反応性 PA として Pyrene-L_nQG (n = 2, 3) を設計し、リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解させることで集合体を調製した。PA 集合体上に MTG 反応性の Lys 残基を有するモデル抗原タンパク質 EGFP を MTG 反応により導入することで抗原の共有結合的な修飾を行った。抗原タンパク質修飾 PA、共界面活性剤 PEG400、油相に squalene を用いてペプチドエマルションを作製した。マウスを用いた抗原に対する抗体産生評価にて、抗原タンパク質単体を投与した EGFP のみと比較して、抗原タンパク質修飾 PA 集合体とペプチドエマルションは高い抗体産生能を示した。



[1] S. Bai *et al*., *ACS Nano*, **8**, 7005-7013 (2014)

[2] R. Wakabayashi *et al*., *Chem. Commun*., **55**, 640 (2019); R. Wakabayashi *et al*., *Int. J. Mol. Sci*., **22**, 3459- (2021)

ヘムタンパク質の折り畳みと変性の挙動に基づく刺激応答性ゲルの開発

○影山和希・浦山貴大・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Construction of a stimuli-responsive hemoprotein-based hydrogel driven by folding and unfolding behaviors (Graduate School of Engineering, Osaka University) KAGEYAMA, Kazuki; URAYAMA, Takahiro; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

外部刺激に応答して体積や性質を自発的に変化させる刺激応答性材料は、化学センサーやアクチュエーターへの応用を指向する材料として注目されている。このような材料の構築において、構成要素となる分子のミクロな性質をバルク材料の物性に反映する手法は、刺激応答性を発現する有力な戦略である。我々は刺激応答性材料の素材としてタンパク質に着目した。タンパク質は大きな安定化エネルギーを獲得する折り畳み構造を有しており、その構造や機能は pH 変化、温度変化などの外部環境に大きく影響を受けるため、刺激応答性材料の素材として優れている。

本研究では、電子伝達ヘムタンパク質であるシトクロム *c* に着目した（Fig. 1）。シトクロム *c* は補因子であるヘムが 2 つのシステイン残基とスルフィド結合を介してタンパク質マトリクスと結合した構造を有し、ヒスチジン残基およびメチオニン残基がヘムの鉄中心に配位している。シトクロム *c* の折り畳み構造の安定性はメチオニン残基と鉄中心の配位結合と密接に関係しており、メチオニン残基の脱配位により折り畳み構造の一部が崩壊することが報告されている [1]。この配位結合の安定性は鉄中心の酸化還元状態に強く依存し、シトクロム *c* の折り畳み構造の安定性は鉄 2 価の方が鉄 3 価よりも高いことが報告されている [2]。この性質を利用して、鉄中心の酸化還元をトリガーとするタンパク質の折り畳みと変性の過程を追跡する研究が多く行われてきた。本研究では、シトクロム *c* を用いて、鉄中心の酸化還元に伴う折り畳み構造の摂動を作用機序とする刺激応答性ゲルの開発を試みた。

シトクロム *c* の表面には多数のリジン残基が存在しており、このε-アミノ基とグルタルアルデヒドを反応させ、シッフ塩基により架橋し、さらにこのシッフ塩基をシアノ水素化ホウ素ナトリウムで還元した後、フェリシアン化カリウムで鉄中心を酸化することで、シトクロム *c* を構成要素とするゲルを調製した。このゲルを 3.5 M のグアニジン塩酸塩を含む緩衝液に浸漬すると約 2.2 倍の体積に膨潤した。次に還元剤としてジチオナイトと変性剤を含む溶液に浸漬し、鉄中心の還元を行うと、初期の体積の 1.2 倍ほどに収縮した(Fig. 2)。このサイクルは可逆であり、最大 3 回繰り返し可能であることを確認している。ゲルの大きな体積変化を酸化還元により制御することを達成した。種々の対照実験より、これらの体積変化はシトクロム *c* のタンパク質マトリクスが、変性と折り畳みを可逆的に繰り返すことで引き起こされていると考察される。

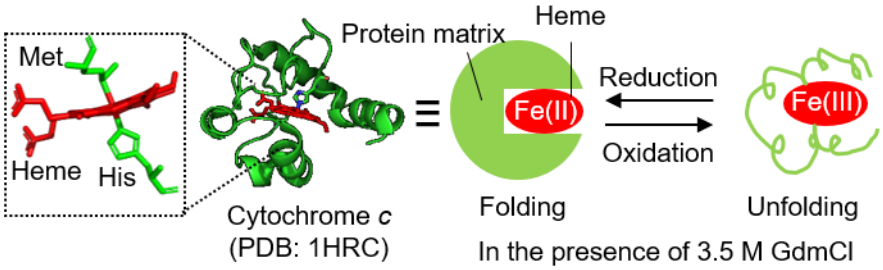


Fig. 1. Redox-dependent folding-unfolding behavior of cytochrome *c*.

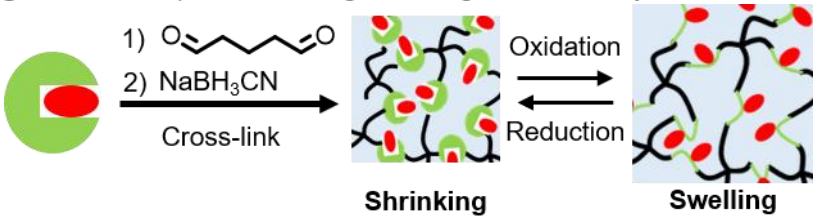


Fig. 2. Preparation of cytochrome *c*-based hydrogel.

[1] D. L. Rousseau *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 17853. [2] H. B. Gray *et al.*, *Science*, **1996**, *271*, 1558.

β-フルオロビニルスルホンアミドを活用するシステイン選択的なコバレントドラッグの開発

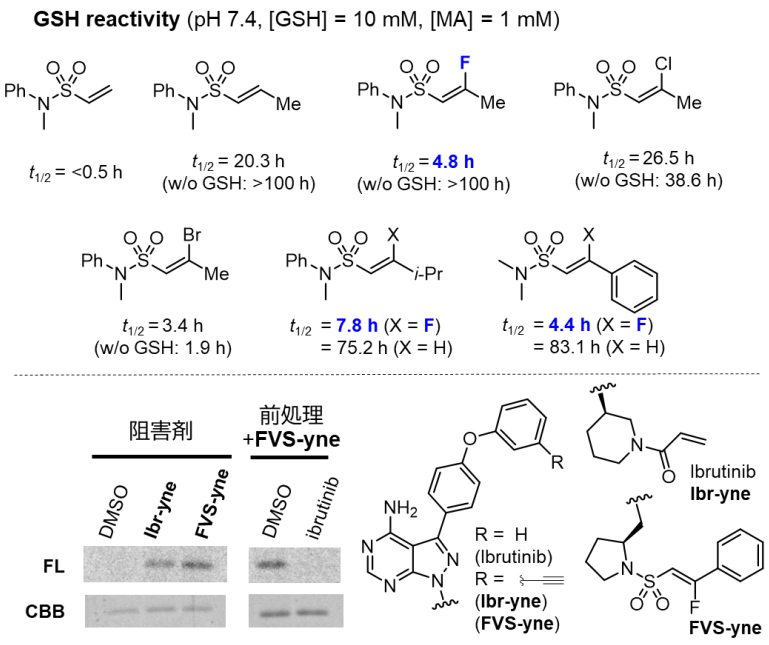
○渡邉俊佑・徳永啓佑・廣瀬侑也・田中雄大・進藤直哉・王子田彰夫（九大院薬）

Development of Cysteine-selective Covalent Drugs Utilizing β-Fluorovinylsulfonamides (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University) WATANABE, Shunsuke; TOKUNAGA, Keisuke; HIROSE, Yuya; TANAKA, Yudai; SHINDO, Naoya; OJIDA, Akio

近年低分子創薬において、標的タンパク質と特異的に共有結合を形成（ラベル化）するコバレントドラッグが注目されている。コバレントドラッグは標的タンパク質と相互作用する「リガンド」部位と、標的タンパク質のアミノ酸残基と反応する「反応基」からなる[1]。これまでにコバレントドラッグの反応基として、システイン残基と反応するアクリルアミドなどのマイケルアクセプター（MA）が汎用されてきた。一方で、β位に置換基を導入した MA 型反応基は反応性が著しく低下することから、従来の MA 型反応基はβ位無置換やアミノメチル置換がほとんどで構造多様性に乏しい。本研究では、これまでに反応基として利用例の少ないビニルスルホンアミドに着目し、反応性のチューニングが可能な新しい MA 型反応基の開発に取り組んだ。

種々のビニルスルホンアミドのシステイン反応性をグルタチオン（GSH）を用いて評価した（図上）。β 位がメチル基で置換されたビニルスルホンアミドは、無置換のものと比べて反応性が大きく低下した。β位をさらに種々のハロゲン原子で置換したところ、β-フルオロビニルスルホンアミド（FVS）は水中安定性を失わずにシステインに対する十分な反応性を示す事がわかった。FVS はフェニル基やイソプロピル基といった比較的かさ高い置換基を β 位に導入する事で、反応性の自由なチューニングが可能であった。一方で FVS は塩基性条件下において、リジン残基に対する反応性を示すが付加体は中性条件下で容易に加水分解される可逆的な反応を示した。

FVS のコバレントドラッグの反応基としての効果を検証すべく、アルキンタグを有する Burton 型チロシンキナーゼ（BTK）阻害剤 **FVS-yne** を合成し、精製 BTK キナーゼドメインをラベル化した（図下）。アルキンタグを TAMRA-N_3 と反応させ蛍光を検出すると、**FVS-yne** のラベル化効率は既承認薬 Ibrutinib の骨格を有する **Ibr-yne** と同程度であった。また、**FVS-yne** の蛍光は BTK キナーゼドメインを Ibrutinib で前処理すると消失したことから、標的システイン残基選択的なラベル化が示唆された。



Reference
1. N. Shindo and A. Ojida, *Bioorg. Med. Chem.*, 2021, **47**, 116386.

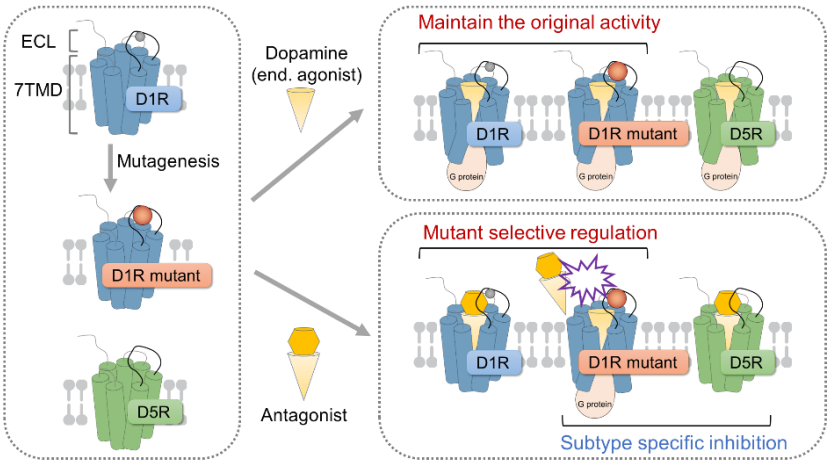
ドーパミン受容体のサブタイプ選択的活性制御を可能にするケモジェネティクス

〇柏 俊太朗・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

***De novo* chemogenetic approach for subtype selective regulation of dopamine receptor activity** (Graduate School of Engineering, Nagoya University) Shuntaro Kashiwa; Tomohiro Doura; Shigeki Kiyonaka

神経伝達物質の一つであるドーパミンは、ドーパミン受容体（DARs）を介したシグナル伝達により運動機能、意欲、快感に関連する行動を制御する。[1] ドーパミンニューロンの失調は、パーキンソン病、統合失調症をはじめとする様々な疾患の原因となることから、それを受容する DARs の機能に対する関心は創薬の面からも非常に高まっている。DARs には 5 種類のサブタイプが存在し、これらは異なる生理機能を有することから、各々のサブタイプの機能を明らかにすべく薬理学や遺伝子工学に基づくアプローチがとられてきた。しかし、DARs のなかでも興奮性のシグナル伝達を担うドーパミン D1 受容体（D1R）とドーパミン D5 受容体（D5R）に関してはサブタイプ選択的な薬剤が存在せず、薬理学的な機能解明は困難である。また遺伝子工学的手法についても過去の報告から、D1R をノックアウトしたマウスでは D1R の欠失に対する代償機構が働くことが示唆されており [2]、既に報告された D1R の生理機能の正当性にも疑問が残る。このような背景から我々は、「受容体本来の機能を維持できる変異を遺伝子工学的に導入した動物個体に対して、変異体選択的に作用する小分子を投与する」ことで D1R と D5R の正しい機能が明らかになると考えた。そこで、当研究室で提唱する化学遺伝学的な GPCR の活性制御法である extracellular-Loop Engineered Chemogenetics (eLEC)の DARs への適用を試みた。

D1R / D5R のうち D1R については多数の構造情報が報告されているため、D1R に対して構造情報を基にデザインを行った。過去の報告から D1R のドーパミン結合部位は 7 回膜貫通ドメイン（7TMD）に存在し、細胞外ループ（ECL）はドーパミンとの結合に影響しないが、人工リガンドとは相互作用することが示唆されている。[3] そこで、D1R の ECL 領域へ立体障害の大きなアミノ酸を導入した変異体作製を行った。また、これら変異体に対してドーパミン活性及び D1R / D5R の阻害剤による阻害能のスクリーニングを行うことで、ドーパミンに対する応答性を維持しながら、野生型よりも阻害能が約 2000 倍低下する変異体と阻害剤のペアを見出した。本手法はドーパミン受容体のみならず、広範な GPCR に対して適用可能な活性制御法となることが期待される。



1) T. Nagai *et al. Neuron* (2016)
2) T. Okubo *et al. Int. J. Dev. Neurosci.* (2018)
3) P. Xiao *et al. Cell* (2021)

シクロオキシゲナーゼを利用した海洋微細藻類におけるプロスタグランジンの生合成

○菊地美穂[1]・松本奈々[1]・鶴雄基[1]・前田義昌[2]・吉野知子[1]・田中剛[1]（[1]東京農工大院工、[2]筑波大院生命環境）

Biosynthesis of prostaglandin by the marine microalga with cyclooxygenase (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology [1], Graduate School of Life and Environmental Sciences, Tsukuba University [2]) KIKUCHI, Miho[1]; MATSUMOTO, Nana[1]; TSURU, Yuki[1]; MAEDA, Yoshiaki[2]; YOSHINO, Tomoko[1]; TANAKA, Tsuyoshi[1]

プロスタグランジン (PG)は C20 脂肪酸からシクロオキシゲナーゼ (COX)により合成される生理活性物質であり、医薬品として広く利用されている。これまでに植物において、COX の異種発現による PG 生産が試みられているが、生産性向上が課題である。そこで当研究室では、PG 前駆体である C20 脂肪酸を高含有する海洋微細藻類 *Fistulifera solaris* に *cox* 遺伝子を導入することで PG 生産を試みている。近年、*F. solaris* と同じ珪藻において COX の存在が示唆されているが、珪藻 COX の機能解析は行われていない [1,2]。本研究では、微細藻類を用いた PG 生産に向けて、C20 脂肪酸を合成する小胞体への COX の局在が PG の生合成に及ぼす影響を評価した。

珪藻 COX の機能解析として、ColbFold を用いて、*Thalassiosira rotula* 由来 COX (TroCOX) 及び *Skeletonema marinoi* 由来 COX (SmaCOX) のアミノ酸配列から立体構造を予測した。予測した珪藻 COX の立体構造を Fig. 1 に示す。TroCOX 及び SmaCOX において、シクロオキシゲナーゼ活性に重要なアミノ酸やペルオキシダーゼ活性に必要なヘム結合部位の立体構造が保存されていることが予測された。したがって、この 2 種の珪藻 COX は機能ドメインを保持しており、PG エンドペルオキシド合成酵素として機能することが示唆された。

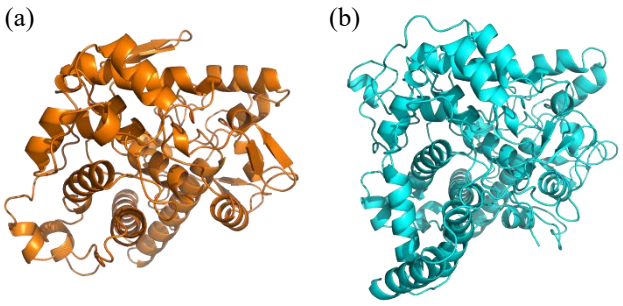


Fig. 1 Superposition of modeled COX structures. (a) TroCOX structure; (b) SmaCOX structure

紅藻 *Agarophyton vermiculophyllum* 由来 *cox* 遺伝子 (*Avcox*)、または小胞体シグナルペプチドを融合した *Avcox* 遺伝子を有するベクターをそれぞれ構築し、*F. solaris* に導入した。AvCOX の発現が確認された形質転換体を選抜したのち、藻体内での PG の存在を確認した。その結果、アラキドン酸由来の PG 3 種 (PGD_2、PGE_2、$PGF_{2\alpha}$)及びエイコサペンタエン酸由来の PG 3 種 (PGD_3、PGE_3、$PGF_{3\alpha}$)が生合成されていることを確認した。さらに、AvCOX に小胞体輸送シグナルペプチドを融合したことにより総 PG 含有量が 1.4 倍向上することが分かった。このことは、PG の前駆体となる C20 脂肪酸が主に小胞体に存在し、COX により効率的に PG に変換されたことを示唆する。一方、PG 以外にもオキシリピンが検出された。これらのオキシリピンがアラキドン酸やエイコサペンタエン酸を前駆体としていることから、PG 合成及び他のオキシリピン合成が競合している可能性があることが示唆された。

1) V. Di Dato, R. Barbarinaldi, A. Amato, F. Di Costanzo, C. Fontanarosa, A. Perna, A. Amoresano, F. Esposito, A. Cutignano, A. Ianora, & G. Romano, *Sci Rep*, 10(1) (2020)
2) V. Di Dato, I. Orefice, A. Amato, C. Fontanarosa, A. Amoresano, A. Cutignano, A. Ianora, & G. Romano, *ISME J*, 11(7), 1722-1726 (2017)

シナプスレベルでの光制御を目指した AMPA 型グルタミン酸受容体 covalent inhibitor の開発

○柴田晃大[1]・曽我恭平[1]・浜地格[2]・清中茂樹[1]([1]名大院工、[2]京大院工)

AMPA-type glutamate receptor covalent inhibitor for light control at the synaptic level (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University [2]) SHIBATA, Akihiro[1]; SOGA, Kyohei[1]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

脳は約一千億個もの神経細胞によって構成されており、神経細胞同士が受容体を介して複雑なネットワークを構築することで高次脳機能を発現している。ポストシナプスに発現するグルタミン酸受容体は中枢神経系で主要な興奮性の神経伝達物質受容体であり、特に AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPAR)は記憶や学習に関与することが知られている。AMPAR は記憶に際してシナプスのスパイン上での動態がダイナミックに制御されており、活性化に伴い AMPAR の数が増加することで引き起こされる長期増強(LTP)は記憶・学習の基盤となることが知られている。LTP を始めとした AMPAR の挙動は数 μm の範囲に複数存在するスパインごとに制御されているため、局所選択的な AMPAR の活性制御法が求められている。

当研究室では、これまでに AMPAR のアンタゴニストをベースとし、光照射前はアンタゴニストとして機能し、光照射によって親和性が低下する光分解性アンタゴニスト pdNIQX(photo-decomposable *o*-nitrobenzyl quinoxaline dione)を設計した。先行研究では、pdNIQX を用いて光照射部位選択的な AMPAR の活性制御に成功している。本研究では、よりシャープな活性制御を目指し、covalent に AMPAR を阻害する系へと展開した。そこで、Ligand-directed acyl imidazole(LDAI)化学[1)]に着目し、光照射により親和性が低下するアンタゴニスト pdNIQX と acyl imidazole を併せ持つ covalent inhibitor として cpNIQX(covalently inhibitable and photo-releasable *o*-nitrobenzyl quinoxaline dione)を設計し、AMPAR を活性制御することを試みた。AMPAR に cpNIQX を処置すると AMPAR がリガンドを認識し、AMPAR 上の求核性アミノ酸が acyl imidazole を攻撃することで AMPAR に ligand を共有結合的に標識することができる。この状態でグルタミン酸を加えてもエントロピー的に不利なためリガンドとグルタミン酸との交換は起こらない。一方で、光を照射すると共有結合が切れ、親和性が低下したリガンドがグルタミン酸と交換され AMPAR が活性化する。

本研究では、cpNIQX を用いて AMPAR の covalent な阻害に成功したことを報告する。光で共有結合を切断することで、AMPAR の活性が回復することが期待される。

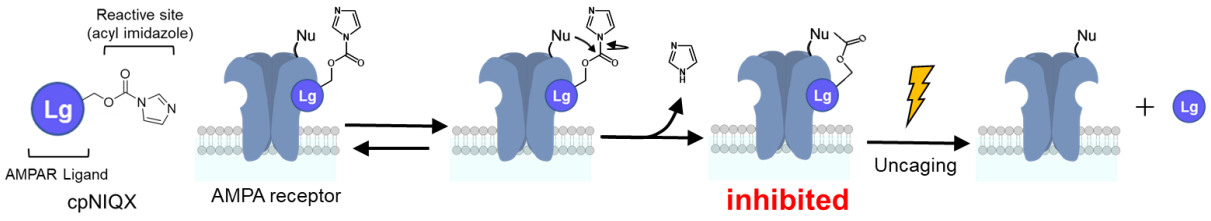


Fig. 1 Inhibition of AMPA receptors using cpNIQX

1) Fujishima, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **134,** 3961-3964 (2012).

Poster Short Talk

Sun. Sep 11, 2022 11:50 AM - 12:20 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 2:50 AM - 3:20 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Short talks free discussions (P60-P79)

11:50 AM - 12:20 PM JST | 2:50 AM - 3:20 AM UTC

Short talks free discussions

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 1:20 PM - 2:20 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Masayasu Taki (Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[2A-07] Development of hyperpolarized MRI molecular probes for detecting aminopeptidase activities based on enzymatic reaction kinetics

*Yutaro Saito[1], Hiroyuki Yatabe[1], Iori Tamura[1], Yohei Kondo[1], Ryo Ishida[2], Tomohiro Seki[2], Keita Hiraga[1], Akihiro Eguchi[1], Yoichi Takakusagi[3], Keisuke Saito[1], Nobu Oshima[2], Hiroshi Ishikita[1], Kazutoshi Yamamoto[2], Murali C. Krishna[2], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. National Institute of Health, 3. National Institute for Quantum Science and Technology)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[2A-08] Biosensing of Immune-Related Protein using Glycopolymer-brush

*Yuhei Terada[1], Hyota Takamatsu[2], Masato Saito[3,4], Eiichi Tamiya[4,5] (1. Environmental Management Research Institute, AIST, 2. Graduate School of Medicine, Osaka University, 3. Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University, 4. Advanced Photonics and Biosensing Open Innovation Laboratory, AIST, 5. The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[2A-09] Functional Thin Layer Chromatography for the Metabolites Imaging in Frozen Tissue Slice

*Tatsuya Nishihara[1], Koki Nishida[1], Rika Tsukame[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Aoyama Gakuin University)

酵素反応速度論に立脚したアミノペプチダーゼ活性検出超偏極 MRI 分子プローブの開発

○齋藤雄太朗[1]・谷田部浩行[1]・田村伊織[1]・近藤洋平[1]・石田諒[2]・関智宏[2]・平賀啓太[1]・江口晃弘[1]・高草木洋一[3]・斉藤圭亮[1]・大嶋野歩[2]・石北央[1]・山本和俊[2]・Murali C. Krishna[2]・山東信介[1]（[1]東大院工、[2]米国 NIH、[3]QST）

Development of hyperpolarized MRI molecular probes for detecting aminopeptidase activities based on enzymatic reaction kinetics (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], National Institute of Health[2], National Institute for Quantum Science and Technology[3]) SAITO, Yutaro[1]; YATABE, Hiroyuki[1], TAMURA, Iori[1], KONDO, Yohei[1], ISHIDA, Ryo[2], SEKI, Tomohiro[2], HIRAGA, Keita[1], EGUCHI, Akihiro[1], TAKAKUSAGI, Yoichi[3], SAITO, Keisuke[1], OSHIMA, Nobu[2], ISHIKITA, Hiroshi[1], YAMAMOTO, Kazutoshi[2], KRISHNA, C. Murali[2], SANDO, Shinsuke[1]

核磁気共鳴イメージング（MRI）は非侵襲的に生体深部をリアルタイムで観測・可視化できるため、in vivo 分子イメージングや画像診断法として優れている。しかし、その感度が極めて低いことから MRI の応用は大きく制限されてきた。この MRI 感度を劇的に向上させる手法として、超偏極技術が注目されている。超偏極技術の中で最も生体分子イメージングへの応用が進んでいるのは、動的核偏極法（DNP）であり、これを用いたイメージング（DNP-MRI）は次世代のイメージング技術や診断法として期待されている。例えば、^{13}C-ピルビン酸を分子プローブとして用いる解糖系代謝イメージングが広く行われており、各種がんの診断法として米国で臨床試験が進められている [1]。一方、^{13}C-ピルビン酸のように生体応用可能な DNP-MRI 分子プローブは少なく、その開発が DNP-MRI の応用を広げる上で大きな課題となっている。これまでの分子プローブ開発における一般的な戦略は、天然分子を ^{13}C や ^{15}N で標識することである。この方法では、内在性分子そのものの代謝や動態を追跡できるが、化学構造があらかじめ固定されているため、観測標的に限りがある。これを打破するために、人工的に分子を設計し、プローブを開発する戦略が有力であるが、DNP-MRI 分子プローブの設計指針は乏しく、生体応用可能な分子プローブ開発は極めて困難である。この問題を解決するには、DNP-MRI 分子プローブが生体内で機能するために必要な条件を炙り出し、精密な分子設計によって、それらの条件を満たしていく必要がある。

本研究では、DNP-MRI 分子プローブが生体内で機能する条件を分子構造と照らし合わせて精査し、精密な分子設計を行うことで、生体内で機能する DNP-MRI 分子プローブの開発に成功した。これまでの DNP-MRI 分子プローブの設計では、超偏極状態を維持できる時間（超偏極寿命）が重視されてきたが、生体内で機能する条件を精査していく中で、超偏極寿命が長いだけでは生体内で機能する DNP-MRI 分子プローブを開発することができないことが浮き彫りになった。そこで、「長い超偏極寿命」に加えて「素早い酵素反応」という新たな条件を加え、酵素反応速度論に立脚した分子設計を行い、生体内で機能する DNP-MRI 分子プローブの開発に成功した [2]。

本発表では、超偏極 MRI 分子プローブ Ala-[1-^{13}C]Gly-d_2-NMe_2 の開発戦略と本プローブを用いた腫瘍内アミノペプチダーゼ N 活性の検出や阻害剤による阻害効果の検証について報告する。さらに、ケミカルシフトイメージングによる腫瘍内の不均一な酵素活性分布の可視化や他のアミノペプチダーゼ標的への展開についても述べる。

Reference
[1]Nelson, S. J. *et al*. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *198*, 198ra108.
[2]Saito, Y *et al*. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabj2667.

糖鎖高分子ブラシによる免疫関連タンパク質のバイオセンシング

○寺田侑平[1]・高松漂太[2]・齋藤真人[3,4]・民谷栄一[4,5]（[1]産総研・環境創生、[2]阪大院医、[3]阪大 OTRI フォトニクス生命、[4]産総研・PhotoBIO-OIL、[5]阪大産研）

Biosensing of Immune-Related Protein using Glycopolymer-brush (Environmental Management Research Institute, AIST[1], Graduate School of Medicine, Osaka University [2], Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University [3], Advanced Photonics and Biosensing Open Innovation Laboratory, AIST [4], The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University [5]) TERADA, Yuhei[1]; TAKAMATSU, Hyota[2]; SAITO, Masato[3,4]; TAMIYA, Eiichi[4,5]

バイオセンサーは標的の生体分子を捕捉する分子認識素子及び標的捕捉を信号に変換する検出部位から構成される。従来、分子認識素子には抗体が用いられてきたが、材料としての不安定性、及び表面修飾に多段階操作または複雑な操作を必要とすることがセンサー開発及び改良の足枷となっている。本研究では、分子認識素子に「糖鎖高分子」を用いた。糖鎖はタンパク質及び核酸に次ぐ第三の生命鎖として着目されており、細胞表面でタンパク質を得意的に認識することが知られている。その糖鎖をペンダントのように高分子の側鎖にぶら下げた人工材料が糖鎖高分子であり、高分子合成技術の発展に伴い多様なデザインが可能となったことから次世代の分子認識素子として有望である。本研究では、標的タンパク質として免疫応答に関連が深い細胞分泌物のサイトカインを検出する。これまでに糖鎖高分子を用いたサイトカイン検出の前例はなく、本調査は糖鎖高分子の未知なタンパク質への対応力を明らかにする先駆的な研究であり、レクチンアレイや天然の糖鎖を用いた研究とは大きく異なる。

バイオセンシングの検出部位には、金属ナノ構造の表面における屈折率変化から生体分子間相互作用を検出する局在型表面プラズモン共鳴(LSPR)を用いた。糖鎖高分子の合成には可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合という高分子長さを制御可能な手法を採用した。RAFT 重合によって合成された高分子は還元操作により末端にチオール基を形成させることができ、金表面への結合能を付与することが可能である。樹脂フィルム上にナノインプリント及び金スパッタを施すことで金ナノピラー構造を持つ LSPR センサーチップを作製し、長さの異なる糖鎖高分子をそれぞれ溶解させた水溶液を加えることで膜厚が制御された糖鎖高分子ブラシ固定化バイオセンサーを作製した。

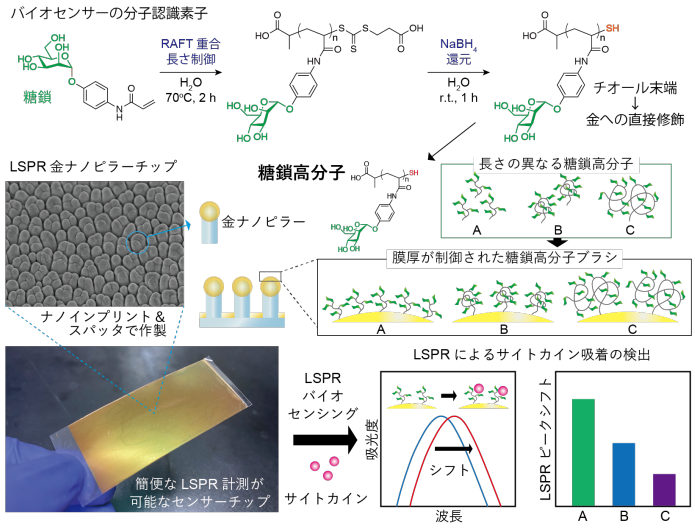


Fig 1. 糖鎖高分子を分子認識素子とした LSPR バイオセンシング概要図

糖鎖高分子ブラシが修飾されたセンサーチップがセットされた流路にサイトカイン溶液を送液した際に生じる吸収スペクトルの LSPR に起因するピークシフト量を測定し、サイトカイン吸着について評価した。糖鎖高分子設計の違いによって、金表面に形成したそれぞれの糖鎖高分子ブラシに対するサイトカイン吸着時の LSPR ピークシフト量、及び糖鎖高分子-サイトカイン結合の結合定数に有意な差が得られ、糖鎖高分子を分子認識素子としたサイトカイン検出が達成された。本研究で得た成果は、未知なタンパク質に対する糖鎖高分子の対応力を示すと共に、高感度なバイオセンサー開発に向けた糖鎖高分子ブラシ膜の設計指針を明らかにした。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

組織内に含まれる代謝物分布を可視化する機能性 TLC の開発

○西原達哉・西田光輝・塚目莉加・田邉一仁（青学大院理工）

Functional Thin Layer Chromatography for the Metabolites Imaging in Frozen Tissue Slice (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) NISHIHARA, Tatsuya; NISHIDA, Koki; TSUKAME, Rika; TANABE, Kazuhito

生物個体は、様々な組織から構成され、各組織が有機的に機能することにより、生命機能を発現している。これら組織は、様々な種類の細胞が必要な場所に適切に配置されることで、領域ごとに目的の機能を発現している。こうした機能の違いは、各領域内に含まれる生体分子の種類、量と強く相関する。そのため、組織内の空間情報と紐づけた上での生体分子解析は、非常に重要な解析に位置づけられる。

現在、固定化組織切片を用いることで、免疫染色や ISH、空間トランスクプリトーム解析など、生体高分子を中心に空間情報と紐付けた解析が実現している。しかしながら、代謝物のような小分子を対象とする場合、固定化処理の過程で分子拡散は避けられず、代謝物解析を固定化組織切片に適用することは原理上難しい。そのため、代謝物解析は、主に凍結組織切片に対してイメージング MS を適用することで行われている。しかしながら、イメージング MS は、定量性が乏しいことに加え、解析時間に膨大な時間を必要とするなど、様々課題を抱えているのが現状である。

以上を踏まえ、本研究では、組織内代謝物イメージングを可能にする新たな方法論の構築し、前述した課題の克服を目指した。具体的には、標的分子と特異的に反応する蛍光分子プローブを薄層クロマトグラフィー (TLC) に塗布した機能化 TLC を用いた方法論となる。本方法論の概略を以下に示す。機能化 TLC に対して、凍結組織切片をスタンプし、TLC 上で蛍光プローブと標的分子を反応させる。この際、蛍光プローブと生成物の極性を大きく切り替わるように分子設計を行う。これにより、TLC で展開することで、未反応分子を除去可能となり、得られる生成物由来の蛍光発光を選択的な検出が実現する。以上により、標的代謝物の位置、及び量の解析を行う。

今回は、グルタチオン (GSH) を標的分子とし、本方法論の実現可能性を検証した。GSH は酸化還元を担う主要な分子種であり、近年の研究において種々の疾病との関連が示唆されている。GSH イメージング用の機能性 TLC の作成にあたり、GSH と選択的に反応する蛍光プローブを設計、合成した。本プローブは、チオール基と選択的に反応するマレイミド基、及び蛍光色素 (1-ピレンメチルアミン、PMA) を、光解離性リンカー (o-ニトロベンジル) を介して導入した分子となる。実際に、本分子プローブを塗布した機能化 TLC を用いて、マウス肝臓内の GSH 分布解析を行った。機能化 TLC に対して凍結肝臓組織切片をスタンプし、評価を行った結果、肝臓由来の GSH と反応し、青色蛍光発光が検出されることが確かめられた。本発表では、GSH イメージングの詳細、及びその他代謝物への展開について報告する。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 2:30 PM - 3:30 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 5:30 AM - 6:30 AM UTC | Venue A Noyori Conference Hall

Analysis, Measurement, Sensor devices

Chair: Chikashi Nakamura (Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, AIST)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[2A-10] Effect of pore wall modification on Pt-porphyrin/mesoporous silica nanoparticle composites for oxygen concentration imaging.

*Shunsuke Odai[1], Arisa Yamauchi[1], Hidehiro Ito[1], Masaki Okamoto[2], Toshiaki Kamachi[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Faculty of Letters, Keio University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[2A-11] Development of fluorescent molecular probes for rapid live-cell imaging in plants

*Shuhei Kusano[1], Sakuya Nakamura[1], Izumi Masanori[1], Hagihara Shinya[1] (1. RIKEN CSRS)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[2A-12] Highly sensitive biosensor using electrochemical activity of gold nanoparticles

*Shuto Osaki[1,2], Wilfred Espulgar[1], Saito Masato[1,2], Tamiya Eiichi[1,3] (1. Photo-Bio OIL, AIST, 2. Osaka Univ. Eng., 3. Osaka Univ. SANKEN)

白金ポルフィリン修飾メソポーラスシリカナノ粒子への細孔内壁修飾と細胞内酸素濃度イメージングへの応用

○尾台俊亮[1]・山内杏里彩[1]・伊藤栄紘[1]・岡本昌樹[2]・蒲池利章[1]（[1]東工大生命理工、[2]慶應大文）

Effect of pore-wall modification on Pt-porphyrin/mesoporous silica nanoparticle composites for oxygen concentration imaging. (Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology [1], Faculty of Letters, Keio University [2]) ODAI, Shunsuke[1]; YAMAUCHI, Arisa[1]; ITO, Hidehiro[1]; OKAMOTO, Masaki[2]; KAMACHI, Toshiaki[1]

好気性生物において酸素は、電子伝達系やシグナル伝達といった重要な生体内反応に利用されている。また、酸素は癌をはじめとする様々な病態などにも関係していることから、その分布や動態を観測するための手法が研究・開発されている。リン光性色素を利用した酸素濃度測定法は、電極を用いた測定法などと比べると、生体に対する侵襲性が低く、生細胞の酸素分布や動態を測定できる点で優れた測定法である。一方、細胞内という複雑な環境下では高精度な酸素濃度定量が困難である、生成した一重項酸素が生体反応に影響する可能性があるなどいくつかの課題も残されている。これまでに当研究室では、リン光寿命測定と共焦点顕微鏡を組み合わせることで、高解像度な細胞内酸素濃度イメージングシステムを開発した [1)]。また、メソポーラスシリカナノ粒子（MSN）を利用した酸素プローブ、PtP@MSN、を開発し、生体成分存在下での分光学特性変化の抑制および一重項酸素による生体応答変化の軽減を達成した [2)]。しかし、PtP@MSN には細胞内から得られるリン光強度が低く、酸素濃度測定には強い励起光・長時間の測定が必要であるという課題があった。

本研究では、PtP@MSN の発光強度の改善のために、ポルフィリンの会合体形成によるリン光消光を抑制することを目指し、細孔内に白金ポルフィリンとアルキル鎖を修飾したメソポーラスシリカナノ粒子を新たに開発した（Figure 1）。このプローブは設計通り溶液中・細胞内でリン光強度が向上し（Figure 2）、そのスペクトルの変化から、会合体の形成が低減したことが示唆された。また、血清存在下での分光測定や酸素応答性評価実験から、修飾したアルキル鎖は、生体成分の細孔内への侵入を抑制する一方で、酸素拡散には影響しないことが分かった。以上のことから、細孔内へのアルキル鎖修飾は PtP@MSN の酸素プローブとしての機能向上のために有効な手段であることが分かった。

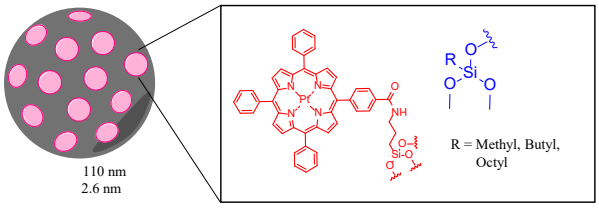


Figure 1 Schematic of alkyl modified PtP@MSN.

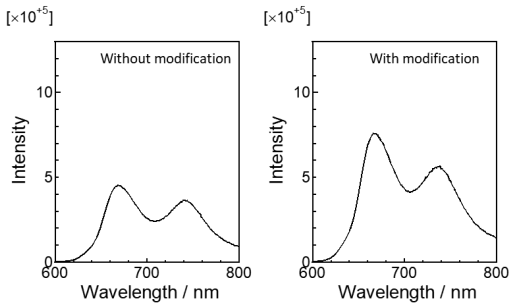


Figure 2 Phosphorescence spectra of PtP@MSNs (0.1 mg/mL suspension) with or without alkyl modification

1) Kurokawa, H; Ito, H; Inoue, M; Tabata, K; Sato, Y; Yamagata, K; Kizaka-Kondoh, S; Kadonosono, T; Yano, S; Inoue, M; Kamachi, T, *Scientific Reports*, **2015**, *5*:10657
2) *第13回バイオ関連化学シンポジウムにて発表*

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

植物の迅速ライブイメージングを可能にする蛍光プローブ

○草野修平・中村咲耶・泉正範・萩原伸也（理化学研究所 環境資源科学研究センター）

Development of fluorescent molecular probes for rapid live-cell imaging in plants (RIKEN Center for Sustainable Resource Science) KUSANO, Shuhei; NAKAMURA, Sakuya; IZUMI Masanori; HAGIHARA, Shinya

蛍光タンパク質を基盤とするライブイメージングは，植物科学の分野においても強力な研究ツールである．しかし，植物で蛍光タンパク質を発現させるためには，数ヶ月にも及ぶ形質転換が必須であり，この点は研究上の時間的律速になるケースもある．加えて，形質転換技術が確立されていない植物種には応用できないという欠点もある．蛍光タンパク質に代わるイメージングツールとしては，低分子蛍光プローブが有望視されるが，植物個体レベルで機能する蛍光プローブは限定的である．本研究では，植物科学における蛍光プローブのツールボックスを拡充することを目的として，各種生体膜および細胞内小器官を迅速に可視化する蛍光プローブの開発に取り組んだ.[1)]

まず，プログラム細胞死やオートファジーなど様々な生命現象に関わる液胞膜に着目し，その蛍光プローブの開発から着手した．液胞内の pH が 5~6 であることを考慮し，pH 応答性の官能基(N-methyl piperazine)を，環境応答性の蛍光色素である 1,8-ナフタルイミド上に導入したプローブ A を設計・合成した．シロイヌナズナの本葉にプローブ A を処理したのち，葉肉細胞の共焦点顕微鏡図を取得した．その結果，プローブの処理から僅か 5 分ほどで，液胞膜が染色されることを確認した(Fig. A). またプローブ A は, 根の細胞の液胞膜も同様に染色できることも明らかにした．植物の蛍光イメージングにおける 1,8-ナフタルイミド色素の有用性が確認できたことから，その機能拡張を狙い，色素上の置換基の改変による染色可能な細胞組織の多様化を検討した．*n*-ヘキシルアミド基を置換したプローブ B は液胞内腔を染色でき，他方，pH 応答性を欠失させたプローブ C は，葉緑体包膜を優先して染色することを明らかにした(Fig. B and C)．本発表では，これらの結果の詳細に加えて，植物内の生体分子を特異的かつ迅速に染色できる蛍光プローブに関する最新の成果も交えて報告する．

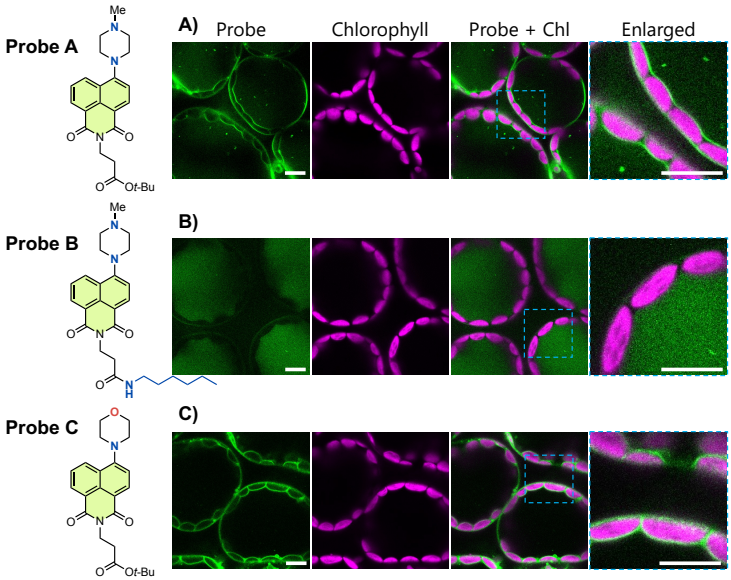


Fig. Confocal images of mesophyll cells stained with **Probe A-C** in wild-type plants. Green, probe fluorescence; magenta, chlorophyll autofluorescence (Chl). Scale Bars = 10 μm.

1) S. Kusano, S. Nakamura, M. Izumi, S. Hagihara, *Chem. Cmmun*., **2022**, *58*, 1685-1688, ***Selected as an outside back cover***.

金ナノ粒子の電気化学活性を利用するバイオセンサの高感度化

○大崎 脩仁[1,2]、Wilfred Espulgar[1]、齋藤 真人[2]、民谷 栄一[1,3]
(産総研先端フォトバイオ[1]、阪大院工[2]、阪大産研[3])

Highly sensitive biosensor using electrochemical activity of gold nanoparticles (Photo-Bio OIL, AIST,[1] Osaka Univ. Eng.[2], Osaka Univ. SANKEN[3]) Shuto Osaki,[1,2], Wilfred Espulgar[1], Masato Saito [2], and Eiichi Tamiya,[1,3]

１．目的

近年、新型コロナウイルスの水際対策や予防医療を目的として、診断基準となるバイオマーカーやウイルスを迅速かつ簡便に検出できるバイオセンサに注目が集まっている。特に、電気化学測定を利用するバイオセンサは測定の迅速さと感度の両立が可能である。一方で電気化学測定では電極の表面状態が電気化学特性に与える影響が大きく、抗体や酵素といった分子認識素子は電子移動速度の低下を招き感度の低下をもたらす。本研究では電気化学測定の感度に対して抗体が与える影響を定量化することで、バイオセンサの最適化と原理解明を目指した。ここでは我々が独自に開発した Gold-Linked Electrochemical Immuno Assay (GLEIA)に着目した。本法は印刷電極上に固定した 1 次抗体と 2 次抗体修飾金ナノ粒子でイムノアッセイを行い、金ナノ粒子の酸化還元反応から抗原を定量することを原理としている。そこで抗体修飾電極と非修飾電極における金ナノ粒子の検出感度を比較することで表面修飾の影響を明らかにした。

２．実験

電気化学測定では作用極、対極、Ag/AgCl 参照電極が一体となった印刷電極(DEN-EP-PP, Biodevice technology, Japan)と小型ポテンショスタット(MiniSTAT100, Biodevice technology, Japan)を用いた。直径 60 nm、粒子数 2.6×10^{10} particles/mL の金ナノ粒子(BBI solutions, UK)を作用極上に 2 µL 滴下、自然乾燥することで電極に物理吸着し、2 mol/L(M), KCl 溶液中で 1200 mV, 40 s の事前酸化を行ってから Differential pulse voltammetry (DPV)による電気化学測定を行った。金ナノ粒子を利用するイムノアッセイは既報[1]と同じ条件を用いた。

３．結果および考察

Figure(a, b, c)は GLEIA 法により immunoglobulin A (IgA)を測定したときの Differential pulse voltammogram である。図中の(a, b, c)は DPV におけるパルス電位の設定値を示す。パルス電位を増加させることで、同濃度の IgA 抗原から得られる電流値が増加することが分かった。またこの時パルス電位を 150 mV に設定することで検出限界(LOD)として 9.3 pmo/L(M)を得た。これはパルス電位 50 mV の時に得られた LOD である 14.4 pM と比べて高感度を示すもので、電気化学測定条件の最適化による感度向上を確認した。一方でイムノアッセイを伴わず金ナノ粒子のみを測定した場合、最も感度のよかったパルス電位 100 mV において LOD として 5.0 fM となった。また電極に抗体を修飾した場合 LOD は 0.1 pM となった。各条件における LOD を比較すると、未修飾の印刷電極と比べて抗体修飾電極では 10 倍程度、バイオセンサでは 1000 倍の感度低下が見られた。この感度低下は抗原抗体反応の反応効率が原因であると推察されイムノアッセイが持つ原理的限界を示唆したと考える。す影響が明らかとなった。結果として最適なパルス電位を用いることで感度が向上し、また抗体修飾や抗体の活性がバイオセンサの感度に与える影響が定量化できた。

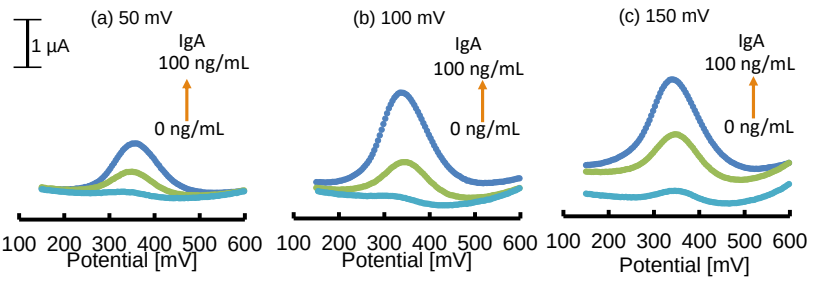


Figure: 各パルス電位におけるバイオセンサの differential pulse voltammograms (a) 50 mV, (b) 100 mV, (c) 150 mV

(1)S. Osaki, et al., *Appl. Biochem. Biotech.*, **193**, 1311–1320 (2021)

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 8:30 AM - 9:30 AM JST | Sat. Sep 10, 2022 11:30 PM - 12:30 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Nobutaka Fujieda (Osaka Metropolitan University)

8:30 AM - 8:50 AM JST | 11:30 PM - 11:50 PM UTC

[2B-01] Intra Q-body: an antibody-based fluorogenic probe for intracellular proteins that allows live cell imaging and sorting

*Hiroshi Ueda[1], Yancen Dai[2], Yuko Sato[1], Bo Zhu[1], Tetsuya Kitaguchi[1], Hiroshi Kimura[1], Farid J. Ghadessy[3] (1. Institute of Innovative Research, Tokyo Tech, 2. Graduate School of Life Science and Technology, 3. A*STAR, Singapore)

8:50 AM - 9:10 AM JST | 11:50 PM - 12:10 AM UTC

[2B-02] Construction and structural characterization of a dimer of ferredoxin from *Thermotoga maritima*

*Monami Tanaka[1], Nur Afiqah binti Azmi[1], Tsuyoshi Mashima[1], Hideaki Ogata[2], Masaru Yamanaka[1], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, University of Hyogo)

9:10 AM - 9:30 AM JST | 12:10 AM - 12:30 AM UTC

[2B-03] Catalytic C–H bond amination by hemoproteins containing iron porphycene as a cofactor

*Yoshiyuki Kagawa[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

生細胞内タンパク質の動態観察とそれによる細胞分別が可能な蛍光抗体プローブ Intra Q-body の構築

○上田 宏[1]・Dai, Yancen[2]・佐藤優子[1]・朱 博[1]・北口哲也[1]・木村 宏[1]・Ghadessy, Farid J.[3]（[1]東工大研究院，[2]東工大生命理工，[3]シンガポール科学技術研究庁）

Intra Q-body: an antibody-based fluorogenic probe for intracellular proteins that allows live cell imaging and sorting ([1]Institute of Innovative Research and [2]Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Tech, [3]A*STAR, Singapore) UEDA, Hiroshi[1]; DAI, Yancen[2]; SATO, Yuko[1]; ZHU, Bo[1]; KITAGUHI, Tetsuya[1]; KIMURA, Hiroshi[1]; GHADESSY, Farid J.[3]

従来，細胞表面抗原については蛍光標識抗体を用いた細胞イメージングとソーティングが可能であったが，細胞内の抗原検出においては細胞を固定化しない限り，その局在と量を定量的にイメージングすることは不可能であった。本発表では，がん抑制遺伝子産物 p53 に対する単クローン抗体 DO-1 を用いて抗原結合に応答して蛍光を発する Fab 型クエンチボディ（Q-body）プローブを構築することで，生細胞内の p53 を時空間的に可視化できたことを報告する [1]。

p53 は多くの癌組織においてその変異体が過剰発現しており，ガン診断における有効なマーカーとなっている。そこでこれまで大腸菌での分泌発現が困難だった DO-1 抗体可変領域にランダムにコンセンサス残基を導入し，ファージ提示法により高発現クローン C11 を取得した。Fab 型 C11 の N 末端に Sortase を用いたペプチドライゲーションにより 2 個の TAMRA を導入した Q-body は，試験管内で p53 濃度依存的な最大 27 倍の蛍光増強を示し，その検出限界は 0.72 nM であった。次にこれを p53 をノックアウトしたヒト大腸がん細胞 HCT116 と通常の HCT116 に電気穿孔法で導入した所，核内の TAMRA 蛍光強度に 8 倍以上の差が見られた。また，通常の HCT116 に Q-body を導入した後，抗がん剤 nutlin-3 と cisplatin で処理して p53 の発現量を変化させた所，その時間変化をリアルタイムで追跡できた。

さらに，将来の細胞治療への応用の可能性を考え生細胞内 p53 発現量に基づくライブセルソーティングを試みた所，p53 発現細胞を効率的に濃縮することに成功した。以上より，細胞内タンパク質のライブセルイメージングにおける Q-body プローブの有用性が証明され，転写因子など細胞内ターゲットの発現に基づくライブセルソーティングへの道が開けたと考えられる。

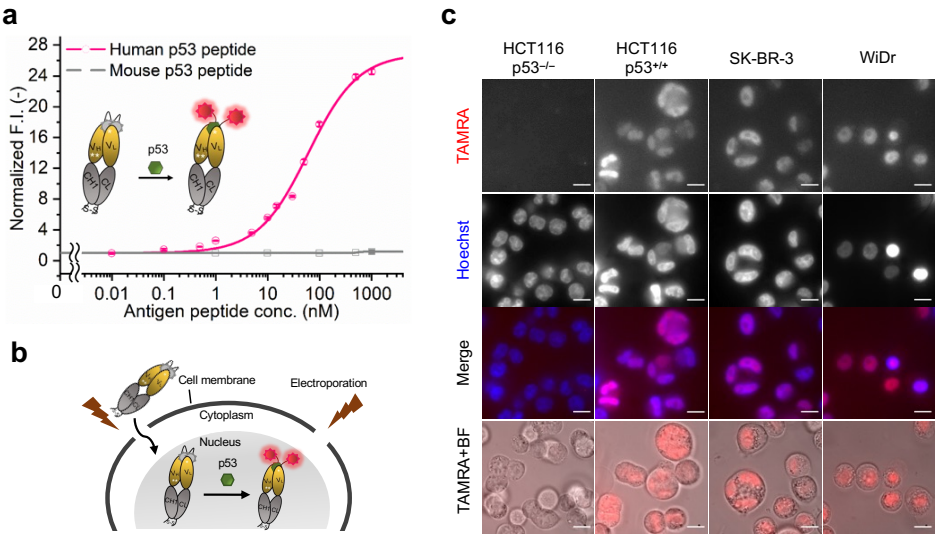


Fig. 1. (a) p53 dose-response of C11 Fab Q-body in vitro. (b) Scheme of the live cell assay. (c) Live-cell imaging of p53 (TAMRA), nucleus (Hoechst), their merge and p53 merged with DIC pictures.

1) Y. Dai, Y. Sato, B. Zhu, T. Kitaguchi, H. Kimura, F.J. Ghadessy, H. Ueda., *Chem. Sci.*, **in press** (2022)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

フェレドキシン 2 量体の構築とその構造の解明

○田中萌奈実[1]・Nur Afiqah binti Azmi[1]・真島剛史[1]・緒方英明[2]・山中優[1]・廣田俊[1]（[1]奈良先端大先端科技・[2]兵庫県大院理）

Construction and structural characterization of a dimer of ferredoxin from *Thermotoga maritima*

(Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology[1], Graduate School of Science, University of Hyogo[2]) TANAKA, Monami; NUR AFIQAH BINTI AZMI; MASHIMA, Tsuyoshi; OGATA, Hideaki; YAMANAKA, Masaru; HIROTA, Shun

天然に広く存在するフェレドキシンは、鉄硫黄クラスターを持ち、電子伝達体として機能するタンパク質である。一方、パースルフィド(RS-S-)は生体内においてタンパク質の活性制御やシグナル伝達等に関わっていることが報告され、新たな生理活性物質として注目を集めている。本研究では、 [4Fe4S] クラスターを有し、60 残基で構成される *Thermotoga maritima* 由来の小さなフェレドキシンを用いた。高 pH 下で[4Fe4S] クラスターに結合しているシステイン(Cys13) が Fe から解離し、分子間でトリスルフィド結合を形成してフェレドキシン 2 量体となることを見出した。さらに、2 量化反応条件を最適化し、結晶構造解析により 2 量体構造を解明した。

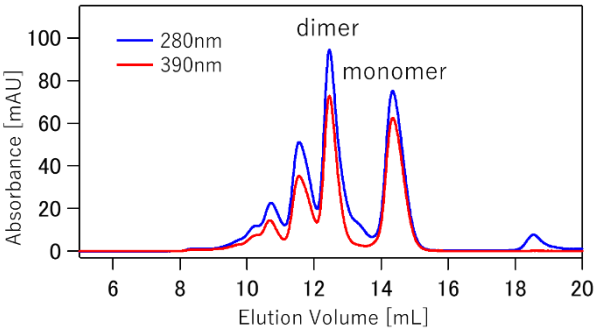


Figure 1. SEC chromatogram of ferredoxin after incubation at pH 10.0 in the presence of 250 mM GuHCl at 25 °C for 3 days.

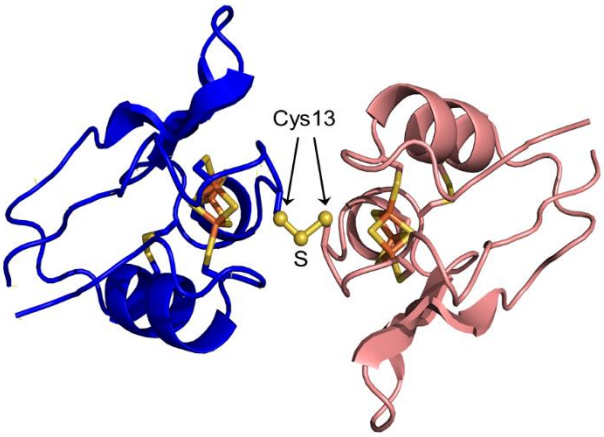


Figure 2. Crystal structure of trisulfide-linked ferredoxin dimer. Sulfur atoms of the trisulfide bond are shown in spheres.

フェレドキシンは大腸菌を用いて異種発現し、イオン交換カラム及びサイズ排除カラム(SEC)を用いて精製した。精製したフェレドキシンの 2 量化条件を検討した。濃度、pH、温度、反応時間の影響を調べた結果、0.9 mM, pH 10.0, 25°C, 3 日間静置の条件において、効率的に多量化が進行した。また、適量のグアニジン塩酸塩 (GuHCl, 250 mM) を添加することで 2 量体の生成量が増大した (Fig. 1)。得られたフェレドキシン 2 量体は 70 °C で 30 分静置しても解離せず、高い熱安定性を示した。2 量体を結晶化し、X 線結晶構造解析を行ったところ、分解能 1.45 Å の回折像が得られ、単量体での[4Fe4S]鉄硫黄クラスターは[3Fe4S]に変化し、鉄原子に配位していた 2 分子の Cys13 と 1 つの硫黄原子でトリスルフィド結合を形成した 2 量体構造が得られた(Fig. 2)。新たに形成されたトリスルフィド結合の S(Cys)-S-S(Cys)結合角度は 102°であり、報告されているジメチルトリスルフィドのトリスルフィド結合の結合角度(104°)と同様の角度を示した。また、LC-QTOF-MS を用いて、溶液中においてもトリスルフィド架橋フェレドキシン 2 量体が存在していることを確認した。本構造はポリスルフィド構造によるタンパク質間架橋構造の珍しい例であり、今後、反応機構の解明に取り組む予定である。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

鉄ポルフィセン錯体を補因子として有するヘムタンパク質を用いたC–H 結合アミノ化反応

○香川佳之・大洞光司・林　高史（阪大院工）

Catalytic C–H bond amination by hemoproteins containing iron porphycene as a cofactor (Graduate School of Engineering, Osaka University) KAGAWA, Yoshiyuki; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

近年、ヘム（鉄ポルフィリン錯体）を有するヘムタンパク質を改変した人工金属酵素が高難度反応を実現する触媒候補として活発に研究されている[1]。我々のグループは酸素結合ヘムタンパク質であるミオグロビン(Mb)に着目し、そのヘムを金属ポルフィセン錯体へと置換した再構成体が、C–H 結合水酸化反応[2]やシクロプロパン化反応[3]に活性を示すことを報告している。本研究では鉄ポルフィセン錯体を有する再構成 Mb が C–H 結合アミノ化反応に活性を示すことを見出した。

まず、最適な補因子を探索するため、マンガン、鉄、コバルトポルフィセン錯体を有する再構成 Mb（rMb-MnPc, rMb-FePc, rMb-CoPc）をそれぞれ調製し、2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホニルアジドの分子内 C–H 結合アミノ化反応を実施した。rMb-FePc において反応が促進され、触媒回転数(TON)は最大で 5.7 x 10^4 に達した。Mb や鉄ポルフィセン錯体(FePc)と比較しても、rMb-FePc は高い活性を示し、副生成物であるスルホンアミドに対し、目的生成物であるスルタムをより選択的に生成することが明らかになった。速度論的評価の結果、rMb-FePc は天然 Mb と比較して約 5 倍の k_{cat}/K_m 値を示した。反応機構に関する知見を得るため、異なる結合解離エネルギー(BDE)を有する 3 種類の基質に対する見かけの反応速度定数(k_{obs})を測定し、k_{obs} 値を反応可能な C–H 結合の数で割った k'_{obs} を算出した。C–H 結合の BDE に対して、k'_{obs} の対数をプロットすると、負の傾きを持つ直線関係が得られ、反応は水素原子引き抜き(HAT)機構により進行していることが示された。次に、2,4,6-トリエチルベンゼンスルホニルアジドを基質とする触媒反応を評価した。本基質に対しても rMb-FePc (TON = 7)が Mb (TON = 2) や FePc (TON = 3)よりも高い活性を示したが、いずれもエナンチオ選択性は示さなかった。そこで 64 番目の遠位ヒスチジンを異なるアミノ酸残基へと置換した複数の変異導入再構成 Mb を調製した。その結果、同反応に対して、H64A 変異体が TON = 25、27%ee のエナンチオ選択性を示し、H64I 変異体が TON = 18、37%ee を示した。現在、他のヘムタンパク質およびその変異体と鉄ポルフィセン錯体とを組み合わせた人工金属酵素についても検討中である。

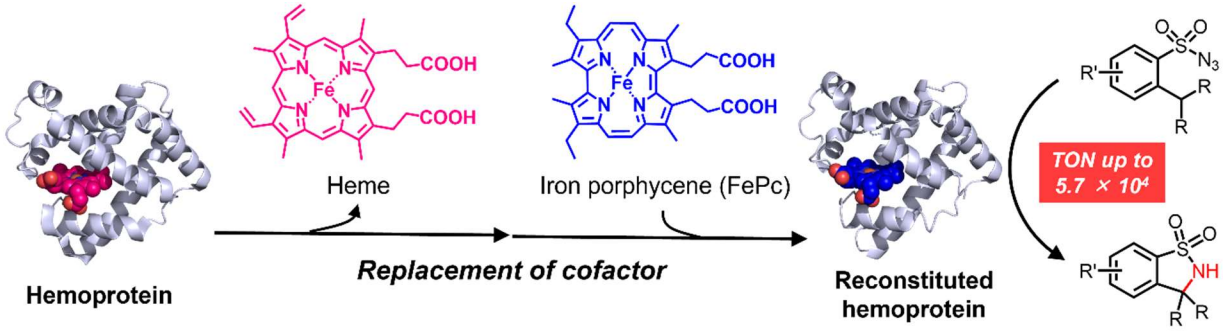


Fig 1. Catalytic intramolecular C–H bond amination by reconstituted hemoprotein with iron porphycene.

1) (a) C. K. Prier, F. H. Arnold, *et al. Nat. Chem.* **2017**, *9*, 629.　(b) H. M. Key, J. F. Hartwig, *et al. Nature* **2016**, *534*, 534.
2) (a) K. Oohora, T. Hayashi, *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17282. (b) K. Oohora, T. Hayashi, *et al. J. Am. Chem. Soc*. **2017**, *139*, 18460.
3) K. Oohora, T. Hayashi, *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17265.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 9:40 AM - 10:40 AM JST | Sun. Sep 11, 2022 12:40 AM - 1:40 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Hiroshi Nonaka (Graduate School of Engineering, Kyoto Univ.)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[2B-04] Single-cell and single-molecule adhesion analysis of a highly sticky bacterium

*Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[2B-05] Laccase-Catalyzed Tyrosine Click and Tyrosinome Analysis

*Shinichi Sato[1,2], Keita Nakane[2], Tatsuya Niwa[3], Hafumi Nishi[4], Shusuke Tomoshige[2], Hideki Taguchi[3], Minoru Ishikawa[2] (1. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences , Tohoku University, 2. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 3. Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 4. Graduate School of Information Sciences, Tohoku University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[2B-06] Development of Protein Labeling Method with Exchangeable Fluorescent Probe

*Masafumi Minoshima[1], Shahi Imam Reja[2], Toshikuni Awazu[3], Toshiyasu Sowa[1], Kohei Iijima[1], Taketoshi Kambara[4], Yasushi Okada[4,5], Kazuya Kikuchi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka University, 3. Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, 4. RIKEN, 5. School of Science, The University of Tokyo)

原子間力顕微鏡を用いた高付着性細菌の１細胞・１分子付着力解析

○吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Single-cell and single-molecule adhesion analysis of a highly sticky bacterium (Graduate School of Engineering, Nagoya University) YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

微生物付着はバイオフィルム形成の第一段階であり、医療や衛生分野においては感染やコンタミネーションの原因となる厄介なものである。一方、排水処理やバイオプロセスにおいては反応効率の向上や分離プロセスの簡便化などを可能とする有益なものである。そのため、微生物の付着メカニズムの理解は様々な領域において重要である。

アシネトバクター属細菌 Tol 5 はプラスチックからガラス、金属など様々な材料表面に対して高い付着性を示す[1]。このユニークな付着性は、Tol 5 が細胞表層に持つ長さ 250 nm のファイバー状タンパク質 AtaA によるものである。*ataA* 遺伝子を他の細菌で発現させることで付着性を付与し担体に固定化できるため、新しい全細胞触媒固定化方法として期待されている[2]。しかしこれまでの Tol 5 の付着性評価は、染色法や顕微鏡観察による付着細胞量の測定に留まっていた。本研究では、原子間力顕微鏡（AFM）を用いた 1 細胞・1 分子付着力解析により、Tol 5 とその付着因子である AtaA の付着力と材料特異性を定量的に評価することを目的とした。

ガラスボトムディッシュに固定化した Tol 5 細胞に、材質の異なる直径 2 m のコロイドが先端についたプローブをリン酸緩衝液中で 1 秒間押しつけ、1 μm/s で引き離す際に細菌細胞-プローブ間に働く力を AFM で測定したところ、様々な材料に対して非特異的に強い付着力を示した。続いて AtaA 一分子の付着力を明らかにするために、アラビノース濃度で *ataA* 遺伝子の発現量を制御可能な Tol 5 由来の変異株を用いて、細胞表層に AtaA をわずかに提示した細胞を調製した。この細胞をガラスボトムディッシュに固定化し、微細な探針を持つプローブをリン酸緩衝液中で 1 秒間押しつけ、1 μm/s で引き離す際に AtaA-プローブ間に働く力を AFM で測定したところ、AtaA 1 分子の長距離にわたる強い接着力の測定に成功した。これらの結果は、Tol 5 とその付着因子である AtaA の付着が材料非特異的であるとともに、その付着にはファイバーの強靭性が重要であることを示している。

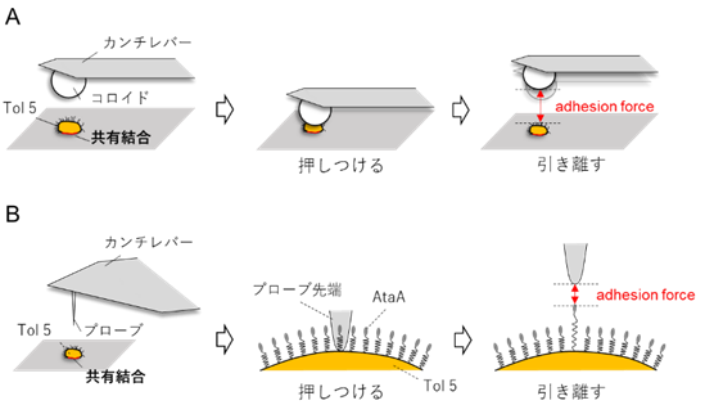


Fig. 1. AFM を用いた 1 細胞・1 分子付着力解析の模式図.

(1) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLOS ONE*, 7: e48830 (2012)
(2) K. Hori, S. Yoshimoto et al., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 133(3): 195-207 (2022)

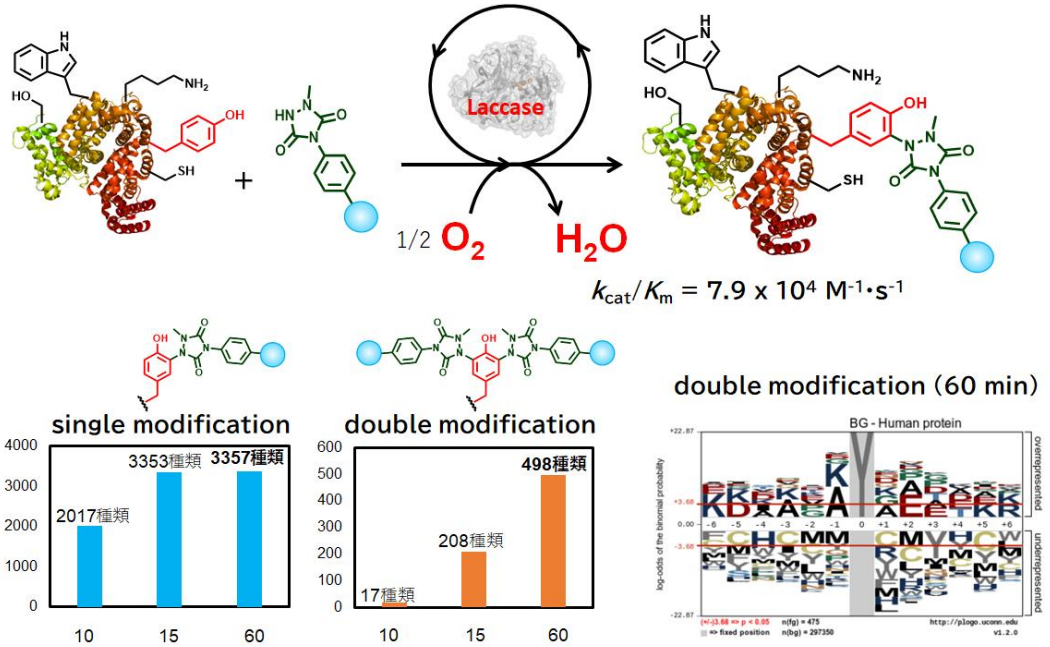
酸化酵素 Laccase を用いたチロシン残基選択的標識法の開発と Tyrosinome 解析への応用

中根啓太[1]・丹羽達也[2]・西羽美[3]・友重秀介[1]・田口英樹[2]・石川稔[1]・○佐藤伸一[1,4]（[1]東北大院生命、[2]東工大細胞制御工学研究センター、[3]東北大院情報・[4]東北大学際研）

Laccase-Catalyzed Tyrosine Click and Tyrosinome Analysis (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University[1]; Cell Biology Center, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology[2] Graduate School of Information Sciences, Tohoku University[3]; Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University[4]) NAKANE, Keita[1]; NIWA, Tatsuya[2]; NISHI, Hafumi[3]; TOMOSHIGE, Shusuke[1]; TAGUCHI, Hideki[2]; ISHIKAWA, Minoru[1]; SATO, Shinichi[1,4]

チロシン残基（Tyr）は、リン酸化によるシグナル伝達に関与し、タンパク質間相互作用、核酸–タンパク質間相互作用界面に多く存在しており、生命現象解明の観点から、Tyr 選択的かつ効率的な化学修飾反応の開発が望まれている。我々は酸素分子を駆動力として、一電子酸化を触媒する酵素 laccase に注目し[1]、今回新たに高効率な Tyr 修飾法を開発した（図上段）。

本反応は、laccase が修飾剤である 1-methyl-4-aryl urazole (MAUra) を選択的に一電子酸化することで、Tyr を高効率に修飾できることを明らかにした（$k_{cat}/K_m = 7.9 \times 10^4\ M^{-1} \cdot s^{-1}$）。Laccase の酸素分子により活性化する特徴から、極めて温和な反応条件で Tyr を選択的に修飾することが可能であった。反応は Tyr のヒドロキシ基オルト位で進行し、露出度の高い Tyr に対しては、1 つの Tyr に最大 2 分子の MAUra が結合することが分かった。さらに、A431 細胞破砕液中に含まれるタンパク質上の Tyr をデスチオビオチン標識、プルダウンし、プロテオミクス解析したところ、3000 種類を超える部位への結合が確認された（図下段）。タンパク質の表面露出度予測と実験結果を照合したところ、露出度の高い Tyr が優先的に標識されることが示唆された。さらに、本手法を基盤とする Tyr のリン酸化状態の解析にも挑戦したので、合わせて本シンポジウムで報告する。



参考文献：[1] Sato S.; Nakane K.; Nakamura H., *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18*, 3664.

入れ替わり可能な蛍光プローブを用いたタンパク質標識法の開発

○蓑島維文[1]・Shahi Imam Reja[2]・粟津利邦[3]・飯嶋康平[1]・岨稔康[1]・神原丈敏[4]・岡田康志[4,5]・菊地和也[1,2]（[1]阪大院工、[2]阪大免フロ、[3]阪大生命機能、[4]理研、[5]東大院理）

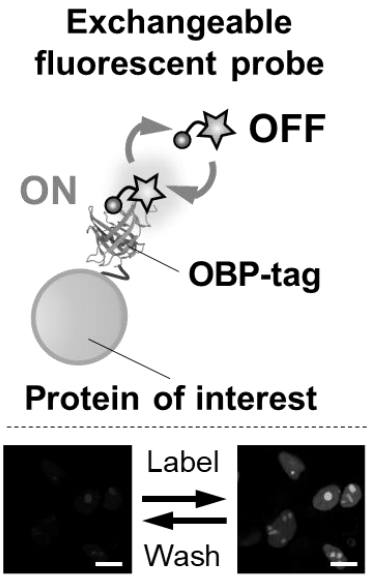
Development of Protein Labeling Method with Exchangeable Fluorescent Probe (Graduate School of Engineering, Osaka University[1], Immunology Frontier Research Center, Osaka University[2], Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University[3], RIKEN[4], School of Science, The University of Tokyo[5])

○MINOSHIMA, Masafumi[1]; REJA, Shahi Imam[2]; AWAZU, Toshikuni[3]; IIJIMA, Kohei[1], SOWA, Toshiyasu[1]; KAMBARA, Taketoshi[4]; OKADA, Yasushi[4,5]

化学的に合成された分子によってタンパク質を蛍光標識する手法は生きた細胞内におけるタンパク質局在をイメージングするための有用なツールである。この手法においては、タンパク質に標識用のタグを融合発現させ、タグに特異的に反応する蛍光プローブによって標識を行う。この手法は汎用的に使われる蛍光タンパク質と比べ、標識タイミングや量をコントロールできる、光安定性の高い有機蛍光色素が使用できるといった利点を有している。このような手法の多くは、タグと共有結合を形成することにより蛍光色素を不可逆に結合・標識する手法を中心に報告されてきた[1]。

一方で、非共有結合性の相互作用によってタグに蛍光プローブを結合させることで、可逆なタンパク質の蛍光標識ができると考えられる。例えば、一度標識したタンパク質から洗浄することで、蛍光プローブを脱標識することが可能である。また、素早く入れ替わることで見かけ上の標識が維持されるため、長時間のイメージングも可能と考えられる。しかしながら、既存の可逆な標識法[2,3]においては、蛍光プローブが素早く入れ替わりにくい、蛍光プローブ自体の光安定性が低いといった課題があった。

そこで本研究では、新たなタグと蛍光プローブによる入れ替わり可能なタンパク質標識法の開発に取り組んだ。タンパク質標識用のタグとして OBP（Odorant Binding Protein）を選択した。OBP は 20 kDa 程度のタンパク質であり、元来疎水性の匂い分子を運搬する役目を有している[4]。このタグに結合する蛍光プローブとして、OBP のリガンド構造を有する、環境応答性のベンゾクマリン誘導体（DMABC-FA）を設計、合成した。本蛍光プローブはタンパク質と結合していない状態では蛍光を発せず、結合した際に大きく蛍光を上昇できるため、高いコントラストで標的としたタンパク質をイメージングすることが期待できる。



実際に DMABC-FA を OBP と混合したところ、蛍光強度が大きく上昇することが分かった。また、OBP を生細胞内の各オルガネラに発現させることで、蛍光プローブを加えるだけで迅速に標識が起こり、オルガネラをイメージングできることが分かった。さらに、この標識は可逆であるため、洗浄操作による脱標識、別の蛍光プローブとの入れ替えもできることが示された。加えて本標識法を 1 分子イメージングに適用した結果についても報告する。

1. S. Mizukami, Y. Hori, K. Kikuchi, *Acc. Chem. Res*., **2014**, *47*, 247.
2. C. Szent-Gyorgyi *et al*. *Nat. Biotechnol.*, **2008**, *26*, 235.
3. M.-A. Plamont *et al*. *PNAS.*, **2015**, *113*, 497.
4. L. Briand *et al*. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 7241.

Poster Short Talk

Sun. Sep 11, 2022 10:50 AM - 11:50 AM JST | Sun. Sep 11, 2022 1:50 AM - 2:50 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Poster short talks (P80-P99)

[P80] Coordination Chemogenetics for Selective Inhibition of class A GPCR

*Takuto Sugawara[1], Muneo Tsujikawa[2], Yuta Miura[1], Akinobu Senoo[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate school of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University)

[P81] Artificial palmitoylation of protein controls the raft localization and intracellular delivery

*Kazuki Uchida[1], Hiroki Obayashi[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1], Naofumi Shimokawa[2], Masahiro Takagi[2], Noriho Kamiya[1] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P82] An Artificial Photo-redox Enzyme Constructed by Incorporation of an Organic Photosensitizer into a Protein

*Yuki Uchida[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P83] Hydroxylation of Propane Using Intracellular Cytochrome P450BM3 in Water/Ionic Liquid Biphasic System

*Yuki Sugai[1], Masayuki Karasawa[1], Yusaku Kodama[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P84] Combination of cpHaloTag and bio-orthogonal two-step labeling for trafficking studies of transmembrane proteins.

*Jun Ikeshita[1], Yutaro Sugihara[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P85] Development of artificial metalloenzymes for stereoselective hetero Diels-Alder reaction

*Saho Yoshioka[1], Yoshitsugu Morita[2], Nobutaka Fujieda[2] (1. Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 2. Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University)

[P86] Creation of an Artificial Metalloenzymes toward Stereodivergent Michael Addition Reaction

*Ryusei Matsumoto[1], Saho Yoshioka[1], Tomohito Marumo[1], Yoshitsugu Morita[1], Nobutaka Fujieda[1] (1. Osaka Metro. Univ.)

[P87] Kinetic analysis of the interaction of agonist antibodies targeting OX40.

*Kan Ujiie[1], Aki Tanabe[2], Satoru Nagatoishi[3], Kouhei Tsumoto[1,3,4] (1. Dept. of Bioeng., Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, 2. AIDS Res. Center, NIID, 3. Inst. Med. Sci., The Univ. of Tokyo, 4. Dept. of Chem Biotech., Sch. Eng., The Univ. of Tokyo)

[P88] Synthesis of cyclic oligo (ethylene glycol) for suppression of amyloid insulin fibrillation

*Thirasara Sammani PituwalaKankanamge[1] (1. Life science and technology , Tokyo Institute of Technology)

[P89] Development of opto-chemogenetics tool for reversible reglation of adenosine A_{2A} receptors

*Harufumi Suzuki[1], Doura Tomohiro[1], Kiyonaka Shigeki[1] (1. Engineering)

[P90] Development of technology for selective degradation of proteins in mitochondria matrix

*Wakana Yamada[1], Shinichi Sato[1,2], Minoru Ishikawa[1], Shusuke Tomoshige[1] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[P91] Chemogenetic regulation of adenosine A2A receptor focusing on the action of the subtype-selective antagonists

*Yuma Matsuoka[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P92] DNA Labeling to Target Protein by Photoreaction of Benzophenone and Its Application

*Ryota Hidaka[1], Masaru Mori[2], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 2. Institute for Advanced Bioscience, Keio University)

[P93] TRAP display selection of monobodies for the detection of microinflammation.

*Ryusei Matsuo[1], Tomoshige Fujino[1], Jing-Jing Jiang[2], Murakami Masaaki[2], Hayashi Gosuke[1], Murakami Hiroshi[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Medicine, Hokkaido University, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P94] Novel Chemogenetics for Subunit-selective Inhibition of AMPA Receptor Activity

*Yuta Deen Miura[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P95] Preparation of cytochrome b_{562} oligomers using efficient disulfide bond formation

*Karen Kurihara[1], Julian Wong Soon[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P96] Improving the efficiency of heme incorporation into recombinant cytochrome P450 by co-expression of ferrochelatase

*Eri Akagawa[1], Maki Sawada[1], Masafumi Yohda[1], Nobuhumi Nakamura[1] (1. Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P97] Preparation and functional evaluation of nonwoven fabrics made of crosslinkable polymers using bioorthogonal reaction.

*Ishiguro Taira[1] (1. Nagoya Institute of Technology)

[P98] Tensile characteristics of nestin tail domain by AFM

*Rina Tokuoka[1], Koki Uchida[1], Ayana Yamagishi[1,2], Daijiro Takeshita[3], Chiaki Yoshikawa[4], Tomohiko Yamazaki[4], Taro Q.P. Uyeda[5], Chikashi Nakamura[1,2] (1. Grad. Sch. Eng. TUAT, 2. Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST, 3. Biomed. Res. Inst., AIST, 4. NIMS, 5. Waseda Univ.)

[P99] Development of eco-friendly bromolactone synthase

*Takuya Matsuura[1], Hideyasu China[1], Takashi Nakamura[1], Hidehito Mukai[1] (1. Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

配位ケモジェネティクス法の class A GPCR 選択的な活性阻害への展開

○菅原巧人[1]・辻川宗男[2]・三浦裕太[1]・妹尾暁暢[1]・浜地格[2]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]京大院工）

Coordination Chemogenetics for Selective Inhibition of class A GPCR (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University [2]) SUGAWARA, Takuto[1]; TSUJIKAWA, Muneo[2]; MIURA, Yuta[1]; SENOO, Akinobu[1]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

細胞膜受容体の中で最大のファミリーを形成する G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、身体のあらゆる組織に存在し、それぞれの組織で細胞外からのシグナルを細胞内に伝達する役割を果たしている。特に脳神経領域では GPCR の緻密な活性制御が行われており、同じ受容体でも異なる組織に発現していれば、異なる機能をもつと考えられている。そのため、GPCR を組織選択的に制御することができれば、未だ知られていない脳機能の解明や精神疾患のメカニズムの解明につながると考えられている。我々は GPCR の結晶構造に基づいた変異体デザインを行うことで class C GPCR に属する代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の活性制御に成功している [1)]。配位ケモジェネティクス法と名付けたこの手法では class C GPCR に特徴的な細胞外のリガンド結合部位(LBD)近傍に配位性アミノ酸を変異導入することで、金属イオンの配位により LBD の構造変化を人為的に惹起して活性制御を実現した。

本研究では class C 以外の GPCR にも広く適用可能な配位ケモジェネティクス法を開発するため、新たな変異導入位置の模索を行った。我々は全ての GPCR に共通する構造である 7 回膜貫通領域(TMD : TM1-TM7)に着目した。近年の X 線結晶構造解析や CryoEM 構造解析により GPCR の中でも class A に属する受容体の構造変化メカニズムは特に詳細に議論されている。その中でも構造解析が進んでいる adenosine A_{2A} 受容体を標的とした。構造的知見に基づき、受容体の活性化に伴い大きく配向が変化する TM5 と TM6 に金属イオンの配位サイトを導入し、各種金属イオン処置後のアゴニスト応答を評価した。その結果、新たに Cu(II)の配位によって内在リガンドであるアデノシンによる活性を阻害する変異体の取得に成功した。現在、本手法の他の GPCR に対する適用拡大を行なっている。

1) Ojima K., Kakegawa W., Yamasaki T., Miura Y., Itoh M., Michibata Y., Kubota R., Doura T., Miura E., Nonaka H., Mizuno S., Takahashi S., Yuzaki M., Hamachi I., Kiyonaka S. *Nat. Commun.*, **13**, 3167 (2022).

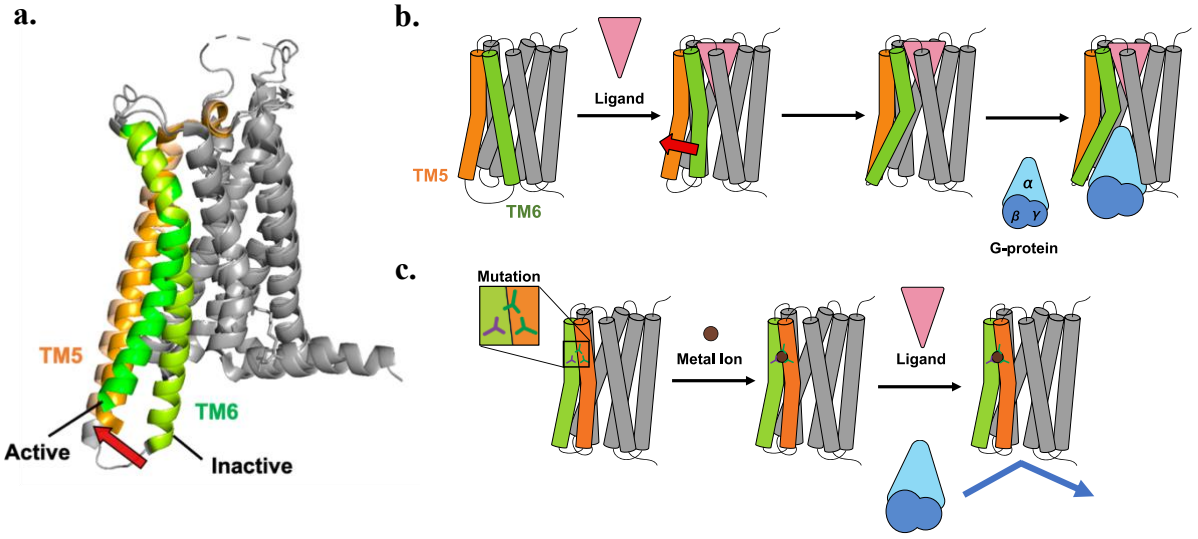


Fig 1. (a) Conformational changes associated with receptor activation (PDB IDs : 3RFM, 5G53). Schematic illustration of activation of class A GPCR by endogenous ligand (**b**) and chemogenetic inhibition of a GPCR mutant by metal ion (**c**).

人工パルミトイル化タンパク質のラフト局在と細胞内送達機構

○内田 和希[1]・大林 洋貴[1]・南畑 孝介[1]・若林 里衣[1]・後藤 雅宏[1]・下川 直史[2]・高木 昌宏[2]・神谷 典穂[1]（[1]九大院工、[2]北陸先端大マテリアルサイエンス）

Artificial palmitoylation of protein controls the raft localization and intracellular delivery

([1]Graduate School of Engineering, Kyushu University, [2]School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology) UCHIDA, Kazuki[1]; OBAYASHI, Hiroki[1]; MINAMIHATA, Kosuke[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; GOTO, Masahiro[1]; SHIMOKAWA, Naofumi[2]; TAKAGI Masahiro[2]; KAMIYA, Noriho[1])

【目的】生体内でパルミトイル化されたタンパク質は、細胞膜上の機能性ナノドメインであるラフトに局在し、多彩な生理機構への関与が示唆されている[1)]。本研究では、パルミトイル化タンパク質の脂質二分子膜上でのアンカリング挙動の理解を目指し、目的タンパク質の人工的なパルミトイル化を介したラフトへの局在化について、生体模倣膜と生細胞を用いた比較検討を行なった。

【方法】微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) が触媒する架橋反応を利用し、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) に部位特異的にパルミトイル基が修飾された EGFP-Pal を得た (**Fig. 1 (a)**)。生体模倣膜として giant unilamellar vesicles (GUVs) を選択し、流動性が高い Liquid disordered (Ld) 相と流動性が低い Liquid ordered (Lo) 相からなる Ld/Lo 相分離 GUV ([DOPC]:[DPPC]:[Cholesterol] = 4:4:2)、Ld 相とゲル相である Solid ordered (So) 相からなる Ld/So 相分離 GUV ([DOPC]:[DPPC]= 5:5) を調製した。また、Rhodamine-DHPE により Ld 相を染色した。一方、生細胞としてヒト白血病性 T 細胞株 Jurkat を選択し、Concanavalin A による Jurkat 細胞の活性化に伴うラフトの局在と内在化を利用して、EGFP-Pal の細胞質内への小胞輸送経路について評価した[2)]。ラフトの標識には蛍光標識 Cholera toxin subunit B (CT-B) を、細胞膜中の Cholesterol の抽出には methyl-β-cyclodextrin (MβCD) を用いた。

【結果と考察】共焦点レーザ顕微鏡 (CLSM) による GUV の観察から、EGFP-Pal はラフトを模した Lo 相に局在することが確認された。また、Cholesterol を欠いた So 相には EGFP-Pal の局在が観察されなかった (**Fig. 1 (b)**)。この結果から、EGFP-Pal は脂質間相互作用によって Lo 相へ局在し、脂質二分子膜中の Cholesterol が局在に重要なことが示唆された。次に、Jurkat 細胞を用いた検討から、EGFP-Pal は濃度依存的に Jurkat 細胞膜にアンカリングし、高濃度条件下において細胞質内への移行と、ラフトクラスターとの共局在が観察された (**Fig. 1 (c)**)。次に、細胞膜のコレステロールを枯渇させた Jurkat 細胞と EGFP-Pal を共培養すると、CT-B および EGFP-Pal の内在化が大幅に抑制され (**Fig. 1 (c)**)、EGFP-Pal の内在化には Cholesterol の存在が重要なことが示唆された。このことから、EGFP-Pal は Jurkat 細胞膜のラフトに局在し、ラフトの一形態であるカベオラに依存したエンドサイトーシスにより内在化すると考えられた。以上の結果から、タンパク質の人工的パルミトイル化によるラフトへの局在の制御と、カベオラを介した細胞質内送達が可能なことが示唆された[3)]。

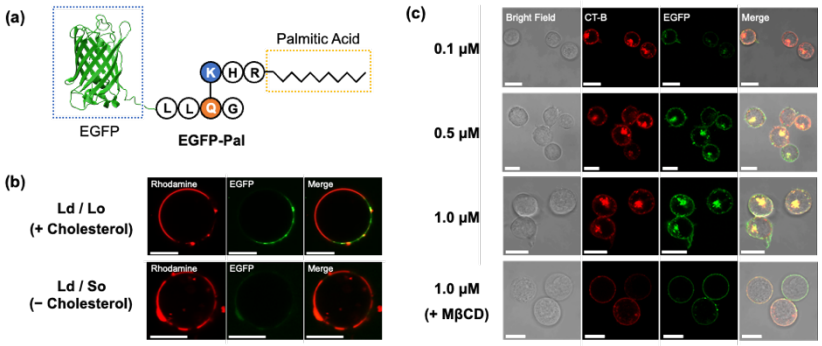


Fig. 1 (a) Schematic image of EGFP-Pal synthesized through MTG reaction which catalyzes the formation of isopeptide bond between Glutamine (Q) and Lysin (K). (b)(c) CLSM images of (b) phase-separated GUVs and (c) Jurkat cells with EGFP-Pal. (bar : 10μm)

1) K. Simons *et al.*, *Nature*, **387**, 569–572 (1997); 2) S. Yabuuchi *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 685–693 (2017); 3) K. Uchida *et al.*, *Langmuir*, 10.1021/acs.langmuir.2c01205.

有機光増感色素とタンパク質により構成される光レドックス人工酵素の開発

○内田裕貴・大洞光司・林 高史（阪大院工）

An Artificial Photo-redox Enzyme Constructed by Incorporation of an Organic Photosensitizer into a Protein (Graduate School of Engineering, Osaka University) UCHIDA, Yuki; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

光による励起エネルギーを利用した光増感色素による光レドックス触媒反応は、通常困難な物質変換反応に対して有用である。近年では、光レドックス触媒と生体触媒を組み合わせることで、光レドックス触媒が促進するユニークな反応と、生体触媒が得意とする基質特異性と立体・位置選択性を組み合わせた、温和な条件下での高選択的な反応系の模索が報告されている[1]。しかし、それらの多くの系は、光レドックス触媒による光反応と生体触媒による光学分割の２段階で立体選択性を発現させており、光レドックス触媒反応の立体選択性の直接制御は限られている。そこで我々は、タンパク質の反応場に光レドックス触媒を配置し、光反応の立体選択性を直接的に制御する光レドックス人工酵素の開発を試みた。本研究では、光レドックス触媒として有機色素である fluorescein を、足場タンパク質として lipocalin をそれぞれ選択した。すでに、lipocalin と fluorescein が結合した複合体の結晶構造は報告されており、光レドックス人工酵素として最適な組み合わせであると考えた[2]。本研究では、lipocalin と fluorescein を複合化した光レドックス人工酵素を用いて、常温・常圧・水中における光誘起イミン還元反応を評価した (Fig. 1)。

初めに、大腸菌を用いて lipocalin を発現し、fluorescein に対する lipocalin の滴定実験から結合定数を 1.6×10^7 M^{-1} と決定した。続いて、既報[3]を参考に 3,4-dihydroisoquinoline 誘導体 **1** の還元反応を目的反応として選択した。Ascorbic acid ($AscH_2$)、チオール系添加剤 (MPA, MPAA) の存在下で、青色 LED の照射によるイミン還元反応に対する lipocalin-fluorescein 複合体 (Lip-Flu) の触媒活性を評価した (Fig. 2)。Fluorescein が触媒として機能し、lipocalin が触媒回転数を向上させることは確認されたが、lipocalin との複合化による立体選択性の発現は達成できなかった。触媒能のさらなる向上や立体選択性の発現には、反応場周辺での水素原子移動の制御が重要であると考え、lipocalin 反応場付近のアミノ酸残基を cysteine に置換した変異体を設計した。遺伝子工学的手法により調製した lipocalin 変異体 (D1C, K38C) と fluorescein の複合体を光レドックス人工酵素として、光イミン還元反応に対する活性を評価し、現在、条件の最適化等を検討している。

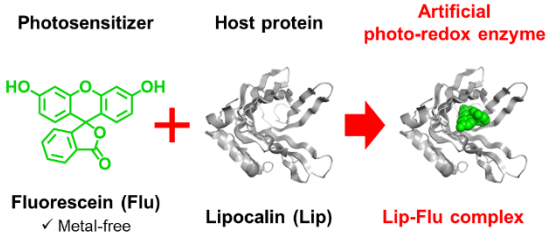


Fig. 1. Construction of an artificial photo-redox enzyme.

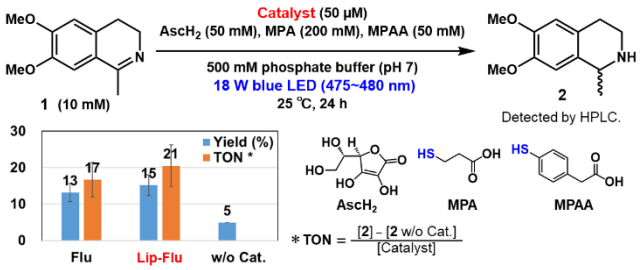


Fig. 2. Evaluation of the catalytic activity toward imine reduction.

1) D. W. C. MacMillan, T. K. Hyster *et al.*, *Science*, **2020,** *369*, 1113–1118.
2) I. P. Korndörfer, G. Beste, A. Skerra, *Proteins*, **2003**, *53*, 121-129.
3) X. Guo, Y. Okamoto, M. R. Schreier, T. R. Ward, O. S. Wenger, *Chem. Sci.*, **2018**, *9,* 5052–5056.

水/イオン液体二相系を用いたシトクロム P450BM3 による菌体内でのプロパン水酸化

○須貝友紀・唐澤昌之・児玉侑朔・有安真也・愛場雄一郎・荘司長三（名大院理）

Hydroxylation of Propane Using Intracellular Cytochrome P450BM3 in Water/Ionic Liquid Biphasic System (Graduate School of Science, Nagoya University) SUGAI, Yuki; KARASAWA, Masayuki; KODAMA, Yusaku; ARIYASU, Shinya; AIBA, Yuichiro; SHOJI, Osami

シトクロム P450BM3 (P450BM3) は、天然において長鎖脂肪酸の亜末端部位を水酸化する酵素である。不活性な C-H 結合を高効率に水酸化可能であり、基質特異性の改変による非天然基質の水酸化が研究されている。特にガス状アルカンの水酸化は、貯蔵、運搬の簡便化や、天然ガスの化成品としての利用に繋がる重要な反応として盛んに挑戦されている。我々の研究グループでは、基質を模倣した小分子 (デコイ分子) により酵素の基質特異性を改変する基質誤認識システムを開発し、デコイ分子の添加により野生型の P450BM3 を用いたプロパンの水酸化に成功した [1] (Fig. 1)。しかし、P450BM3 は反応のために高価な補酵素である NADPH を化学量論量消費するという欠点があるため反応のスケールアップや長時間化は現実的ではない。一方、P450BM3 を発現させた大腸菌を反応容器とし、菌体内で再生させた NADPH を用いて P450BM3 によるベンゼンや一部のベンゼン誘導体の水酸化を達成している [2]。

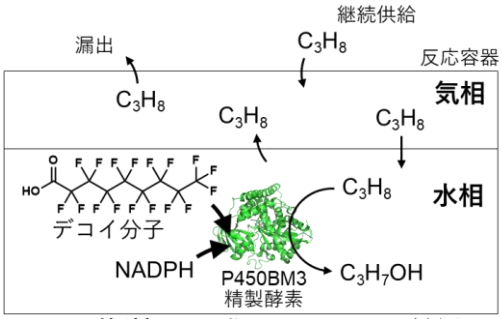


Fig 1. 基質誤認識システムを利用した P450BM3 によるプロパン水酸化 (従来法)

本研究では、P450BM3 の菌体内反応によるプロパン水酸化に取り組んだ。P450BM3 を発現させた大腸菌にデコイ分子を添加し、反応系へプロパンを供給すると 2-プロパノールの生成が確認された。しかし、プロパンが反応系中から容易に抜けてしまうことが課題となった。従来の手法では、基質濃度を一定に保つために継続的にプロパンを供給している (Fig. 1)。これを長時間の菌体内反応に適用すると、ガスの供給量の違いにより再現性が低下する。加えて、多量のプロパンガスが消費される。そこで、イオン液体にプロパンを溶解する水/イオン液体二相系を構築した (Fig. 2)。イオン液体は常温付近に融点を持つ有機イオンの塩であり、不揮発性、難燃性でガスの溶解性が高いという特徴を持つ。イオン液体相が高濃度のプロパンを保持し、水相から抜けた基質が相間の分配によりイオン液体相から補給されると期待した。これにより、反応中に外部からプロパンを供給しなくとも、菌体が存在し反応が行われる水相において、高い基質濃度が長時間維持される。毒性が無く、反応を阻害しないイオン液体として[$P_{6,6,6,14}$][NTf_2] (Fig. 3A) を選択した。二相系で反応を行うと、イオン液体を添加しない場合と比べて 5 倍以上の 2-プロパノールが生成した (Fig. 3B)。水に対するプロパンの飽和濃度 (1.49 mM) を上回る濃度の生成物が得られており、イオン液体相から基質が供給された効果と推測できる。

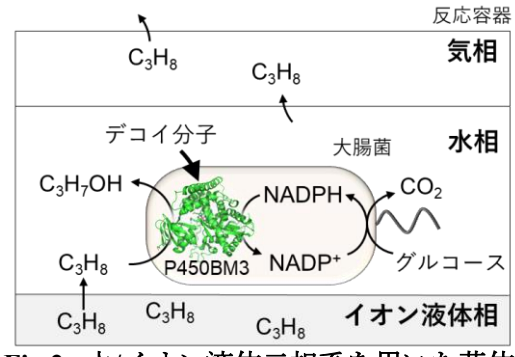


Fig 2. 水/イオン液体二相系を用いた菌体内でのプロパン水酸化 (本研究)

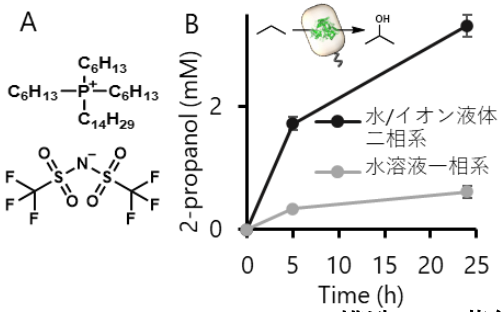


Fig 3. (A) [$P_{6,6,6,14}$][NTf_2]の構造 (B) 菌体内反応の 2-プロパノール収量の経時変化

1) S. Ariyasu, Y. Kodama *et al., ChemCatChem,* **11**, 4709 (2019)
2) M. Karasawa. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 12264 (2018)

細胞膜タンパク質の精密動態解析を可能とする cpHaloTag および二段階ラベル化法の開発

○池下 潤[1]・杉原 佑太朗[1]・清中 茂樹[1]（[1]名大院工）

Combination of cpHaloTag and bio-orthogonal two-step labeling for trafficking studies of transmembrane proteins. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]) IKESHITA, Jun[1]; SUGIHARA, Yutaro[1]; KIYONAKA, Shigeki[1].

細胞膜タンパク質は形質膜上に存在し，外部からの刺激に応答して細胞内にシグナルを伝達する．これら膜タンパク質の動態を追跡することは生理現象の理解や病態の解明，そして創薬科学など基盤技術の発展にもつながると考えられる．膜タンパク質の可視化には蛍光タンパク質やタンパク質タグの融合が広く用いられるが，タンパク質タグを用いる方法では，蛍光標識リガンドを添加したタイミングで可視化でき，高い時間・空間分解能での解析が可能である．その代表例として，共有結合で修飾可能な HaloTag が挙げられる．HaloTag は 30 kDa のタンパク質であり，アルキルクロライド骨格からなるリガンドと選択的に共有結合を形成し，蛍光標識が可能である[1)]．HaloTag は標的タンパク質の N 末端あるいは C 末端に入れることが多い．しかし，タンパク質末端は他のタンパク質の相互作用に関与する可能性があることや，両末端が細胞内に存在する膜タンパク質を細胞表層で可視化できないことが問題である．これらの問題を解決するには，タンパク質の細胞外ループに HaloTag を導入する必要が出てくるが，HaloTag の N, C 末が離れており，細胞外ループに融合すると標的タンパク質に摂動が加わり，機能が損なわれる懸念がある．

本研究では HaloTag 本来の N, C 末をリンカーでつなぎ，新たに N, C 末をつくる circular permutation 法でほどこした circularly permutated HaloTag (cpHaloTag)を膜タンパク質の細胞外ループに融合し，タンパク質への摂動を最小限に留めることに成功した．このように設計された cpHaloTag を TRP チャネルや AMPA 受容体など様々な膜タンパク質に融合させ，生体直交的二段階ラベル化法[2)]で蛍光ラベル化を行った．具体的には，まず HaloTag リガンドに *trans*-cyclooctene (TCO)を連結させた HTL(TCO)用いて標的タンパク質を TCO ラベル化した．HTL(TCO)は疎水性が高く，細胞膜を透過する性質を持つため，細胞内外全ての標的タンパク質が TCO ラベル化されると予想される．続いて蛍光色素を融合したテトラジンを加えることで，迅速かつ選択的に膜タンパク質の局在が示された．このような手法を用いて，従来解析しにくかった膜タンパク質をより詳細な研究ができ，創薬プラットフォームに有用なツールを与えることが期待される．

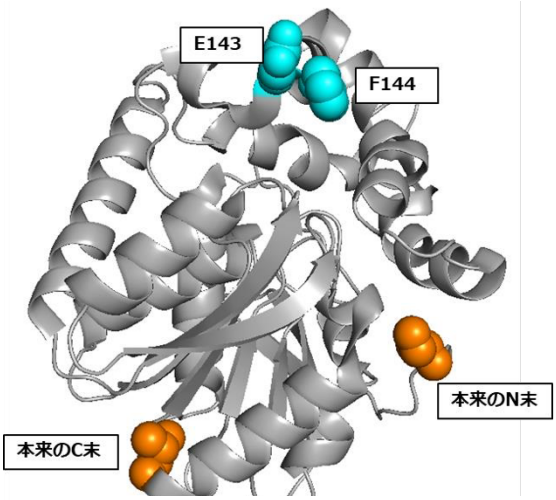


Fig. 1 X-ray crystal structure of HaloTag

1) K. Wood *et al.*, *ACS Chem. Bio.* **3**, 373, (2008).
2) S. Kiyonaka *et al.*, *Nat. Commun.* **12**, 831, (2021).

立体選択的ヘテロ Diels-Alder 反応を触媒する タンパク質金属錯体の開発

○吉岡紗穂[1]・森田能次[2]・藤枝伸宇[2]（[1]大阪府大院生命、[2]大阪公大院農）

Development of artificial metalloenzymes for stereoselective hetero Diels-Alder reaction (Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University[1], Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University [2]) YOSHIOKA, Saho[1]; MORITA, Yoshitsugu[2]; FUJIEDA, Nobutaka[2]

ここ近年､環境汚染と安全性への配慮から有機合成における反応溶媒として､「水」に大きな関心が寄せられている。しかし、水は反応性が高く、使用する触媒が分解することもあり、新しい触媒系の構築が必要である。酵素は水系において有力な触媒の一つであり、細胞内で、消化・呼吸・代謝などに関わる種々の化学反応を触媒する。酵素は既存の触媒に比べて、常温、常圧、中性といった非常に温和な条件下で反応を促進するのみならず、高い位置･立体選択性と基質･反応特異性を発揮する。しかし、一般的に酵素は不安定であり、化学工業的に要望される反応を触媒するものもあまり見つかっておらず、そのままでは利用できない場合がほとんどである。このような問題を解決するため、タンパク質を反応場として遷移金属の反応性を高めた「人工金属酵素」が数多く研究されている。[1]

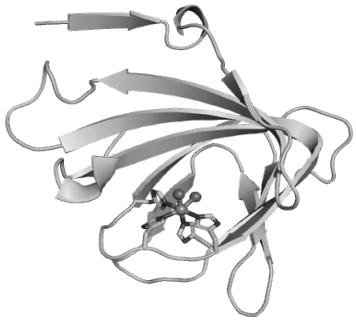
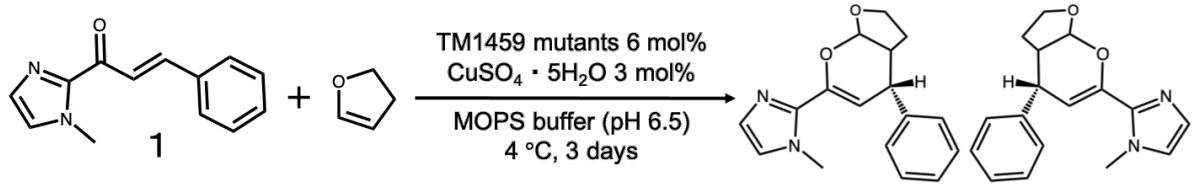


Fig 1. Cupin-type protein (TM1459)

一方で、当研究室では超好熱菌由来の TM1459 タンパク質[2]を用い（図 1)、このタンパク質が持つ 4 つのヒスチジン残基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、第一配位圏にある 4 つのヒスチジン残基のうち 1 つまたは 2 つをアラニンに変異させた変異体(H52A, H54A, H58A, H92, H52A/H54A, H52A/H58A, H54A/H58A, H58A/H92A)を構築した。また、これを用いた立体選択的逆電子要請型ヘテロディールスアルダー反応を行った結果について報告する。

α, β-不飽和アシルイミダゾール誘導体(1)とジヒドロフランを用いたディールスアルダー反応を対象に、タンパク質配位子のスクリーニングを行なった。野生型ではほとんどエナンチオ選択性が見られなかったが、H54A/H58A 変異体を用いた場合、*exo* 体はほとんど検出されず、*endo* 体で高いエナンチオ選択性が見られた。本発表ではさらなる変異導入の結果についても報告する。



Scheme 1. Diels-Alder Reaction of α, β-unsaturated acyl imidazole with dihydrofuran

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. (b) Fujieda, N.; Itoh, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 7717.

立体選択的マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の開発

○松本隆聖・吉岡紗穂・丸毛智史・森田能次・藤枝伸宇（大阪公大院農）

Creation of Artificial Metalloenzymes toward Stereodivergent Michael Addition Reaction (Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University) MATSUMOTO, Ryusei; YOSHIOKA, Saho; MARUMO, Tomohito; MORITA, Yoshitsugu; FUJIEDA, Nobutaka

近年、人工金属酵素(ArMs)の開発に向けた様々なアプローチが活発に行われている[1]。反応の足場とするタンパク質は、結合した金属錯体の水に対する溶解性を向上させ、分解速度を低下させる。そのため、ArMsは金属錯体由来の高い反応性や、立体特異性などの酵素的な能力を活用し、高難度な化学反応も加速させることができる。このように ArMs の触媒作用は非常に有望であるが、金属錯体やペプチドの合成は煩雑であり、労力が必要である。そこで、タンパク質に直接金属イオンを導入することによる簡便な人工金属酵素の構築を目指した。これまでに超好熱菌 *Thermotoga maritima* から得たクピン型タンパク質 (TM1459)を用いて、金属中心の周りにアミノ酸残基を配置した人工金属酵素を開発している[2,3]。この金属結合部位は4つのヒスチジン残基からなり、tris(2-pyridylmethyl)amine (TPA)リガンド系の配位構造と類似の形状をしている。そこで、金属結合部位の 4 つのヒスチジンを変異させることにより、高い立体選択性を持つ酵素の構築を試みた。本研究では、第一配位圏にある 4 つのヒスチジン残基のうち 2 つをそれぞれ、カルボン酸を側鎖に持つアミノ酸とアラニンに変異させた変異体を構築し、硫酸銅を導入することで立体選択的なマイケル付加反応のスクリーニングを行なった。

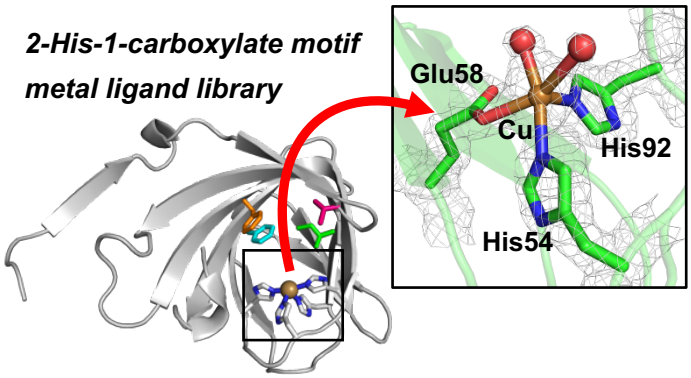
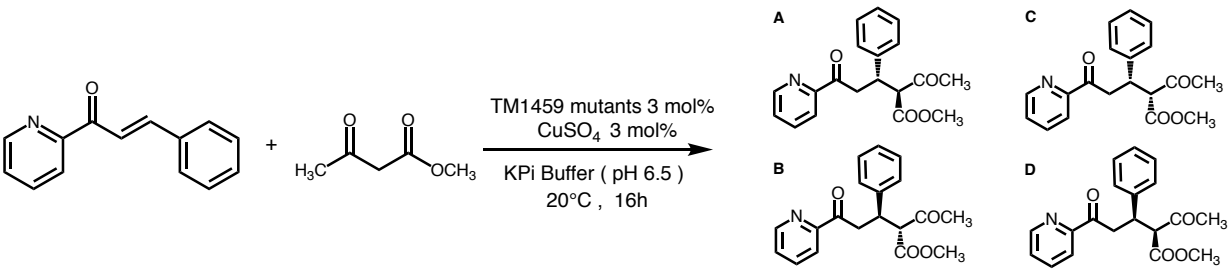


Fig 1. Active Center of TM1459 Mutants; Cu-H52A/H58E

モデル反応として、2-アザカルコンをアクセプター、アセト酢酸メチルをドナーとして用いた 4 つの立体異性体を生成する反応(Scheme. 1)を行なった。野生型を用いた場合には選択性を示さなかった。一方で、構築した変異体をライブラリーとしてスクリーニングしたところ、銅イオンとともに H52A/H58E 変異体(Fig. 1)を添加した際に鏡像異性体過剰率が 96 %を示し、高い立体選択性が見られた。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ライブラリーの拡充について議論する。



Scheme 1. Asymmetric Michael Addition Reaction Catalyzed by Cu-TM1459

1) T. R. Ward et al., *Chem. Rev.* **2018**, 118, 142–231
2) N. Fujieda.; Itoh, S. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 5149 – 5155.
3) N. Fujieda.; Itoh, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 7717.

抗 OX40 アゴニスト抗体の相互作用に関する速度論的研究

○氏家寛[1]，田部亜季[2]，長門石曉[3]，津本浩平[1,3,4]（[1]東大・院工・バイオエンジ，[2]国立感染研・エイズ研，[3]東大・医科研，[4]東大・院工・化学生命工学）

Kinetic analysis of the interaction of agonist antibodies targeting OX40. (Dept. of Bioeng., Sch. of Eng., The Univ. of Tokyo[1], Inst. of Med., The Univ. of Tokyo[3], AIDS Res. Center, NIID[2], Dept. of Chem and Biotech., Sch. of Eng., The Univ. of Tokyo[4]) Kan Ujiie[1]; Aki Tanabe[2]; Nagatoishi Satoru[3]; and Kouhei Tsumoto[1,2,4]

TNF 受容体スーパーファミリー（TNFRSF）に属する T 細胞活性化因子 OX40（TNFRSF）を標的としたアゴニスト抗体は，癌免疫療法への応用が期待される(1)一方で，そのシグナル伝達制御の分子メカニズムは未だ解明されていない。本研究では，臨床試験段階にある 4 種類の抗 OX40 アゴニスト抗体の分子認識・受容体制御機構において重要な物理化学的パラメータを明らかにすることを目指した。

まず，表面プラズモン共鳴法（SPR）を用い，センサーチップに固定化した IgG 抗体に対して組み換え発現した OX40 を流すことより，1:1 の分子間相互作用の速度論的解析を行った。すべての抗体-OX40 間の結合を確認し，抗体間で特に OX40 結合の解離速度定数 k_{off} が大きく異なることが解った。続いて，OX40 のドメイン欠損体を用いて SPR を行い，各抗体のエピトープを OX40 の N 末端側 /C 末端側の二種類に分類し，C 末端側に結合する抗体は親和性が高い傾向にあることを明らかにした。

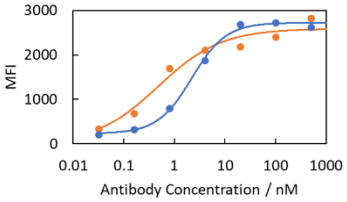


Fig. 1 フローサイトメトリー
青：Tavolixizumab，橙：Revdofilimab

次にフローサイトメトリー法を用いて，細胞表面上に発現する OX40 に対する各抗体の結合活性の評価を行い，結合活性は解離定数 K_D の順位とは異なっていることが解った。速度論的パラメータに着目してみると，むしろ結合速度定数 k_{on} に相関があり，k_{on} が高いほど細胞表面上の OX40 に対する結合活性が強いことが示唆された。

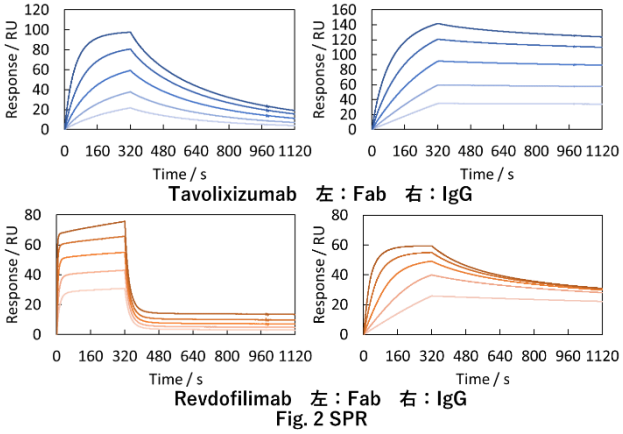


Fig. 2 SPR

このことについて，細胞表面上で OX40 が局所的に発現している場合，一度解離した抗体が再び別の OX40 に結合することで，1 分子同士の k_{on} が，巨視的な細胞表面上の系では解離速度を遅くしている可能性を考えた。そこで，より細胞表面上の相互作用に近づけるため，SPR の系を，OX40 をチップ表面上に固定化し各抗体を流す系に変更し解析を行った。すると，抗体を固定化するときに比べて k_{on} の変化は小さかったものの，k_{off} は著しく変化し，各抗体間で見られていた k_{off} の差が小さくなった。同様の実験を抗体の結合部位を切り出した Fab でも行ったところ，もともとの抗体を固定化した際の速度論的パラメータとほとんど変化がなかったため，全長の抗体を流すことによって起きた k_{off} の変化は，IgG 抗体が持つ二価性によって得られる Avidity 効果によって達成されていることが示唆された。すなわち，結合が速く解離しても，二価の結合によってすぐに結合が回復し，巨視的に見たときに結合の増減がないということが考えられた。

これらのことから，結合部位の k_{on}, k_{off} が遅い抗体は，OX40 の C 末端側に安定に結合し OX40 の距離を一定以内に保つことでアゴニスト活性を示す一方で，k_{on}, k_{off} が速い抗体は N 末端側に結合し，解離と結合を繰り返すことによって OX40 を集合させ，アゴニスト活性を示すことが考えられた。さらに細胞上の OX40 に対する IgG 抗体の見かけ上の結合活性には、高い k_{on} も深く関与していることが明らかとなった。

1) D. N. Khalil et. al., **2016**, *Nat. Rev., Clinical Oncology*, 13, 273-91

Synthesis of cyclic oligo (ethylene glycol) for suppression of amyloid insulin fibrillation ([1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) SAMMANI, Thirasara[1.]; YOSPANYA, Wijak[1.]; WAWRO, Adam M.[1.]; SATO, Kohei[1.]; KINBARA, Kazushi[1.]

Protein aggregation leads to many types of diseases such as type 2 diabetes, Alzheimer's and Parkinson's. [1] There are many types of aggregation suppressors which have been developed to suppress protein aggregation such as water-soluble polymers, amino acid etc. We have demonstrated that monodisperse phenyl terminated oligo (ethylene glycol) (OEG) and cyclic triangular OEG derivatives suppress lysozyme aggregation at 90 ºC. [2,3] Herein, we attempted to synthesize cyclic amphiphilic OEG derivatives, containing hydrophobic and hydrophilic parts, to suppress insulin fibrillation. We developed a technique to obtain the mixture of cyclic OEG drivatives with different molecular sizes, which were separated by a recycling GPC system. Then the hydrophobic parts, which contain methyl benzoate units, were modified with ethanolamine through the transamidation reaction. All compounds were identified by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy.
Next, we scrutinized the effects of cyclic OEG derivatives on insulin fibrillation. The insulin solution was incubated with the cyclic OEG derivatives at 60 ºC in the phosphate buffer (pH 2) for 8 h. After 5 h, unchanged insulin was quantified every 1 h by UPLC. We observed that the unchanged insulin in the solution depleted to less than 1% after 5 h. Then, we used 18-crown-6 ether as a reference cyclic OEG and performed the same experiment. As a result, 18-crown-6 ether did not suppress insulin fibrillation. In contrast, insulin in the presence of monomeric cyclic OEG derivative with weight ratio 1:16 and 1:10, 80% of unchanged insulin remained after 8 hours. Thus, this study demonstrates the importance of amphiphilicity in the design of cyclic OEG derivatives to suppress insulin fibrillation.

Reference

1.Wang, S., Zheng, J., Ma, L., Petersen, R. B., Xu, L., & Huang, K.(2022). Inhibiting protein aggregation with nanomaterials: The underlying mechanisms and impact factors. *Biochim. Biophys. Acta*, *1866*, 130061.

2.Sadhukhan, N., Muraoka, T., Ui, M., Nagatoishi, S., Tsumoto, K., & Kinbara, K. (2015). Protein stabilization by an amphiphilic short monodisperse oligo (ethylene glycol). *Chem. Commun.*, *51*, 8457-8460.

3.Muraoka, T., Adachi, K., Ui, M., Kawasaki, S., Sadhukhan, N., Obara, H., ... & Kinbara, K. (2013). A structured monodisperse PEG for the effective suppression of protein aggregation. *Angew. Chem.*, *125*, 2490-2494.

アデノシン A_{2A} 受容体の細胞種選択的な可逆的制御を指向したオプトケモジェネティックツールの開発

○鈴木啓文・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

Development of an opto-chemogenetics tool for reversible regulation of adenosine A_{2A} receptors in a cell-type specific manner (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SUZUKI, Harufumi; DOURA, Tomohiro; KIYONAKA Shigeki

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は7回膜貫通型タンパク質である。ヒトには800種類以上のGPCRが存在し、人体における様々な生理プロセスを制御しているため、GPCRは重要な創薬標的分子である。しかし、細胞種選択的なGPCRの活性制御は困難であり、個々のGPCRの詳細な機能は未解明な部分が多い。そこで、我々は特定細胞でのGPCRの活性制御を可能とする手法として「eLEC: extracellular Loop Engineered Chemogenetics」という化学遺伝学的手法を提唱している。この手法では、GPCRに保存される7回膜貫通(7TM)ドメインと細胞外ループ(ECL)という特徴的な構造に着目し、ECLにアミノ酸変異を加えることで内在リガンドとの親和性は維持しつつ、デザインした人工リガンドにより変異受容体選択的な活性制御を行う。当研究室ではclass A GPCRに属するアデノシン A_{2A} 受容体($A_{2A}R$)に対してeLECを適用することで、変異型 $A_{2A}R$ 選択的に活性化させる人工リガンドと変異型 $A_{2A}R$ の組み合わせを発見している。

本研究では、人工リガンドに可逆的光異性化能を有するアゾベンゼン構造を光スイッチング部位として導入することで、変異型受容体選択的制御に加え、光照射による局所選択的かつ短いタイムスケールでの可逆的活性制御を可能にすることを目指す。以前に、光スイッチング型リガンドMRS5543が野生型 $A_{2A}R$ に対して *trans* 体では作動薬(agonist)として作用し、*cis* 体では拮抗薬(antagonist)として作用することが報告されている[1]。しかし、MRS5543は野生型 $A_{2A}R$ に対して親和性が低く、熱緩和により迅速に *cis* 体が *trans* 体に異性化するため、光を照射し続ける必要がある点が課題であった。そのため、MRS5543の構造を参考に、新たに熱緩和が十分遅く、変異型 $A_{2A}R$ に対して高親和性で異性体間で異なる活性化能を有する光応答性リガンドを合成し、eLECによる変異型 $A_{2A}R$ 選択性と光による時間分解能を有するオプトケモジェネティックツールの開発研究を進めている。本発表ではその結果について報告する。

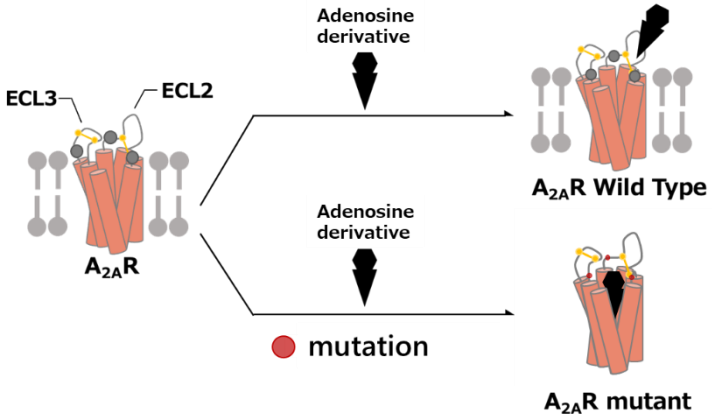


Figure 1. eLECによる受容体選択的制御

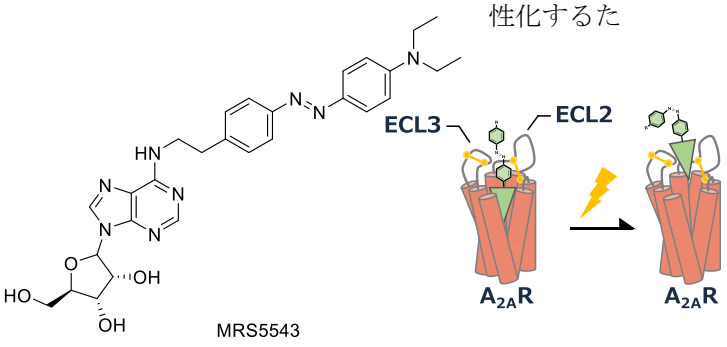


Figure 2. MRS5543の構造とその光制御

1) Bahamonde, M., *et al*. *Bioconjugate Chemistry*, **25**, 1847-1854 (2014)

ミトコンドリア内タンパク質選択的分解技術の開発

○山田若菜[1]・佐藤伸一[1,2]・石川稔[1]・友重秀介[1]（[1]東北大院生命、[2]東北大学際研）

Development of technology for selective degradation of proteins in mitochondria matrix (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University[1], Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University[2])
YAMADA, Wakana[1]; SATO, Shinichi[1,2]; ISHIKAWA, Minoru[1]; TOMOSHIGE, Shusuke[1]

近年、生体内のタンパク質分解機構を利用し、標的タンパク質を分解する「プロテインノックダウン法」が注目されており、PROTACs (Proteolysis Targeting Chimeras) をはじめとして、プロテインノックダウンを引き起こす標的タンパク質分解薬が多く開発されている[1]。標的タンパク質分解薬は標的タンパク質の生化学的な機能に関係なく分解できること、その作用が触媒的であることが特徴である。しかし、これまでに開発されてきた手法は、リソソームやオートファジー、ユビキチン-プロテアソーム系など細胞質のタンパク質分解機構を利用するため、ミトコンドリア内のタンパク質には適用できない。昨今、ミトコンドリアの機能と神経変性疾患やがんなど様々な疾患との関連が明らかになっており、ミトコンドリア内タンパク質が創薬ターゲットとして注目されている。そこで、本研究では、ミトコンドリアが持つタンパク質分解酵素を化合物により「ハイジャック」することで、ミトコンドリア内の任意の標的タンパク質のみを選択的に分解する新しい技術の開発を目標とした。ミトコンドリア内のタンパク質分解酵素として Caseinolytic Protease P (ClpP) に着目した。ClpP はミトコンドリアのマトリックスに内在し、活性化されることで非特異的なタンパク質分解が可能になることが報告されている[2]。そこで ClpP の活性化剤と標的タンパク質のリガンドを連結した化合物は、標的タンパク質を強制的に ClpP に近づけ、標的タンパク質の選択的な分解を誘導できると考えた (図 左)。

コンセプト証明を行うために、monomeric streptavidin (mSA) を標的タンパク質として設定した。mSA リガンドの desthiobiton と ClpP 活性化剤として報告されている TR79[2] を連結した化合物 **1** を合成した (図 右)。ClpP により分解されることで蛍光を発するペプチド基質 Ac-WLA-AMC (7-amino-4-methylcoumarin) を用いた実験より化合物 **1** が ClpP を活性化することを確認した。また、[mSA-化合物 **1**-ClpP] の三者複合体が形成されることを pull-down 実験により示した。さらに、mSA、化合物 **1**、ClpP を混合したところ化合物 **1** の濃度依存的に mSA の残存量が減少しており、化合物 **1** の mSA 分解誘導活性が確認できた。TR79 と desthiobiotin それぞれを用いた各種実験から、mSA の分解には化合物 **1** の連結構造および三者複合体の形成が重要であることを明らかにした。加えて、細胞 lysate を用いた夾雑下での実験より、分解が mSA 選択的であることを明らかにした。

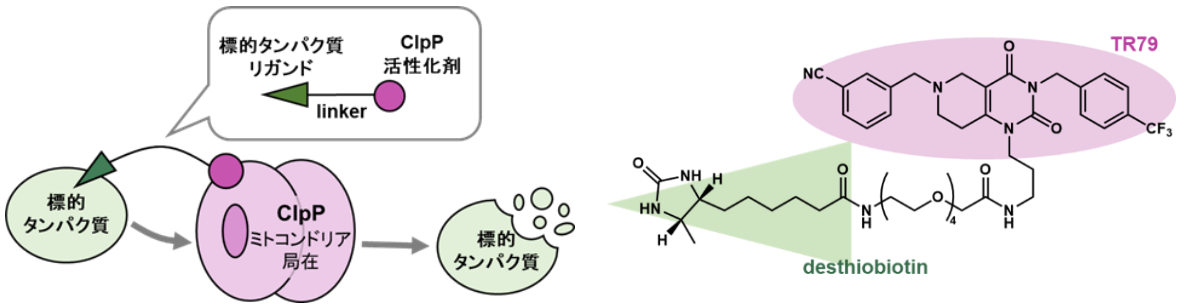


図. 連結化合物による標的タンパク質選択的分解誘導 (左)、化合物 **1** の構造(右)

[1] Zhao, L. *et al.*, *Sig Transduct Target Ther.* **2022**, *7*, 113. [2] Paul, G. *et al., ACS Chem. Biol.* **2019**, *14,* 1020.

サブタイプ選択的拮抗薬の作用機序に着目したアデノシン A_{2A} 受容体のケモジェネティクス制御

○松岡佑真、堂浦智裕、清中茂樹（名大院工）

Chemogenetic regulation of adenosine A2A receptor focusing on the action of the subtype-selective antagonists (Graduate School of Engineering, Nagoya University) Yuma Matsuoka, Tomohiro Doura, Shigeki Kiyonaka Hanako[2]

G タンパク質共役型受容体（GPCR）は細胞膜を介したシグナル伝達により広範な生理学的プロセスに関与し、創薬標的として注目される。同種の GPCR であってもサブタイプや発現細胞種によって異なる機能を持つことが知られるが、薬理学に代表される従来法ではサブタイプ選択性が高い薬剤を用いた GPCR の制御が可能である一方で、細胞種選択的な GPCR の活性制御は困難であった。特定の GPCR の生理機能解明を目指す上で、本来の受容体機能に摂動を与えることなく細胞種選択的に GPCR を制御する新たな手法の開発が求められている。

以上の背景から、我々は特定 GPCR を細胞種選択的に本来の生理応答のタイムスケールで制御する手法として extracellular Loop-Engineered Chemogenetics（eLEC）を提唱している。この手法では、多くの GPCR において細胞外ループ（ECL）が内在リガンドの結合位置である 7 回膜貫通（7TM）ドメインから空間的に離れていることに着目し、ECL にアミノ酸変異を導入する。ECL への変異導入は内在リガンドへの親和性に影響を与えずに、ECL と相互作用する拮抗薬の親和性を変化できると期待した。

本研究では class A GPCR に属するアデノシン A_{2A} 受容体（$A_{2A}R$）へ eLEC を適用し、受容体本来の機能に影響を与えることなく、変異型 $A_{2A}R$ を選択的に制御することを目標とした。変異受容体の設計を行う上で、アデノシン受容体が持つ 4 つのサブタイプ（A_1, A_{2A}, A_{2B}, A_3）のうち、A_1R と $A_{2A}R$ において内在リガンドであるアデノシンに対する親和性が高度に保存されている点に着目した。さらに、様々な $A_{2A}R$ 選択的拮抗薬は A_1R を含めた他のサブタイプへの親和性が低下するように設計されていることから、$A_{2A}R$ の ECL を A_1R の ECL に置換することで、内在リガンドの親和性に影響を与えることなく $A_{2A}R$ 選択的な拮抗薬の親和性のみを低下させることが可能であると考えた。実際に $A_{2A}R$ の ECL の一部を A_1R の ECL で置換した変異型 $A_{2A}R$ を作製し、様々な拮抗薬に対して HEK293 細胞を用いた活性評価を行なったところ、$A_{2A}R$ 選択性が非常に高い拮抗薬において変異型 $A_{2A}R$ 選択的に阻害能が 500 倍以上低下することを見出した。さらに、マウスから単離した初代アストロサイトにおいても本戦略が適用できることを確認したため、本学会で報告する。

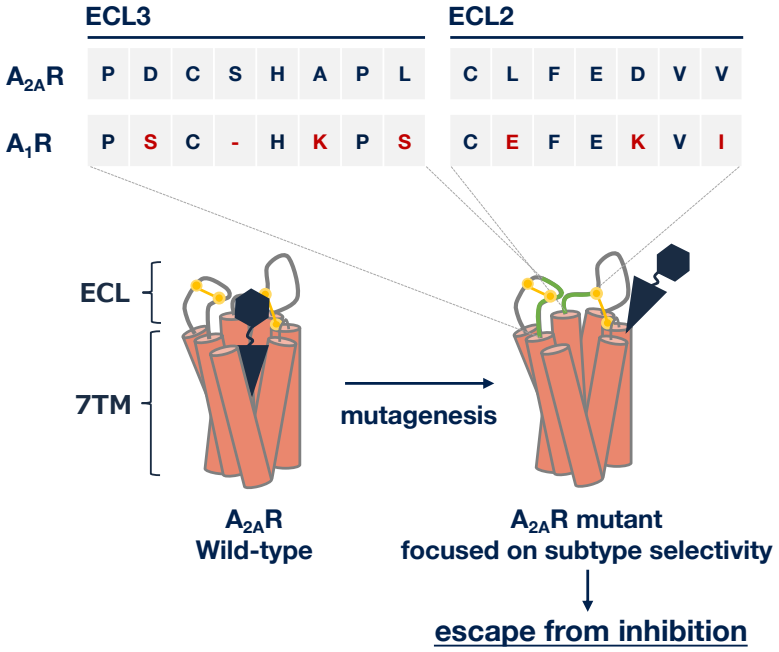


Fig. Outline of chemogenetic regulation of $A_{2A}R$ focused on subtype selectivity

ベンゾフェノンを活用した標的タンパク質へのDNA光標識手法の開発と応用

○日高綾太[1]・森大[2]・西原達哉[1]・田邉一仁[1]（[1]青学大院理工、[2]慶大先端研）

DNA Labeling to Target Protein by Photoreaction of Benzophenone and Its Application (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University[1], Institute for Advanced Bioscience, Keio University[2]) HIDAKA, Ryota[1]; MORI, Masaru[2]; NISHIHARA, Tastuya[1]; TANABE, Kazuhito[1]

タンパク質は酵素や抗体に代表されるように様々な機能を有する生体材料である一方、DNAはDNA origamiなどで活用されるように高いプログラム性を有し、化学合成や化学修飾が容易といった特徴を持つ。近年、これら機能性分子であるタンパク質とDNAを複合化し、新たな機能を有した生体材料の開発が進められている。

現在、タンパク質とDNAを複合化する方法論の構築に向け、様々な研究が展開されているが、数ある手法の中で、光反応を利用したラベル化法は、反応制御が容易であることから、有力な手法として着目されている。この手法は、標的タンパク質に対するリガンドと光反応基を導入したDNAを用い、近接状態を作り出すことでラベル化を実現するものである。この光アフィニティーラベル化法は、非常に優れた方法であるものの、標的タンパク質のリガンドの利用を前提としているため、①標識可能なタンパク質が限定される　②光反応部位の最適化が必須　といった課題を抱えており、汎用性の改善が求められてきた。

以上を踏まえ、本研究では、簡便かつ汎用性の高い新規DNAラベル化法の構築を目指した。具体的には、タンパク質の等電点 (pI) を踏まえた光ラベル化法を設計した。本ラベル化法の概略を次に示す。まず、溶液中のpHをpI以下に調製することでタンパク質を正に帯電させる。続いて、負の電荷を帯びたDNAを添加し、両者を静電相互作用により近接させる。DNAには光反応基であるベンゾフェノンを導入しておき、光照射下で標的タンパク質とDNAを架橋し、タンパク質を標識する (Figure 1)。

本方法論を実証するために、標的タンパク質として牛血清アルブミン (BSA) を選択した。BSAのpI以下のpH条件でBSAとベンゾフェノン、及び蛍光色素FAMを備えたDNA (BP-DNA-FAM) と混合し、光 (365 nm) を照射した。SDS-PAGEを用いて反応を評価した結果、BSAのpI以下のpH条件でのみラベル化の進行を確認することができた 。さらに、ラベル化部位の解析のために、DNAラベル化BSAを消化し、ペプチド断片をLC-MS/MSを用いて解析を行った。その結果、BSA表面、及び、内部でのラベル化反応の進行が示唆され、合計8カ所6種類のアミノ酸が光架橋部位となり得ることを見出した 。

続いて、本研究の汎用性を示すためにレポーター酵素であるβ-ガラクトシダーゼ (β-gal) やIgG抗体に対しても本方法を適用したところ、同様にpI以下のpHでラベル化が達成された。また、得られたDNAラベル化タンパク質は、DNA二重鎖形成能とタンパク質機能をそれぞれ維持していることも確認できた。本発表ではこれらの詳細について報告する。

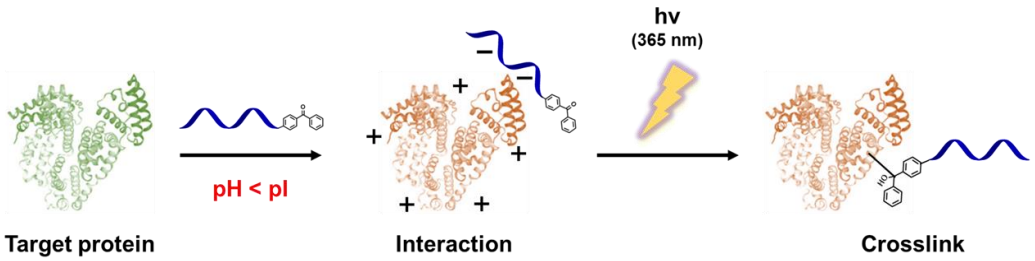


Figure 1. Schematic illustration of photo-induced DNA labeling to target protein.

微小炎症検出を目指した人工抗体の TRAP 提示法による創製

○松尾瑠星[1]・藤野公茂[1]・Jing-Jing Jiang[2]・村上正晃[2]・林剛介[1]・村上裕[1,3]

（[1]名大院工、[2]北大院医、[3]名大ナノライフ）

TRAP display selection of monobodies for the detection of microinflammation. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Medicine, Hokkaido University[2], Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University [3]) Matsuo, Ryusei[1]; Fujino, Tomoshige[1]; Jing-Jing, Jiang[2]; Murakami, Masaaki[2]; Hayashi, Gosuke[1]; Murakami, Hiroshi[1,3]

IL-6 アンプは、多発性硬化症のような免疫病や動脈硬化を起点とした脳血管障害や心血管障害、アルツハイマー病のような認知症などの炎症性疾患を増強する機構である[1]。このような炎症性疾患は血管周辺の微小炎症が拡大することによって発症する。そこで、個体内で IL-6 アンプを特定し微小炎症を検出できれば、疾患の早期治療が可能となると考えられている。

本研究では TRAP 提示法による人工抗体の選択法（図左）[2,3] を用い、IL-6 アンプ関連タンパク質であるマウス IL-6R、CTLA-4、PD-1 を標的としたモノボディ人工抗体の創製を行った。モノボディは抗体医薬品として用いられている IgG 抗体の 1/10 程度の大きさであり、組織浸潤性が高く、PET プローブにすることで高感度に微小炎症を検出することが期待される。まず、Biotin 化した標的と 10 兆種類以上からなる人工抗体/cDNA 複合体を混合した。このうち標的タンパク質に結合する人工抗体をストレプトアビジン磁気ビーズで釣り上げ、得られた人工抗体の cDNA を増幅し、さらに人工抗体/cDNA 複合体を翻訳合成した。この操作を繰り返すことにより標的に結合する人工抗体を濃縮した。得られた cDNA を次世代シーケンサーにより解析後、出現率の高いクローンを精製し、バイオレイヤー干渉法により解離定数の測定を行った。その結果、数 nM レベルの解離定数を持つ人工抗体が得られたことが分かった（図右）。

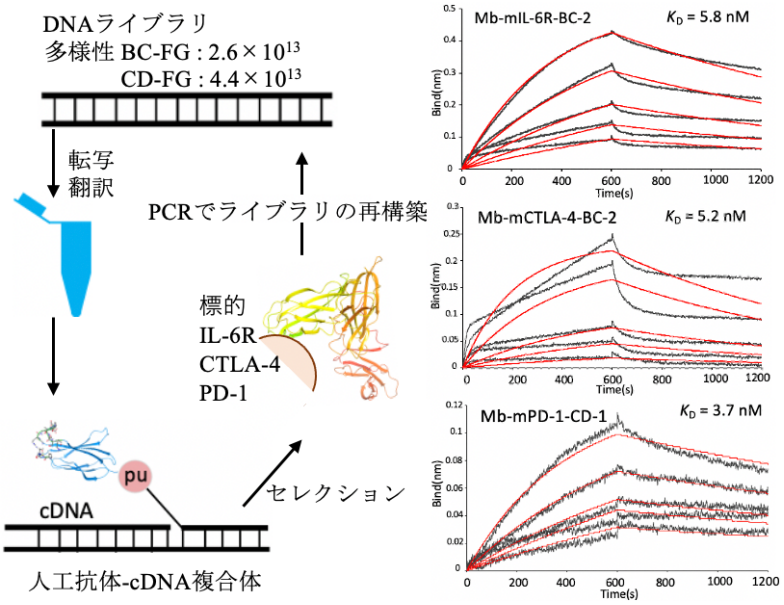


図 マウス IL-6R、CTLA-4、PD-1 に対するモノボディの TRAP 提示法による選択と解離定数

1. Ogura, H. et al., *Immunity*. 2008, 29, 628-636.
2. Ishizawa, T. et al., *J Am Chem Soc*. 2013, 135 (14), 5433-40.
3. Kondo, T. et al., *Sci Adv*. 2020, 6 (42), eabd3916.

AMPA 受容体のサブユニット選択的活性阻害を指向した新規ケモジェネティクス法の開発

○三浦裕太[1]・小島憲人[1,2]・浜地格[2]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]京大院工）

Novel Chemogenetics for Subunit-selective Inhibition of AMPA Receptor Activity. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University [2]) MIURA, Yuta[1]; OJIMA, Kento[1,2]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

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

このような背景の下、我々は受容体の構造変化に着目した新規ケモジェネティクス法「配位ケモジェネティクス」の開発を進めている。約 30 種存在するグルタミン酸受容体は、グルタミン酸の結合に伴いリガンド結合ドメインが開いた構造から閉じた構造へと変化し、活性化するという共通メカニズムを持つ(Fig. 1a)。我々はその構造変化を利用して、グルタミン酸受容体を人為的に活性化させることに成功した[2,3)]。具体的には、まずリガンド結合部位近傍の上下に配位性アミノ酸である His の変異導入を行う。そこに Pd(bpy)錯体を加えることで変異導入された His と配位結合を形成し、閉構造への変化を誘起して活性化させた(Fig. 1b)。

本研究では、配位ケモジェネティクスによって活性化させる先行研究とは異なり、Pd 錯体の配位子が比較的嵩高いことに着目した。狙った位置に導入した配位サイトへ錯体が配位結合する事で、構造変化に干渉して活性阻害するのではないかと構想した。まず AMPAR の活性化時に大きく構造変化する位置に His を近接するように 2 残基変異導入して配位サイトを作製した。そこに嵩高い錯体を配位させることで、閉構造への変化を妨げて受容体の活性を阻害する事に成功した(Fig. 1c)。本手法により、従来の方法で不可能だったサブユニット選択的な活性阻害の実現が期待される。

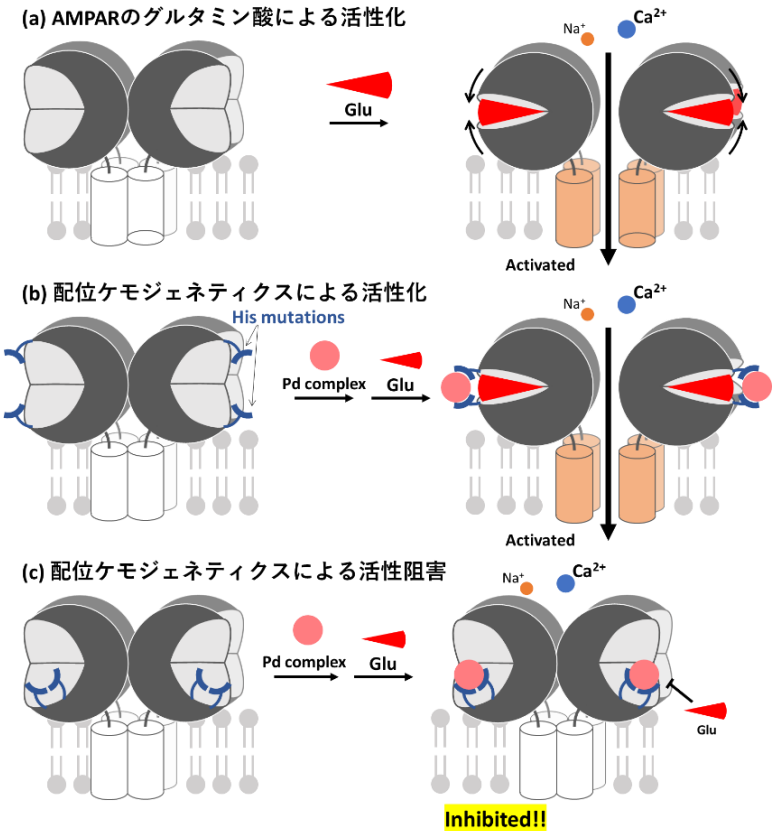


Fig. 1 (a) Glutamate-induced activation mechanism of AMPARs. (b) Coordination-based chemogenetic activation of AMPARs. (c) Coordination-based chemogenetic inhibition of AMPARs.

1) J. M. Henley *et al*, *Nat. Rev. Neurosci.* (2016)
2) S. Kiyonaka *et al*, *Nat. Chem.* (2016)
3) K. Ojima *et al*, *Nat. Commun.* (2022)

効率的なジスルフィド結合形成を用いたシトクロム b_{562} 多量体の調製

○栗原花怜・Julian Wong Soon・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Preparation of cytochrome b_{562} oligomers using efficient disulfide bond formation (Graduate School of Engineering, Osaka University) KURIHARA, Karen; WONG SOON, Julian; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

生体内のタンパク質の中には、集合体を形成し、多様な生体機能を示すものがある。近年、高機能バイオマテリアルへの応用を目指し、タンパク質を望みの構造に集合化する手法の開発が盛んに行われている[1]。特に 2 つのチオールが連結したジスルフィド結合は、その安定性と可逆性を両立する特性から、タンパク質間相互作用形成に有用である。しかし、タンパク質間におけるジスルフィド結合形成は一般的に時間を要し、反応がランダムに進行するため、目的とする複合体形成の制御が困難である課題を有する。効率的な形成と制御を達成するには結晶等の特殊な反応環境を必要とするが、適応可能なタンパク質は限定的である[2]。

そこで本研究では、ピリジルスルフィドとシステイン間のジスルフィド結合形成と活性なチオールにおけるジスルフィド交換反応に着目し、効率的なタンパク質間ジスルフィド結合形成法の確立を試みた。ピリジルジスルフィド(PyS)基は求核性官能基であるチオール(SH)基と速やかに反応し、ジスルフィド結合を形成する。これらの官能基をそれぞれタンパク質表面に導入し、反応させることにより、チオール基間での酸化を介したジスルフィド結合の形成が進行する前に、2 種類のタンパク質間で選択的にジスルフィド結合を形成して集合化することを想定した（Fig. 1）。素材となるタンパク質として、単純な構造でヘム（補因子 : 鉄ポルフィリン）の吸収強度により簡便に定量可能なタンパク質であるシトクロム b_{562} (Cyt)を用い、変異導入箇所として Glu49 および Asn80 を選択した（Fig. 2）。

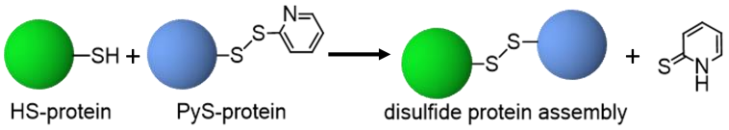


Fig. 1. Disulfide protein assembly via the reaction with 2,2'-dipyridyldisulfide.

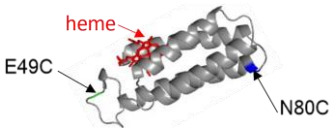


Fig. 2. Structure of cytochrome b_{562}.

大腸菌発現系により、Glu49 または Asn80 をシステインに変異した 3 種類の Cyt 変異体（single mutant: E49C, N80C、double mutant: E49C/N80C）を調製した。各変異体を 2,2'-ジピリジルジスルフィドと反応させると、ピリジルスルフィドが結合した Cyt 変異体（PyS-Cyt、具体的な変異体を示す場合、PyS-N80C 等と省略する）が得られたことを質量分析により確認した。PyS-N80C と E49C を反応させると、ジスルフィド二量体（N80C—E49C）が定量的に形成することが電気泳動と液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS)から示された。また、$(PyS)_2$-E49C/N80C と N80C を反応させると、目的の配列を有するジスルフィド三量体 (N80C—(E49C/N80C)—N80C)が選択的に得られることが同様に確認された。さらに、$(PyS)_2$-E49C/N80C と E49C/N80C を反応させると、多量体が形成することを電気泳動により確認した（Fig. 3）。

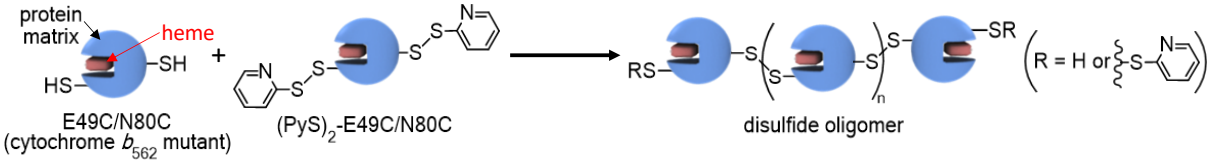


Fig. 3. Disulfide oligomer of cytochrome b_{562} via the disulfide exchange reaction.

1) J. Liu *et al. Chem. Rev.* **2016**, *116*, 13571.　2) T. Ueno, *et al. Chem. Sci.* **2019**, *10*, 1046.

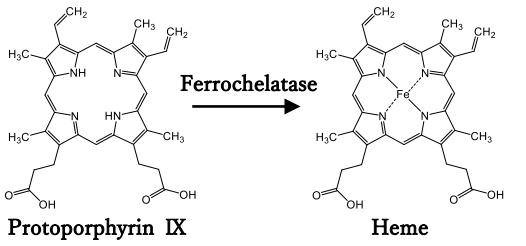
©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

鉄付加酵素 Ferrochelatase 共発現によるシトクロム P450 へのヘム導入効率の向上

○赤川絵理・澤田真希・養王田正文・中村暢文（東京農工大院工）

Improving the efficiency of heme incorporation into recombinant cytochrome P450 by co-expression of ferrochelatase (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology) AKAGAWA, Eri; SAWADA, Maki; YOHDA, Masafumi; NAKAMURA, Nobuhumi

シトクロム P450(P450)は不活性な炭化水素部位へのモノオキシゲナーゼ反応を触媒するヘムタンパク質である。好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来 P450 (P450st)は、高い熱安定性と広範囲な pH 耐性を有する。また高価な NADH を必要としない、過酸化水素を用いた簡便な触媒反応が可能なことから、工業的な利用が期待できる。P450 はその活性中心に鉄が導入されたポルフィリン(ヘム)を持つ。これまでの我々の研究において、大腸菌を用いて P450st を発現・精製する際に、ヘム前駆体のプロトポルフィリンIX (PPIX)を有する P450st が生成してしまうことが課題であった。ヘムを持つ P450st は 500～600 nm 付近の吸収波長領域のピークが 2 つに分裂している(Q2)一方で、PPIXを有する P450st は 500～600 nm の吸収波長領域のピークが 4 つに分裂している(Q4)。Q4 は触媒活性が無く、Q2 と比較して熱安定性も低い。大腸菌でヘムタンパク質を発現させると適切にヘムの取り込みが行われないことは他のヘムタンパク質でも問題となっており、ヘム合成過程において PPIXに鉄を付加させる酵素 Ferrochelatase (FC) (Scheme 1)をヘムタンパク質と共発現することでヘムの取り込みを改善する方法が報告されている[1]。当研究室では、FC を P450st と共発現することで Q2 の発現を向上させることを目的として、P450st の発現・精製を行い、これまで定量的に議論されてこなかった Q2 と Q4 の収量の観点から共発現の有効性を評価した。



Scheme 1 The final step in heme biosynthesis catalyzed by ferrochelatase.

His-tag を付加した P450st 及び FC をコードした pETDuet-P450st-FC、そして比較対象として His-tag を付加した P450st のみをコードしたベクター pET-23d-P450st を用いてそれぞれ大腸菌 BL21(DE3)を形質転換・培養した。培地には抗生物質として 100 mg/L アンピシリンを加えた。また、IPTG 誘導時には大腸菌におけるヘム合成の出発物質である 5-アミノレブリン酸を 0.5 mM/L となるように添加した。P450st は熱処理、His-tag 精製、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。精製過程の試料を SDS-PAGE で確認したところ、菌体破砕後の上清及び熱処理後の沈殿に FC (35 kDa)と考えられるバンドが見られ、FC が発現し熱処理によって除去されたことが確認された。FC を共発現した場合、しなかった場合それぞれ 3 回培養・精製を行った。Fig. 1 に得られた Q2 及び Q4 のスペクトルを示す。FC を共発現した場合には Q4 は生成しなかった。FC の共発現により、ヘムのみが導入された P450st のみが得られることが明らかになった。

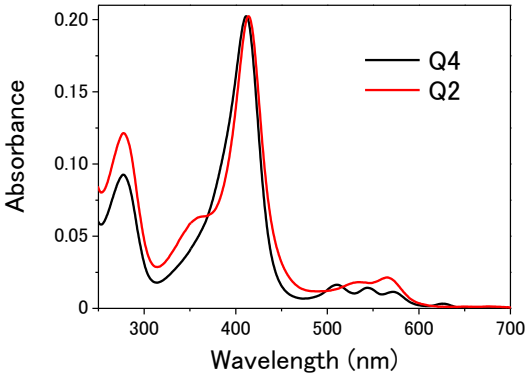


Fig. 1 UV-vis spectra of Q2 and Q4.

1) J. Sudhamsu, M. Kabir, M. V. Airola, B. A. Patel, S. R. Yeh, D. L. Rousseau, B. R. Crane, *Protein Exp. Purif.*, **73**, 78-82(2010).

生体直行反応を用いた架橋性高分子からなる不織布の作製と機能評価

（名工大院工） ○石黒泰良・水野稔久*

〈緒言〉これまで当研究室では、蛋白質や機能性核酸などの生体高分子を不織布繊維内部に内包固定化する手法の検討を検討してきており、紡糸途中に架橋反応が進行する後架橋可能な水溶性高分子を利用する SCES （In ***S***itu ***C***rosslinking during ***E***lectro***S***pinning）法（**Fig. 1**）を確立することで、これらの変性を抑えた繊維内部への内包固定化に成功している。現在までに、有機-無機ハイブリッドゲルを形成するγ-PGA/GPTMS[1]、アクリルアミド(AM)と、側鎖にケト基を持つジアセトンアクリルアミド(DAAM)からなる poly(AM/DAAM)を二官能性架橋剤であるアジピン酸ジヒドラジド(ADH)でヒドラゾン結合を介して架橋することで得られる水和ゲル poly(AM/ DAAM)/ADH[2]、同様にケト基を側鎖に持つメタクリルアミド系高分子 poly(HPMA/DAMA)と ADH の架橋により得られる水和ゲル poly(HPMA/DAMA)/ADH[3]などを、蛋白質の内包固定化が可能な不織布作成の部材として検討を進めてきた。しかし使用する pH によっては架橋反応が切断し利用が難しい、内包する蛋白質量を大きく増やした場合に不織布作製が難しくなるなどの問題点があった。そこで本研究では新たに SCES 法が適応可能な後架橋高分子と架橋剤のペアとして、アジドとアルキン間のヒュスゲン環化反応を用いた生体直行反応により架橋が可能な poly(HPMA/AzMA)と二官能性架橋剤 Bis-propargyl-PEG1 (BP-1)を用いた、不織布作製の検討を行った。

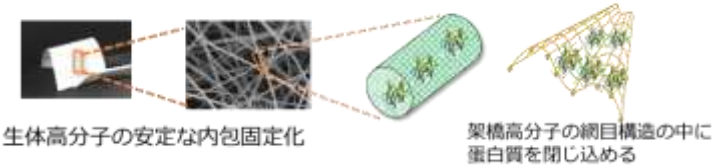


Fig. 1 Novel method to construct the protein encapsulated fibermats via SCES method.

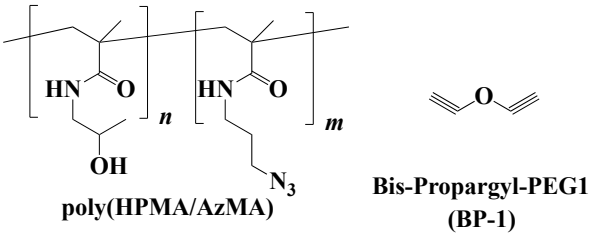


Fig. 2 Chemical structure of poly(HPMA/AzMA) and bifunctional crosslinker, Bis-propargyl-PEG1 (BP-1).

〈実験・結果〉HPMA、AzMA などのモノマー合成は先行研究に倣って行い、さらに架橋点となるアジド基を 15%程度含む Poly(HPMA/AzMA)の合成は仕込み比 HPMA/AzMA = 8:2、AIBN を開始剤に用いたフリーラジカル重合にて行った。^{1}H-NMR、GPC 分析により合成された Poly(HPMA/AzMA)中の HPMA と DAMA のユニット比は 17:3 であり、M_n、PDI は 28 kDa、3.39 であることが分かった。Poly(HPMA/AzMA)に対する架橋剤として、BP1 を選択し、20 wt% poly(HPMA/AzMA)の Tris 緩衝溶液（100 mM, pH 7）に BP-1（ケト基に対して 1/2 当量）、Cu(II)SO_4、アスコルビン酸を添加した溶液を前駆体溶液として電界紡糸することにより、不織布の作製に成功した。詳細なナノ構造や酵素内包挙動などについては、当日発表を行う。

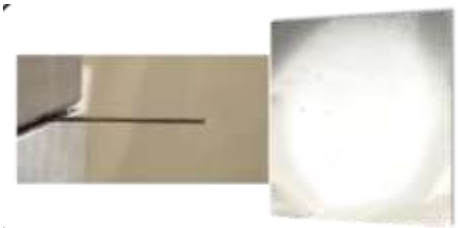


Fig. 3 Electrospinning of the precursor solution (left) and the obtained fibermat of poly(HPMA/AzMA) and BP-1.

[1] S. Koeda & K. Ichiki & T. Mizuno, *Langmuir* 32, 221-229 (2016); [2] Y. Ido & T. Mizuno, *Polymer* **132**, 342-352 (2017); [3] 加藤柚奈、水野稔久「乳酸脱水素酵素を固定化した酵素内包コアシェル不織布の開発」第 71 回高分子学会年次大会

Construction of the enzyme-encapsulated fibermats, using the post-crosslinkable hydrophilic polymers

Taira Ishiguro, Toshihisa Mizuno* (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya Aichi 466-8555, Japan)
Tel: 052-735-5641, Fax: 052-735-5237, E-mail: t.ishiguro.415@stn.nitech.ac.jp

原子間力顕微鏡を用いたネスチンテール領域の引張特性

○徳岡里奈 1・内田幸希 1・山岸彩奈 1,2・竹下大二郎 3・吉川千晶 4・山崎智彦 4・上田太郎 5・中村史 1,2（1 農工大院工、2 産総研細胞分子工学、3 産総研バイオメディカル、4 物材研機能性材料、5 早大院先進理工）

Tensile characteristics of nestin tail domain by AFM (Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.[1], Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST[2], Biomed. Res. Inst., AIST[3], Res. Cent. Funct. Mater., NIMS[4], Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.[5]) TOKUOKA, Rina[1]; UCHIDA, Koki[1]; YAMAGISHI, Ayana[1,2]; TAKESHITA, Daijiro[3]; YOSHIKAWA, Chiaki[4]; YAMAZAKI, Tomohiko[4]; UYEDA, Q.P. Taro[5]; NAKAMURA, Chikashi[1,2]

細胞内部では、アクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメント(IF)が相互に結合し、3 次元的なネットワーク構造を形成することで、細胞形態の維持に重要な役割を担っている。このうち IF は、N 末端側からヘッド、ロッド、テールの 3 領域から成るタンパク質で構成されており、細胞の弾性維持に寄与している。また IF は細胞骨格としての役割だけでなく、様々なタンパク質が結合する足場としても機能している。IF の一種であるネスチンは、高転移性のがん細胞に高発現であることが報告されている。ネスチンは 170 kDa もの巨大なテール領域がその大きな特徴であり、転写関連因子が結合することも報告されているが、その詳細な機能は不明であった。これまでの我々の研究から、ネスチンはテール領域の C 末端側でアクチンに結合することが示唆されている。このことから、巨大なネスチンテール領域が可逆的に伸展・収縮する特性を持つと推察し、この構造変化によってテール領域に結合した転写関連因子が解離し、核移行することで下流の遺伝子発現が調節されているのではないかと考えた。そこで本研究では、原子間力顕微鏡(AFM)のカンチレバーにネスチンテール領域の N 末端側を修飾し、C 末端側のアクチン結合部位を基板上のアクチン繊維に結合させ、引張試験を行うことで、同テール領域が伸展可能な構造を取るのか、その機械的特性を調査することを目的とした。

ガラス基板を APTES で修飾し、グルタルアルデヒドを介してアクチン繊維を固定化した。一方 AFM 探針(バネ定数 0.04 N/m)は NTA-アミンで修飾し、N 末端に His-tag を付加したネスチンテール領域を Ni-NTA 経由で固定化した。基板上のアクチン繊維にネスチンテール固定化探針を接触させ、基板から引き離す際のフォースカーブを解析した結果、アクチン繊維が固定化された箇所で特異的にタンパク質の伸展を示す特徴的なフォースカーブが得られた。このフォースカーブを Worm-like chain model でフィッティングし高分子鎖の長さを表す経路長 を算出した結果、約 0.45 μm であり、ネスチンテール領域の最大伸展長の約 8 割に達することが分かった。さらに、算出された持続長は 84 pm であり、過去に報告されている他のタンパク質の持続長と比較しても短いことから、ネスチンテール領域は非常に柔らかい分子であることが示唆された。以上より、ネスチンはテール領域の C 末端側でアクチンと結合し、ネスチンテールーアクチン間の結合より弱い力で大きく伸展することが示唆された。また、現在ネスチンに結合する転写関連因子として Clic1 に着目しており、ネスチンーClic1 の結合を抗体修飾ナノニードルで評価した結果についてもあわせて報告する。

環境調和を志向したブロモラクトン合成酵素の開発

○松浦拓哉・知名秀泰・中村卓・向井秀仁（長浜バイオ大院バイオサイエンス）

Development of eco-friendly bromolactone synthase (Laboratory of Peptide Science, Graduate School of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology) MATSUURA Takuya; CHINA Hideyasu; NAKAMURA Takashi; MUKAI Hidehito

不飽和カルボン酸のハロラクトン化反応は、環構造形成と共に更なる誘導化に有用なハロゲン原子を導入することから、様々なラクトン類の精密合成に用いられている。犠牲試薬として化学量論量のハロゲン化試薬を用いる有機化学的手法では反応後に環境負荷要因となり得る廃棄物を与えるが、環境中にありふれた無機ハロゲン化物塩とグリーン酸化剤の過酸化水素を用いる酵素化学的手法は反応後の廃棄物を最小限に留める。しかし、環境調和に優れた後者を利用するためには、有機溶媒安定性に優れた合成用酵素が求められる。近年、バナジウム依存型ブロモペルオキシダーゼを用いた酵素学的ハロラクトン化反応の例が限定的に報告されているが、酵素内で発生した低分子活性種の次亜ハロゲン酸と不飽和カルボン酸の反応が非酵素学的経路を経るため、反応選択性に本質的な課題が残った[1,2]。このような中、我々は上記のタイプとは異なるカルボン酸依存型ブロモペルオキシダーゼ（C-BPO）において有機溶媒中で利用可能な BPO-A1 を見出しており[3]、基質が活性中心に結合する触媒様式をとる本酵素では、特に反応選択性の改善が期待された。また、*Streptomyces aureofaciens* 由来の本酵素は比較的高い有機溶媒安定性を有しているが、基質汎用性の拡大には更なる酵素安定性が求められる。

本研究では、BPO-A1 のブロモラクトン化反応の検討と極性アミノ酸オリゴペプチド付与による有機溶媒安定性の改良を試みた。前者においては、複数の C-BPO の反応選択性を比較した結果、*exo*/*endo* 比から BPO-A1 の *exo* 環化選択性が最も高いことが明らかになり、また BPO-A1 は複数の不飽和カルボン酸に基質汎用性を示した (Fig 1A)。一方、後者においては、酵素活性に影響を及ぼさない BPO-A1 の C 末端に各種極性アミノ酸オリゴペプチドを付与した結果、塩基性アミノ酸ポリペプチド類（His_8、Lys_8、Arg_8）が BPO-A1 の有機溶媒安定性を高めることが示唆された (Fig 1B)。

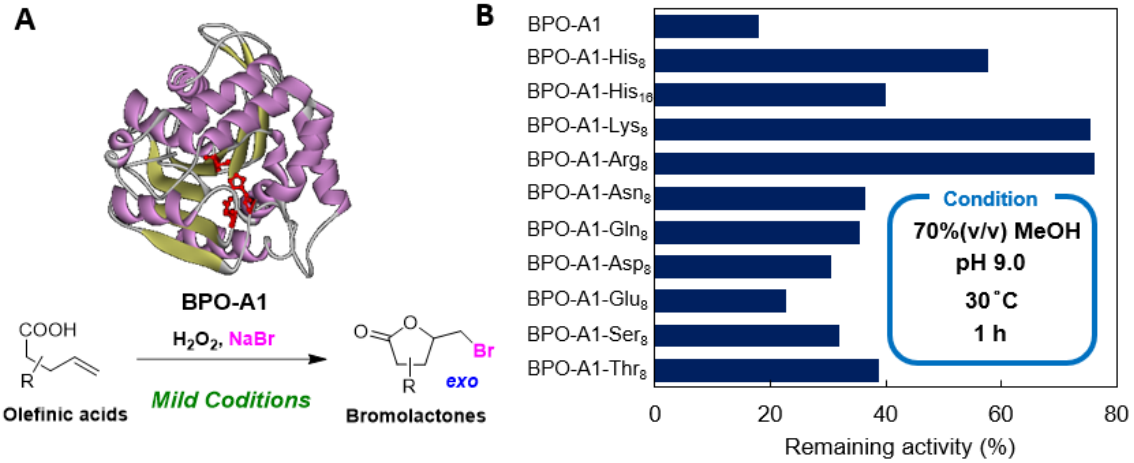


Fig 1. (A) Bromolactonization of olefinic acids using carboxylate-dependent bromoperoxidase BPO-A1 from *Streptomyces aureofaciens*. (B) Organic solvent stability of BPO-A1 with oligopeptides at its C-terminus against 70%(v/v) MeOH.

1) F. Hollmann *et.al.*, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **8**, 2602 (2020).
2) F. Hollmann *et.al.*, *ChemSusChem* **13**, 97 (2020)
3) H. China, H. Ogino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **516**, 327 (2019).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Poster Short Talk

Sun. Sep 11, 2022 11:50 AM - 12:20 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 2:50 AM - 3:20 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Short talks free discussions (P80-P99)

11:50 AM - 12:20 PM JST | 2:50 AM - 3:20 AM UTC

Short talks free discussions

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 1:20 PM - 2:20 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Shohei Uchinomiya (Graduate School of pharmaceutical Sciences, Kyushu University)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[2B-07] Construction of microtubule superstructures by Tau-derived peptide-fused proteins

*Hiroshi Inaba[1], Yurina Sueki[1], Muneyoshi Ichikawa[2], Arif Md. Rashedul Kabir[3], Takashi Iwasaki[4], Akira Kakugo[3], Kazuki Sada[3], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 3. Graduate School of Science, Hokkaido University, 4. Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[2B-08] Development of global single-molecule enzyme activity analysis platform for the identification of activity-based biomarkers in blood samples

*Toru Komatsu[1], Shingo Sakamoto[1], Tadahaya Mizuno[1], Rikiya Watanabe[2], Tohru Koike[3], Kazufumi Honda[4], Yasuteru Urano[1,5] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 2. Riken, 3. Graduate Shool of Biomedical and Health Sciences, Horishima University, 4. Nippon Medical School, 5. Graduate School of Medicine, The University of Tokyo)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[2B-09] Selection for biparatopic antibodies through optimized intein-mediated protein trans-splicing

*Hiroki Akiba[1,2], Satoshi Nagata[2], Tomoko Ise[2], Haruhiko Kamada[1,2], Hiroaki Ohno[1,2], Kouhei Tsumoto[2,3] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, 3. School of Engineering, The University of Tokyo)

Tau 由来ペプチド融合タンパク質による微小管超構造体の創製

○稲葉央[1]・末岐優里菜[1]・市川宗厳[2]・Arif Md. Rashedul Kabir[3]・岩崎崇[4]・角五彰[3]・佐田和己[3]・松浦和則[1]（[1]鳥取大院工・[2]奈良先端大院・[3]北大院理・[4]鳥取大院農）

Construction of microtubule superstructures by Tau-derived peptide-fused proteins (Graduate School of Engineering, Tottori University[1], Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology[2], Graduate School of Science, Hokkaido University[3], Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University[4]) INABA, Hiroshi[1]; SUEKI, Yurina[1]; ICHIKAWA, Muneyoshi[2]; KABIR, Arif Md. Rashedul[3]; IWASAKI, Takashi[4]; KAKUGO, Akira[3]; SADA, Kazuki[3]; MATSUURA, Kazunori[1]

細胞骨格の一種である微小管はチューブリンからなる中空の構造体であり、*in vitro* では一巻きからなるシングレット構造を形成する。一方、生体内では微小管が横方向に連なったダブレットや、分岐、アスター（放射状集合）などの複雑な超構造体が存在し、異なる機能を発揮している[1]。これらの微小管超構造体を人工的に構築できれば、その生物学的理解と応用に繋がるものの、外来分子による構築例はなかった。近年微小管の内部および外部へのタンパク質の結合がダブレット微小管の形成に重要であると推定されており、タンパク質の結合を制御することで微小管超構造体の形成を誘起できると考えられる。我々は微小管内部に結合する有用なモチーフとして Tau 由来ペプチド（TP）を開発し、緑色蛍光タンパク質などのナノ構造体を微小管に内包することに成功している[2]。

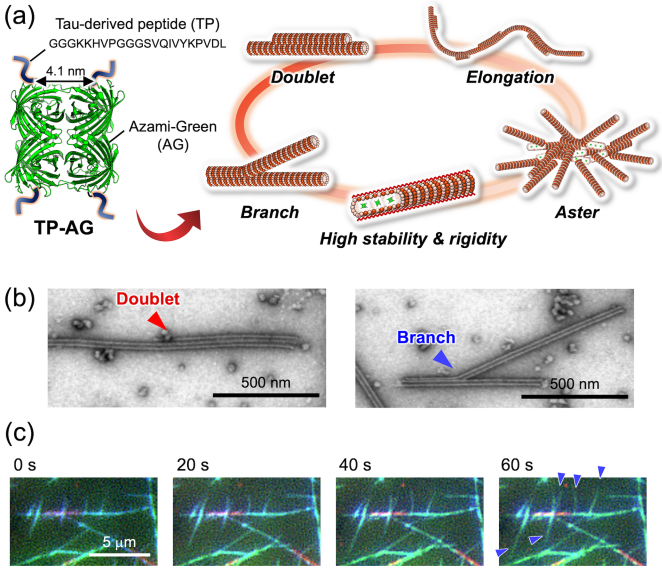


Fig. 1. (a) Construction of microtubule superstructures by Tau-derived peptide-conjugated Azami-Green (TP-AG). (b) Negative-stain EM images of TP-AG-induced doublet and branched microtubules. (c) Growth of branched microtubules observed by TIRFM.

本研究では、四量体を形成して蛍光を生じるタンパク質 Azami-Green（AG）の各サブユニットの C 末端に TP を連結した TP-AG を用いた微小管超構造体の構築を行なった（Fig. 1a）[3]。微小管外部に TP-AG が結合することで表面に TP が露出し、新たなチューブリンが結合、集積することで微小管超構造体の形成が期待できる。TP-AG をチューブリンと複合化後に GTP アナログにより微小管を形成する方法（"Before" method）および微小管を形成した後に TP-AG を複合化する方法（"After" method）を用いたところ、TP-AG は"Before" method では微小管内部に、"After" method では微小管外部に主に結合することが共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察により明らかとなった。微小管外部への結合は N 末端に導入した His-tag が関与していると考えられる。TP-AG 複合化微小管を Negative-stain EM および cryo-EM により解析したところ、ダブレット構造や分岐構造などの多様な構造が観察された（図 1b）。特に"After" method でその割合が多いことから、微小管外部への TP-AG の結合が重要であるといえる。また、全反射照明蛍光顕微鏡（TIRFM）観察により、分岐構造の成長過程を追跡することに成功した（Fig. 1c）。さらに、TP-AG の当量などを変えることで運動性を有するアスター構造や極めて長い微小管の形成を確認し、**一種類の外来タンパク質で多様な微小管超構造体を創製することにはじめて成功した**。

1) C. Janke, M. M. Magiera, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2020**, *21*, 307. 2) H. Inaba, K. Matsuura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2021**, *94*, 2100. 3) H. Inaba[1], Y. Sueki[1], M. Ichikawa[1], A. M. R. Kabir, T. Iwasaki, H. Shigematsu, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *bioRxiv*, **2022**, DOI: https://doi.org/10.1101/2022.01.27.476107 ([1]Equal contribution).

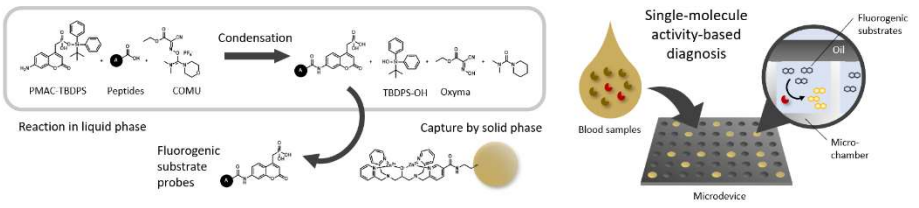
©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Synthesis based on affinity separation 法を用いた１分子酵素活性網羅的解析基盤の構築と応用

○小松徹[1]・坂本眞伍[1]・水野忠快[1]・渡邉力也[2]・小池透[3]・本田一文[4]・浦野泰照[1,5]（[1]東大院薬、[2]理研、[3]広大院医（薬）、[3]日本医大、[4]東大院医）

Development of global single-molecule enzyme activity analysis platform for the identification of activity-based biomarkers in blood samples (Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. Tokyo[1], Riken[2], Grad. Sch. Biomed. Health Sci., Hiroshima Univ.[3], Nippon Medical School[4], Grad. Sch. Med. Sci., Univ. Tokyo[5]) KOMATSU, Toru[1]; SAKAMOTO, Shingo[1]; MIZUNO, Tadahaya[1]; WATANABE, Rikiya[2]; KOIKE, Tohru[3], HONDA, Kazufumi[4]; URANO, Yasuteru[1,5]

血液中における種々の酵素活性の異常を解析することは，疾患の理解や発見に重要な役割を果たすことが期待される．一方で，血液中に存在する微量（1 ng/mL 以下）のタンパク質の機能を精度よく検出する技術は十分な開発が進められておらず，既存の活性検出系で十分な感度，精度をもって活性計測をおこなうことが困難な酵素も数多く存在する．演者らは，マイクロデバイスを用いて１分子レベルの超高感度の酵素活性を検出する１分子酵素活性計測技術を用いて血液中に存在する酵素活性を網羅的に解析する技術の開発を進めてきた（S. Sakamoto et al. *Science Adv.* **2020**）．本手法は，酵素が入った生体サンプルを希釈して，10 fL オーダーの反応容器が 10^6-10^7 個並列したマイクロデバイスにロードすることにより，確率的に 0～1 分子の対象酵素が各反応容器に含まれる状態を構築し，その活性を蛍光プローブの蛍光シグナルの増大によって検出することによっておこなわれる．マイクロデバイスや反応容器の封入に用いられるオイルに対する溶出や吸着を防ぐために，蛍光プローブ分子が高い親水性を有することが求められ，血液中の１分子レベルの酵素活性を高い網羅性をもって解析するためには，このような特性を有する蛍光プローブを網羅的に開発する基盤技術の開発が求められていた．



本研究では，コンビナトリアル合成法の一種である synthesis based on affinity separation（SAS）法を用いた１分子酵素活性検出用蛍光プローブライブラリの構築と，これを用いた早期膵臓がん検出用の血中バイオマーカーの探索をおこなった．ライブラリ構築にあたっては，原料にアフィニティー精製用の官能基を結合させておき，液相で化学反応を実施し，固相を用いて抽出をおこなう SAS 法を用いることで，多様な蛍光プローブ分子を規格化したプロトコルを用いて合成／精製する仕組みの確立を目指した．水溶性官能基であるホスホン酸部位を結合させた蛍光プローブ母核を開発し，ホスホン酸と高い親和性を有する Phos-tag を用いて精製をおこなうことで，液相でのプローブ化反応後，Phos-tag agarose によって目的のプローブを系中から精製するプロトコルを確立し，半自動合成法をもって 100 種類以上の蛍光プローブを合成し，これらを用いた血液中の酵素の１分子活性の網羅的計測をおこなった．その結果，膵臓がん患者の血漿中の elastase，dipeptidyl peptidase 4 の１分子酵素活性レベルの異常を見出し，早期膵臓がんの検出に資する血液中１分子酵素活性マーカーとしての可能性を示すことに成功した．

本プローブ合成法は高い応用性を有し，血液中の１分子酵素活性の網羅的解析による疾患診断法の確立に向けた重要な基盤技術を与えるものになると期待される．

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Intein-mediated protein trans-splicing の最適化による バイパラトピック抗体セレクション

○秋葉宏樹[1,2]・永田諭志[2]・伊勢知子[2]・鎌田春彦[1,2]・大野浩章[1,2]・津本浩平[2,3]
（[1]京大院薬、[2]医薬健栄研、[3]東大院工）

Selection for biparatopic antibodies through optimized intein-mediated protein trans-splicing (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University[1], National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition[2], School of Engineering, The University of Tokyo[3]) AKIBA, Hiroki[1]; NAGATA, Satoshi[2]; ISE, Tomoko[2]; KAMADA, Haruhiko[1,2]; OHNO, Hiroaki[1,2]; TSUMOTO, Kouhei[2,3]

IgG 型抗体は、高い安定性と良好な薬物動態から、医薬品として有用である。IgG 型抗体の構造をもつ二重特異性抗体は、Factor VIIIa を代替する Emicizumab、VEGF・Ang-2 阻害剤である Faricimab がすでに臨床の現場で活躍し、さらなる発展が期待される。我々は二重特異性抗体の中でも、同一標的分子の異なる 2 つのエピトープに結合するバイパラトピック抗体（BpAb）に着目している。BpAb と標的分子との複合体は通常型抗体の場合と当量比が異なるため、多様な生物学的な活性を導くことが期待される（図 1）。一方でこの特性により、BpAb の選別には臨床で用いる構造に近い形でのセレクションが望ましい。多数の抗体可変領域群から最小限数の培養ロットでのセレクションをする場合には発現後の混合による翻訳後二重特異性化が有用であるが（図 2）、旧来の方法は副生成物の除去に条件検討が必要であり、BpAb の選別には不向きであった。

本研究では、この目的に intein-mediated protein trans-splicing（IMPTS）を利用した（図 3）。IMPTS を利用した IgG 型二重特異性抗体作製法は近年注目を集めているが、これまでに報告された方法[1,2]はいずれもヒンジ領域に触媒残基として余剰の Cys 残基を導入することで高効率な反応を試みており、これが非特異的なジスルフィド形成に携わることでの副生成物生成が懸念された。我々は天然型のヒンジ領域に含まれる Cys 残基を触媒残基として利用することで、この問題を解決しようと考えた。当初は取得効率が低かったものの、温度などの反応条件・精製プロセスを最適化することによって、十分な効率で目的分子が得られる条件を見出した[3]。従来報告された Cys 挿入型の設計[1,2]と比較しても同等の反応効率が達成されることが明らかとなった。

この方法は条件検討なく副生成物を除去することが可能であり、BpAb のセレクションに適している。そこで、制御性 T 細胞に発現しその活性化に寄与するといわれる TNFR2 の 5 つのエピトープに結合する抗体群から BpAb を網羅的に作製した。レポーター細胞を利用することで、これらの分子の中から優れたアゴニスト・アンタゴニストを見出すことに成功した。

References [1] Han, L. et al, *Methods* **154**, 32-37 (2019); [2] Hofmann, T. et al, *MAbs* **12**, 1731938 (2020); [3] Akiba, H. et al, *Sci. Rep.* **11**, 19411 (2021).

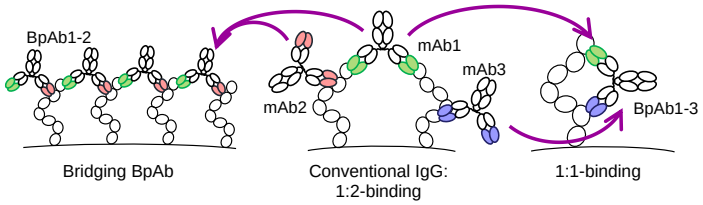


図1. バイパラトピック抗体が抗原となす複合体構造。

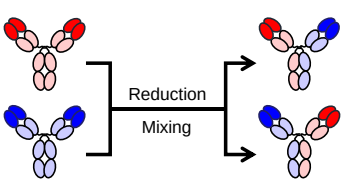


図2. 発現後混合による二重特異性抗体作製。

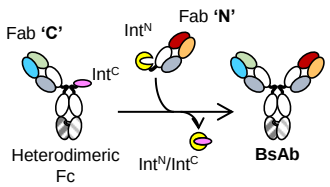


図3.蛋白質トランススプライシングを利用した二重特異性抗体作製法。

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 2:30 PM - 3:30 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 5:30 AM - 6:30 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Proteins, Enzymes

Chair: Takanobu Yasuda (Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[2B-10] Development of a Chitin-based Affinity Purification System for Mining of Bacterial Enzymes with a Novel Activity

*Shunsuke Kato[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[2B-11] Mechanosensing mechanism of cancer invasion-related channel Clic1

*Ayana Yamagishi[1,2], Akane Nagata[2], Nakamura Chikashi[1,2] (1. Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[2B-12] Protein Chemical Cleavage using Cysteine Formylation

*Naoki Zenmyo[1], Yuya Matsumoto[1], Akihiro Yasuda[1], Shohei Uchinomiya[1], Naoya Shindo[1], Kaori Tabata[1], Akio Ojida[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyushu University)

キチン粉末を利用したアフィニティー精製手法の開発：非天然化学反応を触媒する微生物酵素の探索への応用

○加藤俊介[1]・林高史[1]（[1]阪大院工）

Development of a Chitin-based Affinity Purification System for Mining of Bacterial Enzymes with a Novel Activity (Graduate School of Engineering, Osaka University[1]) Kato, Shunsuke[1]; Hayashi, Takashi[1]

生体触媒を用いた化学合成プロセスに注目が集まる昨今において、新規な触媒活性を示す酵素を高精度に探索するハイスループットスクリーニング（HTS）技術の開発が求められている。特に、精製された酵素サンプルを用いた HTS は、細胞夾雑物による影響を排斥し、より厳密な反応条件での酵素探索を可能にする点で有用である。しかし、タンパク質精製に要する労力やコストの観点から、従来のタンパク質精製手法を大規模な HTS へと応用することは難しく、より高効率で安価なタンパク質精製技術の開発が現在望まれている。そこで本研究では、天然多糖高分子であるキチン粉末を用いた Strep-tag II 融合タンパク質のアフィニティー精製技術を開発し、酵素探索へと応用したので報告する。

Strep-tag II は、8 残基のアミノ酸から構成されるアフィニティー精製用タグである。本研究では、Strep-tag II のクロマトグラフィー担体としてキチン粉末を利用するべく、*T. kodakarensis* KOD1 由来キチナーゼのキチン結合ドメイン [1] に対して、ストレプトアビジン変異体 [2] を連結した融合タンパク質 ChBD2-SAm1 を調製した（Figure 1a）。ChBD2-SAm1 の発現には、*B. choshinensis* HPD31-SP3 を用いた分泌発現システムを採用し、カラムに担持したキチン粉末に対して、(i) ChBD2-SAm1 を含む *B. choshinensis* 培養液の上澄みと、(ii) Strep-tag II 融合タンパク質を含む大腸菌溶菌液を、二段階でロードすることで、目的タンパク質の高効率な精製が実現した（Figure 1b）。また、本精製技術の更なる効率化をめざし、ChBD2-SAm1 と目的タンパク質の共発現系の確立にも着手した。ChBD2-SAm1 遺伝子をコードする共発現プラスミド pAR3b-SaC を調製し、大腸菌細胞内で目的の Strep-tag II 融合タンパク質と共発現させることで、キチン粉末を用いた一段階のアフィニティー精製が可能となった。

さらに本研究では、開発したアフィニティー精製技術の応用として、アルキンの分子内ヒドロアリール化反応を触媒する非ヘム鉄酵素の探索を実施した。種々の微生物ゲノムから 26 種類の非ヘム鉄酵素の遺伝子をクローニングし、Strep-tag II を N/C 末端に付加した組換え酵素のライブラリを構築した。そして、上記のアフィニティー精製技術を用いて反応スクリーニングを実施したところ、*G. thermoglucosidasius* 由来 N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase（*Gt*NagA）が、目的の分子内ヒドロアリール化反応に対して触媒活性を示すことが明らかとなった（Figure 1c）。一般的に、本反応には Pd や Au 等の後周期遷移金属触媒が広く利用される一方で、*Gt*NagA は二核鉄錯体を活性中心にもつことがアミノ酸配列から示唆されており、有機化学的にも大変興味深いスクリーニング結果となった。

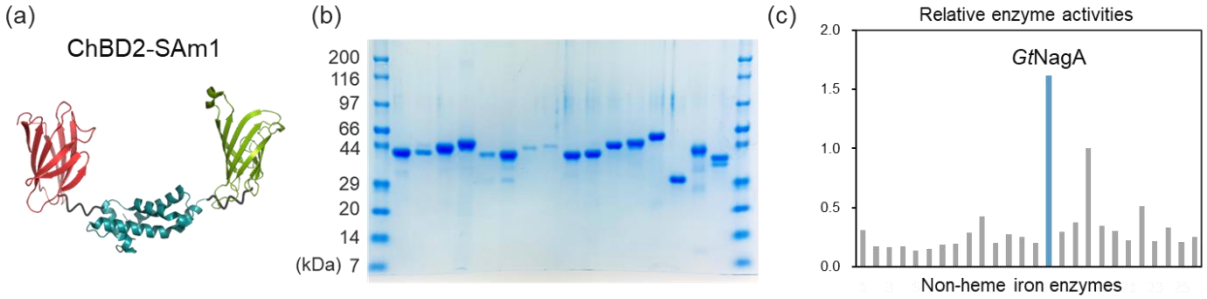


Figure 1. (a) Schematic illustration of ChBD2-SAm1. (b) SDS-PAGE analysis of purified proteins. (c) Relative activity of non-heme iron enzymes for intermolecular hydroarylation.

1) K. Miki *et al. FEBS Lett*. **2016**, *590*, 298-304.
2) A. Skerra *et al. Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1528-1535.

がん浸潤関連チャネル Clic1 の機械刺激受容メカニズムの解明

○山岸彩奈[1,2]・長田あかね[2]・中村史[1,2]（[1]産総研細胞分子工学、[2]農工大院工）

Mechanosensing mechanism of cancer invasion-related channel Clic1 (Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST[1], Grad. Sch. Eng., TUAT[2]) YAMAGISHI, Ayana[1]; NAGATA, Akane[2]; NAKAMURA, Chikashi[1, 2]

塩化物イオン(Cl^-)チャネルの一種である Clic1 は、低浸透圧刺激による細胞の膨張時に Cl^-を排出し、それに伴い水分子の排出が誘導されることで細胞容積が減少する細胞容積調節機能に関与する。また、Clic1 は高浸潤性のがん細胞株で高発現であり、Clic1 発現抑制により癌細胞の浸潤性が低下することも報告されていることから Clic1 はがん浸潤性に寄与すると考えられている。これらの報告において、がん浸潤における Clic1 の機能について詳細は述べられていないが、我々は次のような仮説を考えた。がん細胞の浸潤過程では細胞や組織の隙間を通過する際にがん細胞が圧縮されると考えられるが、この時細胞膜が伸展し Cl^-を排出することで容積を減少させ、浸潤を促進する機構があると推測した。実際に当研究室では、がん細胞に対して原子間力顕微鏡で外力を印加することで Cl^-が排出されることを見出している[1]。そこで本研究では、Clic1 の Cl^-排出ががんの浸潤・遊走に寄与するメカニズムを明らかにするために、まず Clic1 ノックアウト(CKO)株を樹立し、Cl^-排出能を評価した。また、Clic1 が細胞膜伸展によって開口するかどうかを明らかにするために、比表面積が異なる接着状態と模擬浮遊状態の細胞に原子間力顕微鏡(AFM)のカンチレバーを用いて外力を印加し、Cl^-排出能を評価した。

高浸潤性マウス乳がん細胞株を用いて、ゲノム編集により CKO 株を作製した。細胞の Cl^-排出能の評価には、Cl^-と相互作用することで蛍光強度が減少する細胞膜透過性の蛍光色素(MQAE)を使用した。MQAE 添加培地中で 1 時間インキュベートすることで同色素を細胞に導入し、PBS で洗浄後、AFM とフラットチップレスカンチレバーを用いて 10 分間外力印加を行った。MQAE 蛍光強度の経時変化から Cl^-排出能を評価した結果、機械的な外力印加により元株における細胞内 MQAE 蛍光強度が上昇したことから、Cl^-が排出されたことを確認した。一方で、CKO 株では外力印加 10 分後の蛍光強度が元株と比較して有意に低いことから、機械的な外力印加による Cl^-排出に Clic1 が関与することが示された。

次に、この Cl^-排出が細胞膜伸展によってチャネルが開口することで誘起されるかどうかを明らかにするために、接着状態の違いにより比表面積が異なる細胞に対して外力を印加したときの Cl^-排出能を評価した。通常の接着状態と比較して、浮遊状態の細胞は、比表面積が小さく伸展可能な膜面積が大きいため、チャネルの開口に必要な外力も大きくなると考えられる。そこで、浮遊状態の細胞を模擬するために細胞膜修飾剤(Biocompatible Anchor for cell Membrane; BAM)を使用した。BAM は細胞膜へのアンカーとして機能するオレイル基と PEG が直鎖上に連結した分子であり、これを用いて細胞を基板上に繋留した。実際に、接着または BAM 繋留状態の元株と CKO 株に対して外力を印加し、外力印加前を 1 とした場合の印加 10 分後の相対蛍光強度を比較したところ、接着細胞では 0.5 nN と 1 nN の間で、BAM 繋留細胞では 1 nN と 3 nN の間で Cl^-排出が誘起されることを確認した。以上の結果から、比表面積が小さく伸展可能な膜面積が大きい BAM 繋留細胞は、より大きな外力で細胞を圧入しないと細胞膜が伸展せず、Cl^-を排出しないと考えられ、Clic1 は細胞膜伸展により開口し Cl^-を排出することが示された。さらに、CKO 株の遊走性、浸潤性をそれぞれ創傷治癒アッセイ及びボイデンチャンバーアッセイにより評価した結果、どちらも元株と比較して有意に低下していた。一方で、CKO 株の細胞弾性率と細胞運動速度は元株と比較して変化は認められず、遊走性及び浸潤性の低下は Cl^-排出能が低下し、容積調節能が低下したためであると考えられた。

1. A. Yamagishi, *et al*., Anal. Chem. 93, 26, 9032–9035 (2021)

システインホルミル化によるタンパク質部位選択的な化学切断法の開発

○善明直輝・松本侑也・安田斉弘・内之宮祥平・進藤直哉・田畑香織・王子田彰夫（九大院薬）

Protein Chemical Cleavage using Cysteine Formylation (Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyushu University) ZENMYO, Naoki; MATSUMOTO, Yuya; YASUDA, Akihiro; UCHINOMUYA, Shohei; SHINDO, Naoya; TABATA, Kaori; OJIDA, Akio

タンパク質を低分子によって化学的に修飾する手法は、標的タンパク質の機能化・機能制御を可能とするためタンパク質研究において広く利用されている。一方で、化学的切断によってタンパク質の機能を制御する手法はほとんど報告されておらず、アミノ酸側鎖に切断可能な部位を発現導入する人工的な手法に限られていた。当研究室では、タンパク質配列の切断を誘起可能な新しい化学的手法の探索を行い、システイン（Cys）側鎖のチオール基に対して低分子による Cys ホルミル化を行うことでタンパク質のアミド主鎖が効率的に切断される新しい手法を見出した（Fig.1）。

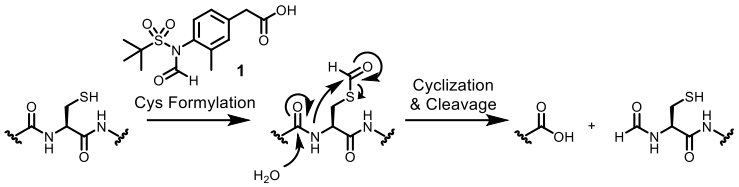


Fig 1. Plausible Mechanism of Cleavage peptide bond by Cys Formylation.

配列の切断により蛍光が回復するモデルペプチドを用いて S-ホルミル化・切断反応の配列選択性を評価した。Asp-Cys 配列および Asn-Cys 配列を有するペプチドでは、Cys ホルミル化後のアミノ酸側鎖からの求核攻撃によって迅速かつ完全に切断が進行することを明らかにした(Fig.2)。さらに、Cys ホルミル化分子の Cys 反応性のチューニングを目的として、ホルミル基周辺への置換基導入により構造を最適化した。これにより水中で安定かつCysホルミル化による非特異的な切断を抑制可能なCysホルミル化分子 **1** を見出した。

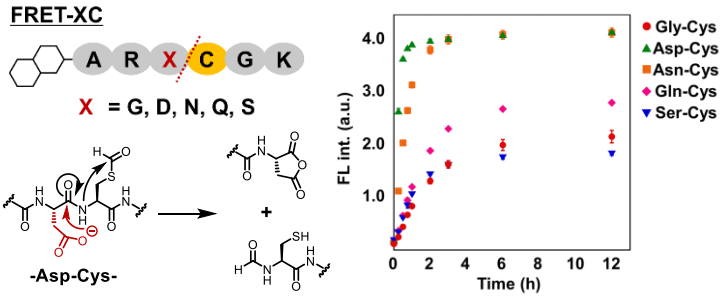


Fig 2. Sequence-selectivity of Cleavage reaction by Cys Formylation.

次に、Cys ホルミル化による切断法を精製タンパク質に適用した。Cys を 1 残基含むタンパク質に対して Cys ホルミル化分子を高濃度添加することによって、配列中の Cys の位置に対応する分子サイズの変動がゲル解析により確認された。また、反応性を最適化したCysホルミル化分子をタンパク質リガンドに導入したプローブ **2** を合成し、標的配列選択的なアフィニティー切断を行った。タンパク質-リガンド間相互作用時の近接効果によって切断部位の Cys ホルミル化が促進されることで、低濃度での効率的かつ部位選択的なタンパク質切断を達成した（Fig 3）。

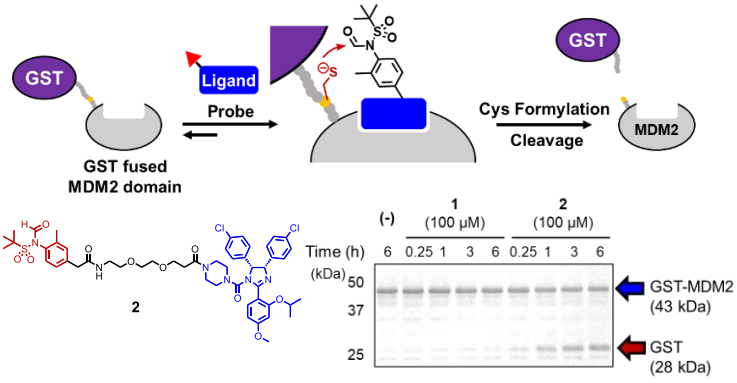


Fig 3. Ligand Directed Cleavage of Target Protein with Cys formylation probe.

本発表では、Cys ホルミル化を利用した細胞表層上での化学切断手法への応用についても検討したため報告する。

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 3:40 PM - 5:00 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 6:40 AM - 8:00 AM UTC | Venue B Sakata Hirata hall

Molecular recognition/Sugars, Lipids/DDS

Chair: Takahiro Muraoka (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[2B-13] Cell membrane permeability of co-assembled supramolecules constructed by complementary hydrogen bonds

*Rie Wakabayashi[1], Hiroki Obayashi[1], Noriho Kamiya[1,2], Masahiro Goto[1,2] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[2B-14] Development of fluorous channels and their transmembrane material transport properties

*Kohei Sato[1], Kazushi Kinbara[1,2] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Living Systems Materialogy Research Group, International Research Frontiers Initiative, Tokyo Institute of Technology)

4:20 PM - 4:40 PM JST | 7:20 AM - 7:40 AM UTC

[2B-15] Analysis of cell surface glycan network by synthetic biology approach

*Yoshiyuki Manabe[1,2], Ayane Miura[1], Shuto Miyake[1], Kenichi Suzuki[3], Kazuya Kabayama[1,2], Koichi Fukase[1,2] (1. Osaka University, Graduate School of Scinece, 2. Osaka University, Forefront Research Center, 3. Gifu University, Institute for Glyco-core Research)

4:40 PM - 5:00 PM JST | 7:40 AM - 8:00 AM UTC

[2B-16] Nucleic acid delivery using cationic perylene

*Kazuma Amaike[1], Erika Kato[2], Miu Fukatsu[2], Dominik Zetschok[2], Atsushi Usami[2], Hayato Yamada[2], Kenichiro Itami[2,3] (1. Research Center for Materials Science, Nagoya University, 2. Graduate School of Science, Nagoya University, 3. Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University)

相補的水素結合で形成される共集合型超分子の細胞膜透過性

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

Cell membrane permeability of co-assembled supramolecules constructed by complementary hydrogen bonds

(Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University[2])
WAKABAYASHI, Rie[1]; OBAYASHI, Hiroki[1]; KAMIYA, Noriho[1,2]; GOTO, Masahiro[1,2]

細胞内に薬物やプローブ分子を導入する技術は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) において重要である。外来物質の細胞内への取り込みは、主にエンドサイトーシスと呼ばれる小胞内に取り込まれる経路で行われるが、細胞質へ送達するには小胞からの脱出が必要となる。これに対して、非エンドサイトーシス経路は細胞膜を直接介した取り込み経路であり、高効率な細胞内への送達が期待できる[1]。しかしながら、非エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれる物質は細胞透過性ペプチドや両親媒性ポリマー、ナノサイズの金属粒子等、ごく限られた種類のものしか報告がなく[2]、この経路が材料の取り込み経路としてどこまで汎用であるかは未だ明らかではない。

我々はこれまでに、材料の細胞内移行におけるサイズ依存性を調べることを目的として、相補的水素結合によりペプチドと小分子を共集合し形成される超分子を報告している[3]。相補的水素結合部位としてシアヌル酸とメラミン誘導体を用い、両親媒性ペプチドと蛍光分子 NBD にそれぞれ導入した Cya-PA と Mel-NBD を 1:1 のモル比で混合すると、Cya-PA 中の疎水性リンカーの長さに応じたサイズの超分子が形成された (Fig. 1A)。これらの超分子はがん細胞に対してサイズ依存的に取り込まれることも確認された。そこで、超分子の取り込み経路を調査すると、エネルギ非依存的であり、かつ分単位での素早い取り込みが生じていることが明らかとなった (Fig. 1B)。これは非エンドサイトーシス経路で直接細胞膜を介して取り込まれていることを示唆している。このメカニズムを明らかにするために、細胞膜モデルとしてリポソーム膜を用いて超分子の膜への結合、透過性を調査した。その結果、膜への親和性は Cya-PA や Mel-NBD 単独では殆ど見られないが共集合型超分子となることで著しく高くなること、高い膜への親和性を示すことが必ずしも細胞内への高い移行性に繋がるとは限らないこと等が明らかとなった。

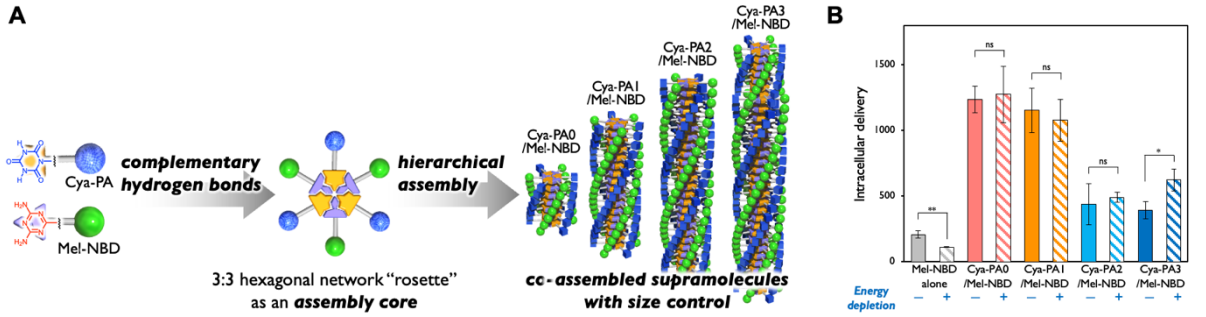


Fig. 1 (A) Schematic representation of formation of co-assembled supramolecules with size control by complementary hydrogen bonds of Cya-PA and Mel-NBD. (B) Energy-independent intracellular delivery of co-assembled supramolecules. N = 3, mean ± SD, $^{*}p < 0.05$, ns: not significant.

References

1. S. Mitragotri *et al., Adv. Funct. Mater.*, *30*, 1910566 (2020).
2. F. Jin *et al., J. Controlled Release*, *174*, 126 (2014); T. Goda *et al., J. Mater. Chem. B, 8*, 7633 (2020); F. Stellacci *et al., Nat. Mater., 7*, 588 (2008).
3. R. Wakabayashi *et al., Chem. Commun., 55*, 6997 (2019).

フッ素化人工チャネルによる膜間物質輸送

○佐藤浩平[1]・金原　数[1,2]（[1]東工大生命理工、[2]東工大 IRFI）

Development of fluorous channels and their transmembrane material transport properties (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology[1], Living Systems Materialogy Research Group, International Research Frontiers Initiative, Tokyo Institute of Technology[2]) SATO, Kohei[1]; KINBARA, Kazushi[2]

我々の身体を構成する細胞の表面には、多様な刺激に応答して特定のイオンを輸送するイオンチャネルが存在し、シグナル伝達やエネルギー変換など、生命の維持に欠かせない様々な役割を担っている。このような天然のイオンチャネルの優れた機能を模倣するべく、現在までに様々な人工イオンチャネル分子が開発されてきた。そして、イオンチャネルの異常によって引き起こされる疾患の治療や、物質精製技術などへの応用が活発に模索されている。このような背景のもと、我々の研究グループでは、天然のイオンチャネルの複数回膜貫通構造を模倣した交互両親媒性分子を開発してきた。そして、これらの分子が脂質二重層中で折り畳まれた構造をとり、さらに自己集合することで、超分子イオンチャネルを形成することを報告している[1)]。

本研究では、交互両親媒性分子のさらなる機能化を目指し、疎水性部位にフッ素原子を導入した分子を設計した。フッ素は全元素中で最も高い電気陰性度を有する一方で、その原子半径は水素原子に次いで小さい。そのため、交互両親媒性分子のフッ素化により、そのチャネル形成能自体は維持しつつも、イオン透過能の細やかなチューニングが可能になると期待した。

我々がこれまでに開発したフッ素化交互両親媒性分子の構造を、図 1 に示す。図 1a では、フッ素原子の高い電気陰性度に由来する外部刺激応答性を期待し、芳香族部位に対してフッ素原子が異方的に配置された分子を設計した。この分子を脂質二重層へと導入したところ、電場の方向と強度に応答して超分子チャネルを形成し、膜間イオン透過能を示すことが明らかとなった。さらに、ナトリウムチャネル遮断薬として知られるプロプラノロールと、そのホスト分子であるシクロデキストリンを交互に添加することで、イオン透過の ON/OFF を可逆的に制御することにも成功した[2)]。

加えて、フッ素化交互両親媒性分子に特定のイオンを透過する機能を付与するべく、従来型よりも分子運動が制限されたシクロファン型分子を新たに設計した（図 1b）。そして、この分子が脂質二重層中で自己集合し、中央部でフッ素原子が認識サイトを形成することで、カリウムイオンを選択的に透過することを明らかにした。さらに、超分子チャネルが膜にかかる圧力（機械刺激）に応答し、イオン透過能を動的に変化させることも明らかとなった[3)]。

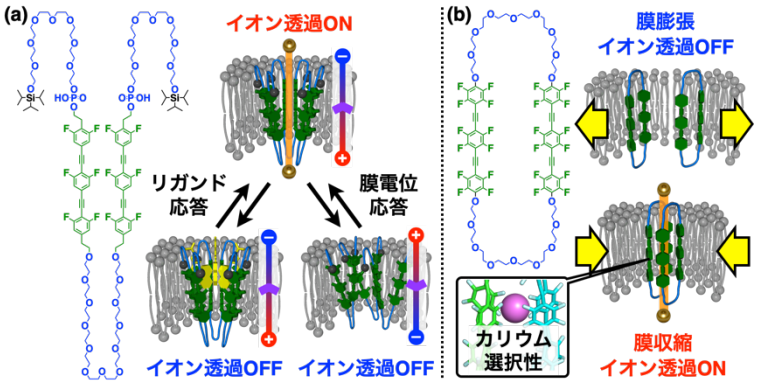


図1. フッ素化人工チャネル分子による (a) 複数外部刺激応答性イオン透過と、 (b) 機械刺激応答性カリウム選択的イオン透過.

1) Sato, K.*; Muraoka, T.; Kinbara, K.* *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 3700–3709.
2) Sasaki, R.; Sato, K.*; Tabata, K. V.; Noji, H.; Kinbara, K.* *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 1348–1355.
3) Sato, K.*; Sasaki, R.; Matsuda, R.; Nakagawa, M.; Ekimoto, T.; Yamane, T.; Ikeguchi, M.; Tabata, K. V.; Noji, H.; Kinbara, K.* *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 11802–11809.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

合成生物学的アプローチによる細胞表層糖鎖ネットワークの解析

○真鍋良幸[1,2]・三浦彩音[1]・三宅秀斗[1]・鈴木健一[3]・樺山一哉[1,2]・深瀬浩一[1,2]

（[1]阪大院理、[2]阪大 FRC、[3]岐阜大 iGCORE）

Analysis of cell surface glycan network by synthetic biology approach (Graduate School of Science, Osaka University[1], Forefront Research Center, Osaka University[2], Institute for Glyco-core Research, Gifu University [2]) MANABE, Yoshiyuki[1,2]; MIURA, Ayane[1]; MIYAKE, Shuto[1]; SUZUKI, Kenichi[3]; KABAYAMA, Kazuya[1,2]; FUKASE, Koichi[1,2].

細胞表層は糖鎖に覆われており，ほとんどすべての膜タンパク質は糖鎖修飾を受けている．細胞表層において糖鎖は，レクチンをはじめとするさまざまな生体分子と相互作用し，免疫，がん，シグナル伝達など多くの生体現象を制御する．一方，生体内で糖鎖は多様な構造の混合物として存在するため，糖鎖の生物機能を分子構造に基づいて解明することは困難である．*N*-結合型糖鎖（*N*-グリカン）はタンパク質のアスパラギン残基に結合する翻訳後修飾糖鎖で，多様な構造を持ち，それぞれの構造に基づき，タンパク質の機能を調節する．我々は，*N*-グリカンの機能解明を目指し，その化学合成に取り組み，世界でも有数の合成糖鎖ライブラリを構築した[1]．本研究では，*N*-グリカン修飾が膜タンパク質の動態に及ぼす影響を明らかにするために，合成糖鎖を生細胞の膜タンパク質上に導入する手法を確立し，さらに，本手法を用いて，ガラクトース認識レクチン（ガレクチン-3）が膜タンパク質の側方拡散に及ぼす影響を精査した．

膜タンパク質上の *N*-グリカンが形成する相互作用ネットワークの解析を目指して，モデル膜タンパク質に合成糖鎖を導入する手法を開発した（Fig. 1）．本手法では，ハロゲン化アルキル（HaloTag リガンド）と速やかに反応し，共有結合を形成するタグタンパク質（HaloTag）を用いた．すなわち，HaloTag 融合膜タンパク質を発現させた細胞に，合成 *N*-グリカンと蛍光基を導入した HaloTag リガンドを作用させることで，均一な *N*-グリカンを導入した蛍光膜タンパク質を生細胞上に調製する．本手法は高い汎用性を示し，10 糖を超える巨大な糖鎖でも速やかに生細胞上に導入することができた．さらに，この方法で提示した合成 *N*-グリカンが，種々のレクチンに認識されることも確認した．

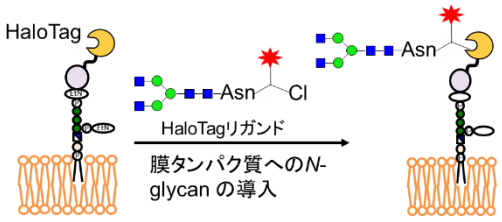


Fig. 1. HaloTag を用いた合成糖鎖の導入

上記の膜タンパク質への合成糖鎖提示システムを利用し，ガレクチン-3 と *N*-グリカンの相互作用が膜タンパク質の動態に及ぼす影響を調べた．HaloTag 融合 GPI アンカータンパク質に対し，種々の合成 *N*-グリカンを導入し，ガレクチン-3 の共存，非共存下で 1 分子観察を行ったところ，導入した糖鎖の構造依存的にタンパク質の側方拡散が抑制されることを見出した．

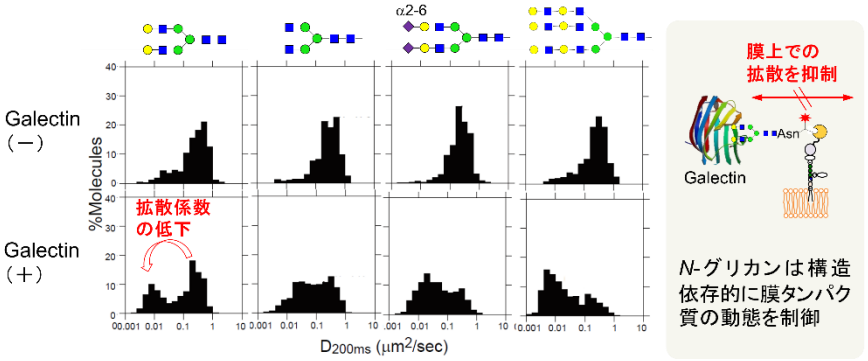


Fig. 1. *N*-グリカンとガレクチン-3 の相互作用の膜タンパク質動態への影響

1) Shirakawa, A.; Manabe, Y.; Marchetti, R.; Yano, K.; Masui, S.; Silipo, A.; Molinaro, A.; Fukase, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*(46), 24686-24693.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

カチオン性ペリレンを用いた核酸輸送

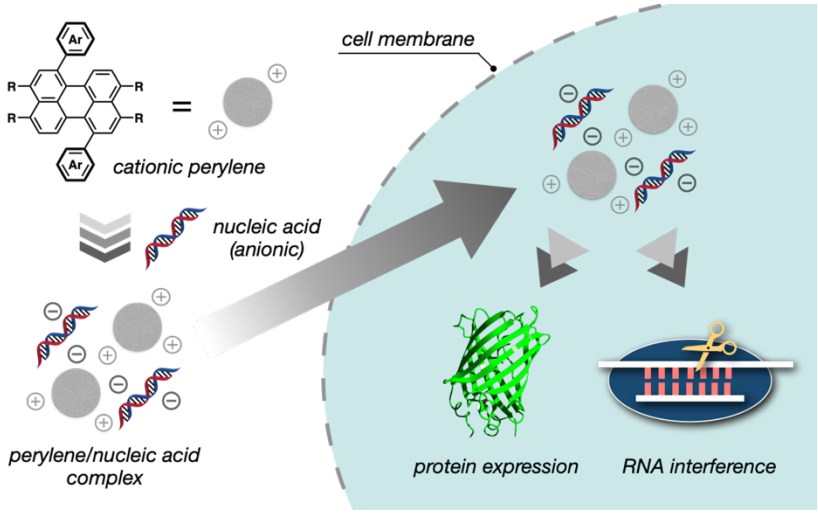
○天池一真[1]・加藤江莉佳[2]・深津美羽[2]・Dominik Zetschok[2]・宇佐見享嗣[2]・山田早人[2]・伊丹健一郎[2,3]（[1]名大物質科学国際研究センター、[2]名大院理、[3]名大 WPI-ITbM）

Nucleic acid delivery using cationic perylene (Research Center for Materials Science, Nagoya University[1], Graduate School of Science, Nagoya University[2], Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University[3]) AMAIKE, Kazuma[1]; KATO, Erika[2]; FUKATSU, Miu[2]; ZETSCHOK Dominik[2]; USAMI, Atsushi[2]; YAMADA, Hayato[2]; ITAMI, Kenichiro[2,3]

核酸医薬やゲノム編集技術といった核酸を用いた技術は、医学をはじめとする生命科学のあらゆる分野へ革命をもたらした。これらの技術は基本的に、核酸が核に到達することで機能が発揮されるため、効率的に外部から核酸を輸送することが求められる。しかし生物は細胞膜や細胞壁などの脂溶性の高い物理的な障壁をもつため、電荷を帯びた核酸を細胞内に輸送するシステムが必要である。核酸輸送には大きく分けて物理的方法、生物学的方法、化学的手法があるが、中でも化学的手法は特殊な機器を必要とせず実験操作が簡便であり、またウイルスを用いないため安全性が高い。生命現象の理解と制御のさらなる高度化が必要な今、効率や選択性はもちろんのこと生体直交性などの多様な機能が核酸輸送に求められている。化学的手法は、緻密な化学構造の制御による機能調整が可能であるため、この分野の未来を担っているといえる。

近年、カチオン性カーボンナノチューブをはじめとする炭素材料（ナノカーボン）がその高い生体直交性から、核酸輸送のための次世代キャリアとして大きな注目を集めている[1]。しかしこれまでに報告された核酸輸送可能なナノカーボンは、分子構造が単一に決まっていない複雑な混合物であり、その構造と核酸輸送効率との相関関係が不明であるばかりでなく、種々の機能の付与・調整が可能な実用的な分子骨格の開発には至っていない。

今回、哺乳細胞に対して核酸輸送を加速させる全く新しい分子性ナノカーボンであるカチオン性ペリレンを見出した。また得られたカチオン性ペリレンの構造機能相関研究を行い、電荷の数や種類が核酸輸送効率に強く影響することが示唆された。今回見出した分子は核酸輸送分野の新潮流を生み出すだけでなく、ナノカーボンバイオロジーの礎となる全く新しい分子プラットホームとなることが期待される。



1. (a) Demirer, G. S.; Zhang, H.; Matos, J. L.; Goh, N. S.; Cunningham, F. J.; Sung, Y.; Chang, R.; Aditham, A. J.; Chio, L.; Cho, M. J.; Staskawicz, B.; Landry, M. P. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14*, 456; (b) Alidori, S.; Akhavein, N.; Thorek, D. L. J.; Behling, K.; Romin, Y.; Queen, D.; Beattie, B. J.; Manova-Todorova K.; Bergkvist, M.; Scheinberg, D. A.; McDevitt, M. R. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 331 ra39.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 8:30 AM - 9:30 AM JST | Sat. Sep 10, 2022 11:30 PM - 12:30 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Keiji Murayama (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

8:30 AM - 8:50 AM JST | 11:30 PM - 11:50 PM UTC

[2C-01] Novel Design Strategy of DNA-Artificial Nucleic Acid Chimera Toward Enhancement of Target RNA Cleavage Activities: Application for COVID-19 Therapeutics

Nozomu Ishiwata[1], Masahito Inagaki[1,3], Kazutoshi Fujita[1], Yuto Horiuchi[1], Huronori Hayashi[2], Yasuyuki Araki[1], Masaki Nishijima[1], Toshiyuki Sato[1], Akiko Nanba[1], Eiichi Kodama[2], *TAKEHIKO WADA[1] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. IRIDeS, Tohoku University, 3. Grad. Sch. Sci., Nagoya University)

8:50 AM - 9:10 AM JST | 11:50 PM - 12:10 AM UTC

[2C-02] RNA methylation through G-quadruplex structure

*Miki Imanishi[1], Atsuhiro Yoshida[1], Takanori Oyoshi[2], Shiroh Futaki[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University, 2. Faculty of Science, Shizuoka University)

9:10 AM - 9:30 AM JST | 12:10 AM - 12:30 AM UTC

[2C-03] The impact of TRPC6 gene silencing using RNA hacking technology on the phenotype of cardiac hypertrophy model mouse

*Takuto Kamura[1], Yousuke Katsuda[1], Taishi Nakamura[2,3], Kenichi Tsujita[3], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[4], Shin-ichi Sato[5], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University, 2. Department of Medical Information Sciences and Administration Planning, Kumamoto University Hospital, 3. Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, 4. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University, 5. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

COVID-19 治療薬開発を指向した触媒的標的 RNA 切断機能付与型キメラ人工核酸の開発 Ⅳ：細胞試験による機能評価

石渡　望[1]・藤田一寿[1]・堀内結翔[1]・稲垣雅仁[1,3]・林　宏典[2]・西嶋政樹[1]・荒木保幸[1]・佐藤俊幸[1]・南場晃子[1]・児玉栄一[2]・○和田健彦[1]（[1]東北大多元研・[2]東北大災害研・[3]名大院理）

Novel Design Strategy of DNA-Artificial Nucleic Acid Chimera Toward Enhancement of Target RNA Cleavage Activities: Application for COVID-19 Therapeutics

([1]IMRAM, Tohoku University, [2]IRDeS, Tohoku University, [3]Grad. Sch. Sci., Nagoya University) Nozomu ISHIWATA,[1] Kazutoshi FUJITA,[1] Yuto HORIUCHI,[1] Masahiro INAGAKI,[1,3] Hironori HAYASHI,[2] Masaki NISHIJIMA,[1] Yasuyuki ARAKI,[1] Toshiyuki SATO,[1] Akiko Namba,[1] Eiichi KODAMA,[2] Takehiko WADA[1]

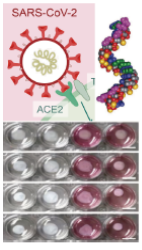
核酸医薬は、抗体医薬に続く次世代型分子標的薬モダリティーとして近年大きな期待が寄せられ、特にアンチセンス核酸や siRNA は比較的容易に化学合成可能で、抗体医薬では困難な細胞質・核内でも薬効発現が期待されるため抗体医薬と相補的な分子標的医薬としても有望視されている。特に新型コロナに対するワクチンや、2020 年に日本発の筋ジストロフィー治療薬としてビルトラルセンに初認可されたことから、欧米を中心とした従来の開発競争への日本の本格参入に向け精力的に研究されている。ただ核酸医薬の汎用的な医薬品としての展開には、「オフターゲット効果（OTE）」と呼ばれる副作用の低減と、「細胞内極低濃度に起因する低治療力価」の改善が必要とされているが、この相反する 2 課題の両立は困難で、現在でも喫緊の解決課題とされている。我々は OTE 低減を目指し、ガンや脳梗塞など虚血性疾患に特有な低酸素環境、それによって誘起される細胞質 pH の低下をトリガーとし、虚血細胞選択的に薬効発現可能な虚血細胞選択的核酸医薬の開発を目指し、ペプチドリボ核酸(PRNA)と名付けた人工核酸を提案し、pH 変化による複合体形成制御の実証に成功した。

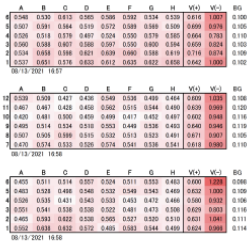
一方、核酸医薬の細胞内取込量向上を目指し、細胞膜透過性ペプチドとの複合化や、GalNAc 等リガンド修飾をはじめ、多くの方法論が提案されているが、未だ肝臓以外への効率的導入は困難で、さらに細胞内高濃度導入は OTE 増大のリスクを伴い、その本質的解決戦略の提案と実証実験が待望されてきた。

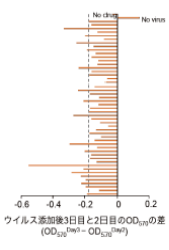
我々は OTE を回避し得る細胞内低濃度条件下での低治療力価向上を目指し、DNA と RNA が形成するヘテロ二重鎖を認識し、選択的に RNA を切断するヌクレアーゼ RNase H による標的 RNA の高効率触媒的切断戦略を提案し、その実証実験ならびに一般化を指向した分子系の構築に取り組んでいる。今回は標的を現在社会的要請の高い COVID-19 ゲノム RNA とし、新規分子設計と機能評価に取り組んだ。

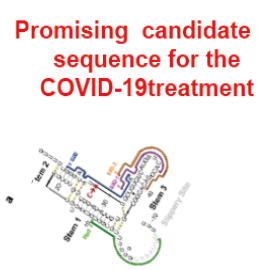
主に核内に存在する RNase H による標的 RNA 切断触媒サイクルにおいて、我々は RNA 切断後の二重鎖解離過程に着目し、適切な箇所での RNA 切断により二重鎖安定性の生体温度 37 度以下への低下を誘起できれば、体内での迅速な複合体解離が実現すると仮説した。本仮説の実証には、RNase H による RNA の位置選択的な切断を実現し得る人工核酸が有効と考え、RNase H が DNA/RNA のヘテロ二重鎖の DNA6ー7 残基のリン酸負電荷骨格を認識する事に着目し、DNA 骨格と負電荷を有しないアミド骨格人工核酸 PNA/PRNA[3)]を融合したキメラ人工核酸を設計・合成した。今回は先に述べたように現在社会的要請の高い COVID-19 ゲノム RNA とし、新規分子設計と機能評価に取り組んだ。細胞ならびに動物試験用キメラ人工核酸としてヌクレアーゼなどに対する耐性付与を目的に LNA ならびに PS 結合を導入した配列設計ならびに合成を行った。

今回は各種 in vitro レベル実験結果と、細胞試験で SARS-CoV-2 感染抑制効果との関連について検討した結果を報告する。









グアニン四重鎖構造を介したRNAアデノシンメチル化

○今西未来[1]・吉田敦裕[1]・大吉崇文[2]・二木史朗[1]（[1]京大化研、[2]静岡大院理）

RNA methylation through G-quadruplex structure (Institute for Chemical Research, Kyoto University [1], Faculty of Science, Shizuoka University [2]) IMANISHI, Miki[1]; YOSHIDA, Atsuhiro[1]; OYOSHI, Takanori[2]; FUTAKI, Shiroh[2]

N6-メチルアデノシン（m6A）は、mRNA に最も多く存在する修飾塩基であり、RNA の安定性や局在、翻訳など様々な RNA 代謝に関わることが明らかになってきた。m6A 修飾は、METTL3/METTL14 ヘテロダイマーとその相互作用タンパク質からなる m6A writer 複合体によって触媒される。m6A は様々な転写産物の 5′-RRACH-3′（R=G/A, H=A/C/U）配列中に存在するが、このコンセンサス配列のうち実際にメチル化されているのはごく一部である。「METTL3/METTL14 ヘテロダイマーがどのようにしてターゲットを決定するのか」に関して、相互作用タンパク質を介したメチル化および、RNA メチル化酵素による直接的なメチル化が想定されているが、標的サイト選択機構の全容は明らかではない。本研究では、後者に着目し、METTL3/METTL14 ヘテロダイマーの RNA 結合特性を明らかにすることを目的とした。バイオインフォマティクス解析により、ウイルス（ZIKV や HIV）のゲノム RNA において、m6A が G-quadruplex（rG4）形成配列近傍に存在することが指摘されている[1]。そこで、METTL3/METTL14 メチルトランスフェラーゼヘテロダイマーの RNA 結合特性、特に METTL14 の RNA 結合ドメインであるアルギニン-グリシン-グリシン（RGG）反復配列の rG4 に対する RNA 結合特異性に関する検討を行った。

METTL3 と METTL14 のメチルトランスフェラーゼドメイン（MTD）ヘテロダイマーに METTL14 の RGG リピートを加えた MTD3/MTD14-RGG を調製した。ゲルシフトアッセイの結果、METTL14 は rG4 構造を安定化するカリウムイオン存在下で、G4 RNA に高い親和性で結合した。また、m6A 感受性 RNA 切断酵素 MazF を用いた in vitro における RNA メチル化解析から、夾雑 RNA が過剰に存在する条件においても、METTL3/14 は G4 RNA を特異的にメチル化した。これらの結果は、RNA の G4 構造がアデノシンメチル化部位の決定に関わっていることを示唆するものであり、エピトランスクリプトーム制御における rG4 の新たな知見を提供するものである[2]。

[1] Fleming, A.M., Nguyen, N.L.B., Burrows, C.J., *ACS Cent. Sci*. 5, 218-228 (2019).
[2] Yoshida, A., Oyoshi, T., Suda, A., Futaki, S., Imanishi, M., *Nucleic Acids Res*. 50, 449-457 (2022).

次世代型核酸医薬を志向した RNA hacking 技術による *in vivo* 遺伝子発現抑制 -心肥大モデルマウスを利用したフェノタイプ解析-

○嘉村匠人[1]・勝田陽介[1]・中村太志[2,3]・辻田賢一[3]・北村祐介[1]・萩原正規[4]・佐藤慎一[5]・井原敏博[1]（[1]熊本大学大学院先端科学研究部、[2]熊本大学病院医療情報経営企画部、[3]熊本大学大学院生命科学研究部循環器内科学科、[4]弘前大学大学院理工学研究科、[5]京都大学化学研究所）

The impact of TRPC6 gene silencing using RNA hacking technology on the phenotype of cardiac hypertrophy model mouse

(Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University[1], Department of Medical Information Sciences and Administration Planning, Kumamoto University Hospital[2], Department of Cardiovascular Medicine, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University[3], Faculty of Science and Technology, Hirosaki University[4], Institute for Chemical Research, Kyoto University[5]) Takuto Kamura[1], Yousuke Katsuda[1], Tomoki Kida[1] Taishi Nakamura[2,3], Kenichi Tsujita[3], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[4], Shin-ichi Sato[5], Toshihiro Ihara[1]

アンチセンス核酸や siRNA など核酸医薬は、mRNA 配列が明らかになっている遺伝子全てを標的にし得ることから希少疾患を中心とした様々な疾病に対する新しい創薬モダリティとして注目を集めている。核酸医薬を開発する際は、投与する核酸の生体内安定性向上や患部への送達を目的として人工核酸や細胞/臓器選択的なリガンドなどを利用する必要がある。しかし、これらを使用したアンチセンス核酸や siRNA は生体内に存在する酵素と協働することが困難になり、結果として遺伝子発現抑制効果が低下する可能性がある。したがって、現状アンチセンス核酸・siRNA 設計における人工核酸・リガンドの利用は制限される。このような背景から、人工核酸や薬物送達を指向したリガンドを自由に選択することが可能な新しい遺伝子発現抑制法を開発することには大きな意義があると考えている。

そこで我々は Staple 核酸と名付けた短い核酸（DNA、RNA など）を用いて RNA 高次構造を強制的に変える RNA hacking 技術（RNAh）を考案した。RNAh による遺伝子発現抑制においては、リボソームの進行を阻害しアミノ酸伸長反応を抑制することが知られている RNA G-quadruplex 構造（RGq 構造）を利用する（**Fig. 1**）。

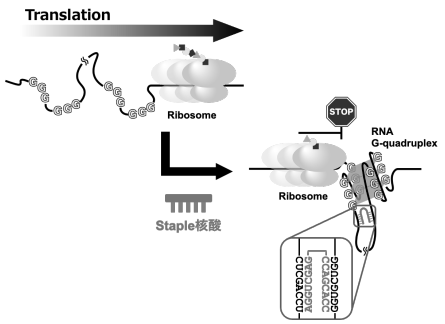


Fig. 1 RNA hacking 技術（RNAh）により RNA G-quadruplex 構造を構築し、本構造を利用してリボソームの進行を阻害することで標的遺伝子の発現を抑制する。

我々は先行研究において心肥大に関与することが知られている TRPC6 遺伝子を標的とした試験管内・細胞内における遺伝子発現抑制に成功している。本発表では動物個体内における Staple 核酸の遺伝子発現抑制効果の評価やオフターゲット効果の評価、心肥大誘導モデルマウスを利用したフェノタイプ解析などの結果に関して報告する**(Fig. 2)**。

今後は人工核酸を利用した Staple 核酸（XNA Staple）の体内動態解析や代謝状況評価、毒性評価を行い、最終的には RNAh 技術を基盤とした次世代型核酸医薬の臨床応用を目指す。

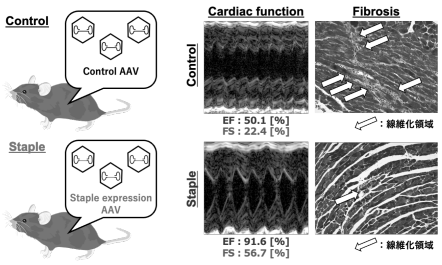


Fig. 2 Staple 核酸を投与することで心機能の低下や心筋線維化の進行を抑制できた。

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 9:40 AM - 10:40 AM JST | Sun. Sep 11, 2022 12:40 AM - 1:40 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Kunihiko Morihiro (The University of Tokyo)

9:40 AM - 10:00 AM JST | 12:40 AM - 1:00 AM UTC

[2C-04] Construction of E. coli Adaptive to Unnatural Nucleotides

*Koji Hashimoto[1,2], Emil Fischer[2], Hiroshi Abe[1], Floyd Romesberg[2] (1. Nagoya University, 2. The Scripps Research Institute)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[2C-05] Regulation of DNA methylation using stability and topology of G-quadruplex

*Saki Matsumoto[1], Hisae Tateishi-Karimata[1], Naoki Sugimoto[1,2] (1. FIBER, Konan University, 2. FIRST, Konan University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[2C-06] Orthogonal signal amplification circuits composed of acyclic XNAs for detection of RNA

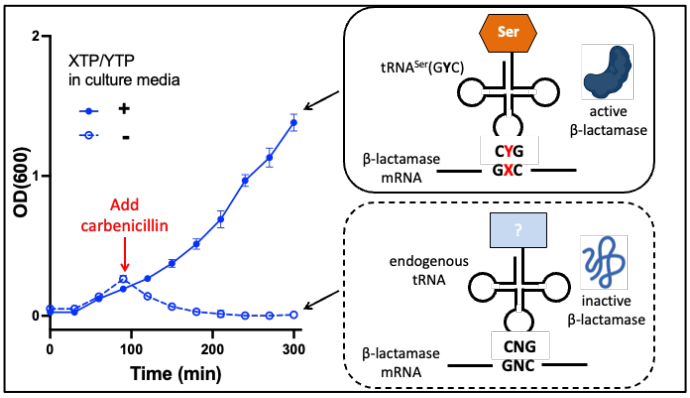
*Keiji Murayama[1], Yanglingzhi Chen[1], Ryuya Nagao[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

人工核酸適応型大腸菌システムの構築

○橋本　講司[1,2]・Emil Fischer[2]・阿部洋[2]・Floyd Romesberg[1]（[1]The Scripps Research Institute, [2]名大院理）

Construction of E. coli Adaptive to Unnatural Nucleotides ([1]Graduate School of Science, Nagoya University, [2]Department of Chemistry, The Scripps Research Institute) HASHIMOTO, Koji[1,2]; FISCHER, Emil[1]; ABE, Hiroshi[2]; ROMESBERG, Floyd[1]

遺伝子は水素結合を組む 2 つの塩基対（A-T, G-C）によって記述され、遺伝暗号に基づいて各コドンにアミノ酸が割り当てられることでタンパク質が翻訳される。Romesberg 研究室では第三の塩基対を導入するために、疎水性結合を組む人工の塩基対（X-Y）が開発されてきた。さらに我々は珪藻由来のヌクレオチドトランスポーターを大腸菌に発現させることで、複製と転写の基質となる人工塩基の三リン酸体を取り込ませることに成功した。これがきっかけとなり我々は世界で初めて細胞内における人工塩基対の複製・転写・翻訳を実証した。本発表では、人工塩基を含むコドン（人工コドン）を網羅的に合成し、大腸菌翻訳システムによって人工コドンに非天然アミノ酸が導入可能かどうかを検証した結果について報告する[1]。



上記の研究過程で、人工塩基導入箇所のシーケンスコンテクスト次第では、複製ミスによる人工塩基の喪失や人工 mRNA とリボソームとの間の相互作用不良による翻訳阻害が検出された。これまでは人工塩基対の構造を化学的に最適化する研究しか行われておらず、より普遍的な細胞内複製・転写・翻訳を実現するためには、細胞側のシステムを生物学的に最適化するアプローチが有効である。大腸菌は自然界の長い歴史の中で、天然塩基に適応するように進化してきたと考えられる。そこで我々は大腸菌を実験室内で短期間に、人工塩基に再適応させるための遺伝子プログラムを考案した。具体的には、β-ラクタマーゼの活性に必須のセリン残基を人工塩基でコードしたプラスミドを構築した。これにより、大腸菌が人工塩基を利用可能な条件でのみ活性型β-ラクタマーゼを発現し、カルベニシリン耐性を獲得できるようにした（上図）。この人工プラスミドを変異誘導した大腸菌ライブラリに導入することで、人工塩基に適応進化した大腸菌が選択的に生育することが期待される。本発表では、人工塩基三リン酸体を取り込み可能なトランスポーターをセレクションした実際の事例について報告する[2]。

我々が開発したヌクレオチドトランスポーターによって、大腸菌は人工塩基以外の修飾ヌクレオチドを取り込めることが明らかになっている[3]。しかし、それらを基質として複製・転写させた人工核酸を用いて、生命現象をコントロールした例は知られていない。そこで本発表の最後では、大腸菌に糖部修飾ヌクレオチドを取り込ませ転写させる試みについて紹介し、細胞内転写された人工核酸を利用した合成生物学の可能性について議論したい。

1) Emil C. Fischer, Koji Hashimoto et al., Nat Chem Biol. 2020 May;16(5):570-576.
2) Koji Hashimoto, Emil C. Fischer, Floyd E. Romesberg. J Am Chem Soc. 2021 Jun 16;143(23):8603-8607.
3) Aaron W. Feldman et al., J Am Chem Soc. 2018 Jan 31;140(4):1447-1454.

グアニン四重らせん構造の安定性とトポロジーによる DNA メチル化制御

○松本咲[1]・建石寿枝[1]・杉本直己[1,2]（[1]甲南大 FIBER、[2]甲南大 FIRST）

Regulation of DNA methylation using stability and topology of G-quadruplex (FIBER, Konan University[1], FIRST, Konan University[2]) MATSUMOTO, Saki[1]; TATEISHI-KARIMATA, Hisae[1]; SUGIMOTO, Naoki[1,2]

DNA のメチル化は、遺伝子発現の制御を通じて、発生、分化、細胞特性の維持に重要な役割を果たす。最近のゲノム解析技術の進歩により、ヒトの全エピゲノムが明らかにされている。ヒトの細胞では CpG 配列中のシトシンの 70-80%がメチル化されているにもかかわらず、CpG アイランドは初期胚ではメチル化されておらず、その後もメチル化されないことが知られている。一方、CpG アイランドは加齢に伴う特定の組織でメチル化が進行しやすいことや、がんや永久細胞株などの細胞でメチル化していることも報告されているものの、これらのメチル化制御機構は未だ不明である。

CpG アイランドは GC に富む配列を持ち、グアニン四重らせん(G4)や i モチーフのような非標準構造を形成する可能性がある。G4 の形成は、複製、転写、翻訳などの制御を通じて、遺伝子発現やゲノムの安定性を制御していることが明らかになっている[1)]。DNA メチル化も核酸を基質とする生体反応であることから、DNA 上の G4 形成によって制御されている可能性がある（Fig. 1）。実際に、G4 が CpG アイランドのメチル化を抑制する可能性は、メチローム解析から示唆されている。しかし、G4 の形成がメチル化に及ぼす影響についての定量的かつ系統的な知見は未だ乏しい。また、近年、G4 の安定性だけでなくトポロジーも生体反応を制御することが示されている[2,3)]。DNA メチル化はがんや老化などに寄与するため、G4 の安定性とトポロジーの観点から G4 によるメチル化の制御機構を解明することは、がんや老化関連疾患の治療戦略の開発を促進するものと期待される。

本研究では、G4 の形成がメチル化に及ぼす影響について系統的に検討した。様々な熱安定性とトポロジーの G4 形成配列 DNA を基質としてメチル化反応を行った。その結果、基質 DNA が安定な G4 を形成するほど、メチル化効率の低下が観測された。さらに、メチル化反応は G4 の安定性だけでなく、G4 のトポロジーによっても制御されることが明らかになった。$-\Delta G^{\circ}_{37}$ の値（37℃での安定性）が 5.96 kcal mol^{-1} のハイブリッド G4 は 69.1 %のメチル化阻害を示したが、同様の安定性（$-\Delta G^{\circ}_{37} = 5.95$ kcal mol^{-1}）を持つアンチパラレル G4 は 46.1 %の阻害を示した。これは、トポロジーによって G4 のアンフォールディングプロセスが異なることが原因であると推察される。G4 は周辺環境の変化によってその安定性やトポロジーを変化させることから、本研究成果により細胞内環境変化に応答して変化する G4 の安定性及びトポロジーがメチル化を制御していることが示唆された。

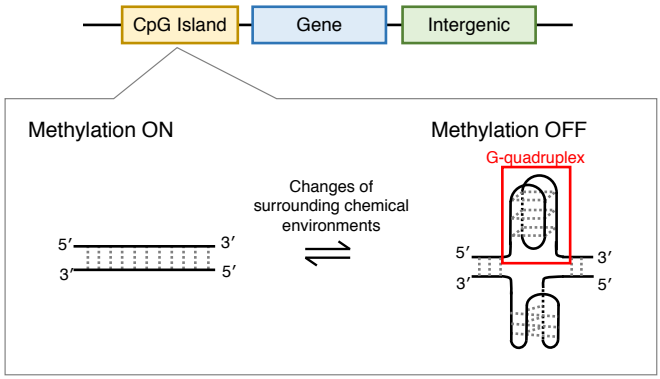


Fig 1. Schematic illustration of suppression of methylation by G4 in CpG island.

1) N. Sugimoto, T. Endoh, S. Takahashi, H. Tateishi-Karimata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.,* **94**, 1970 (2021)
2) S. Takahashi, J. A. Brazier, N. Sugimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **114**, 9605 (2017)
3) S. Takahashi, A. Kotar, H. Tateishi-Karimata, S. Bhowmik, Z. Wang, T. Chang, S. Sato, S. Takenaka, J. Plavec, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.,* **143**, 16458 (2021)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

非環状型 XNA で構成される直交性シグナル増幅回路の開発と RNA 検出への応用

○村山恵司[1]・陳楊凌志[1]・長尾竜弥[1]・浅沼浩之[1]（[1]名大院工）

Orthogonal signal amplification circuits composed of acyclic XNAs for detection of RNA (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]) MURAYAMA Keiji[1]; CHEN Yanglingzhi[1], NAGAO Ryuya[1], ASANUMA Hiroyuki[1]

DNA 回路は、Toehold を介した DNA 鎖置換反応[1]を利用する分子演算システムであり、DNA コンピューティング、生体物質の検出、ナノマシン構築、分子の配列化など、多岐にわたる応用が展開されている。このシステムは、相補的な配列同士が二重鎖形成するという DNA の基本的性質に基づいているが、部分的に相補的な配列や多少のミスマッチが存在する場合にも反応が起きてしまうため、特に内在の DNA・RNA が無数に存在する生物由来のサンプルでは誤作動を起こしやすい。また、回路の DNA が細胞内の核酸分解酵素によって容易に分解されてしまう点も問題となる。

本研究では、我々がこれまでに開発した非環状型 XNA[2]である D-*a*TNA(左巻き)[3]と L-*a*TNA(右巻き)[4]の直交性(Fig. 1a)を利用することで、互いに相互作用しないシグナル増幅回路を設計した。核酸シグナル増幅回路として hybridization chain reaction (HCR)[5]を選択した (Fig. 1b)。同じ配列の HCR を D-*a*TNA 及び L-*a*TNA で合成し、その直交性を検証した。L-*a*TNA HCR のヘアピンに対し、L-*a*TNA の Input を添加すると蛍光シグナルが増大し、設計通りの伸長反応が確認された(Fig. 1c)。一方で、同じ配列の D-*a*TNA Input を添加してもシグナル増幅は観測されなかった。逆に D-*a*TNA HCR の場合には、D-*a*TNA の Input 添加でシグナル増幅が見られ、L-*a*TNA の Input には反応しなかった (Fig. 1c)。すなわち、L-*a*TNA HCR と D-*a*TNA HCR の直交性が確認された。

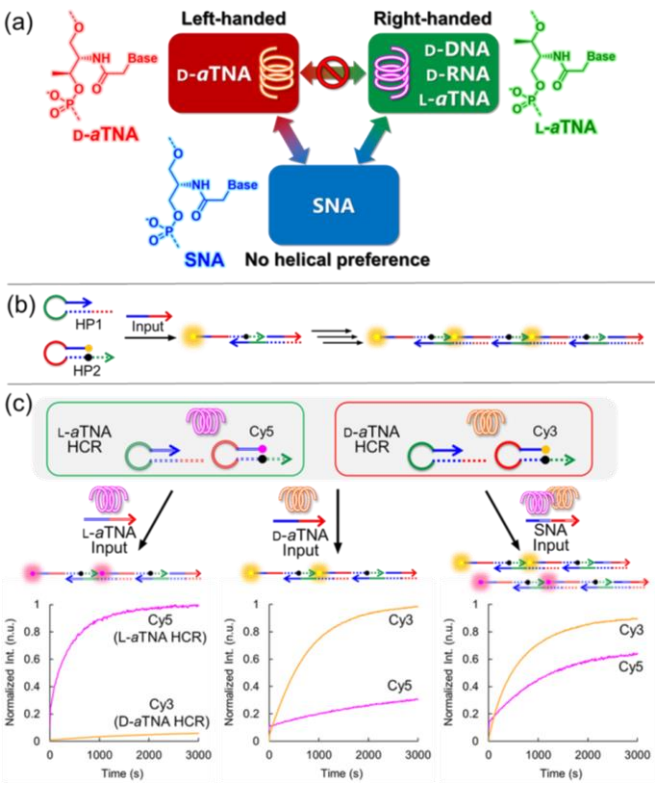


Fig. 1. (a) Chemical structures and helical properties of *a*TNAs and SNA. (b) Mechanism of signal amplification by HCR. (c) Orthogonality of XNA-HCR.

更に、SNA[6]をインターフェイスとして用いることで、D-*a*TNA とは本来直交的な RNA の配列情報を D-*a*TNA 回路に伝達しシグナル増幅を行う、夾雑 DNA・RNA の影響を受けないロバストな RNA 検出系を設計した。当初の設計では、RNA の右巻きが SNA に伝播することで左巻き D-*a*TNA 回路の起動効率が阻害されたが、巻きの伝播を遮断するために SNA にスペーサーを導入した結果、D-*a*TNA HCR による高効率な RNA 検出に成功した(data not shown)[7]。

[1] F. C. Simmel *et al*., *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 6326−6369. [2] K. Murayama, *et al*. *ChemBioChem* **2021**, *22*, 2507−2515. [3] H. Asanuma *et al*., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14702−14703. [4] K. Murayama *et al*., *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 6500. [5] R. M. Dirks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 15275−15278. [6] H. Kashida *et al*., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 1285−1288. [7] Y. Chen *et al*., *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, *144*, 5887−5892.

Poster Short Talk

Sun. Sep 11, 2022 10:50 AM - 11:50 AM JST | Sun. Sep 11, 2022 1:50 AM - 2:50 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Poster short talks (P100-P116)

[P100] Impact of A-to-I RNA editing in mRNA untranslated regions on the translation process

*Yuki Ogata[1], Masatora Fukuda[1,2] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Fukuoka University, 2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University)

[P101] Intramolecular energy transfer utilized single molecule excitation light source

*Yuki Minamide[1], Fumiaki Takano[1], Koichi Tanimoto[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University)

[P102] Accelerated DNA double-strand break and cancer cell-selective cytotoxicity induced by tetranuclear copper complex

*Takuto Tokunaga[1], Machi Hata[1], Yutaka Hitomi[1], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[P103] Specific capture of circulating tumor cells by anti-EpCAM aptamer-modified filters.

*Haruna Hayashi[1], Yusuke Kitamura[1], Yuta Nakashima[1], Keiichiro Yasuda[2], Masaaki Iwatsuki[3], Seitaro Kumamoto[2], Yousuke Katsuda[1], Yoshitaka Nakanishi[1], Hideo Baba[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, 2. OGIC technologies Co., Ltd, 3. Faculty of Life Sciences, Kumamoto University)

[P104] Preparation of bioelectrodes for creatinine detection using three enzymes

*Maki Haraguchi[1], Nobuhumi Nakamura[1] (1. Graduate school of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P105] Development of heme-selective biomolecule-labeling probes for tissue imaging

*Ryo Kakiuchi[1], Tasuku Hirayama[1], Shohei Tsuji[1], Masamitsu Shimazawa[1], Tomonori Tamura[2], Itaru Hamachi[2], Mieko Tsuji[1], Hideko Nagasawa[1] (1. Gifu Pharmaceutical University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P106] Development of a three-dimensional fluorescence imaging method for hypoxia utilizing Cu-catalyzed click reaction

*Iori Tamura[1], Daichi Sakamoto[1], Bo Yi[1], Yutaro Saito[1], Naoki Yamada[1], Yoichi Takakusagi[2], Shimpei Kubota[3], Kazuki Tainaka[4], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, 3. Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, 4. Brain Research Institute, Niigata University)

[P107] Development of Identification Model for Foodborne Pathogens Based on Colony Fingerprinting Using Colony Morphology and Optical Properties

*Hikaru Tago[1], Yusuke Tanaka[1], Someya Takumi[1], Yoshiaki Maeda[1], Tae-Kyu Lim[2], Manabu Harada[2], Tomoko Yoshino[1], Tadashi Matsunaga[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Division of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Malcom Co. Ltd.)

[P108] Development of system for metabolite analysis using phenylboronic acid modified artificial oligonucleotides

*Yuto Motohashi[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[P109] Glutathione Imaging in Frozen Tissue Slice Using Functional Thin-Layer Chromatography

*Koki Nishida[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[P110] Development of a group of enzymes and substrates of "human cell orthogonal" and its application to multiple colored sensitization analysis of cells

*Ryosuke Kaneko[1], Chuya Tateishi[2], Kenta Tanito[2], Kota Yamanaka[2], Noriho Kamiya[1,4], Kaoru Takekawa[5], Teruki Nii[1], Akihiro Kishimura[1,3], Takeshi Mori[1], Yoshiki Katayama[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, 3. Center for Molecular Systems, Kyushu University, 4. Kyushu University Center of Future Chemistry, 5. Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

[P111] Development of electrospun fibermats, encapsulating the lactate-respondent protein

*Yuna Kato Kato[1], Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P112] Structure-based design of fluorescent immunosensor using anti-cortisol nanobody

*Akihito Inoue[1], Taiga Suzuki[1], Yinghui Yang[1], Yasuda Takanobu[2], Bo ZHU[2], Tetsuya Kitaguchi[2], Hiroshi Ueda[2] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Tech, 2. Laboratory for Chemistry and Life Science Institute of Innovative Research, Tokyo Tech)

[P113] Establishment of a protocol for detection of circulating tumor cells from the blood in canine urothelial carcinoma

*Ryo Miura[1], Tatsuya Usui[2], Haru Yamamoto[2], Daigo Azakami[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Institute of Engineering Division of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Institute of Agriculture Division of Animal Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P114] Organelle-targeted NIR Fluorescent Probe for Real-time Monitoring of Glutathione

*Yuki Moro[1], Wu Qian[2], Masayasu Taki[2], Shigehiro Yamaguchi[1,2] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. ITbM, Nagoya University)

[P115] Multi-functionalization of Phospha-rhodamine Dyes Using a Cross-Coupling Reaction

*Yuichi Asada[1] (1. Faculty of Science, Nagoya University)

[P116] Quantitative single-cell analysis of membrane proteins inside the cells

*Yuki Umeda[1], Satoshi Yamaguchi[1], Shinya Yamahira[2], Motonao Nakamura[3], Akimitsu Okamoto[1] (1. School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Center for Medical Sciences, St. Luke's International University, 3. School of science, Okayama University of Science)

mRNA 非翻訳領域における A-to-I RNA 編集が翻訳過程に与える影響の解析

○緒方 悠岐・福田 将虎（福岡大・理・化学）

Impact of A-to-I RNA editing in mRNA untranslated regions on the translation process ([1]Dept. Chem., Graduate School of Science, [2]Fukuoka Univ.Dept. Chem., Fac. Sci., Fukuoka Univ.) Yuki Ogata[1], Masatora Fukuda[1,2]

生体には RNA 中のアデノシン(A)を脱アミノ化し、イノシン(I)に変換する A-to-I RNA 編集機構が存在する。mRNA に生じた I は、その化学的類似性によって翻訳過程ではグアノシン(G)として認識されるため、A-to-I RNA 編集はアミノ酸コドンを変換することができる。これまでに、AUA コドン（イソロイシンコドン）の A-to-I RNA 編集により生じた AUI コドンがタンパク質翻訳の開始点として機能することが報告されている[1]。また、生体内には同一の mRNA 上に複数の翻訳領域があるポリシストロニックな遺伝子が存在し、上流の遺伝子の翻訳が下流の遺伝子の翻訳量に影響することも報告されている[2]。以上の知見から「5’-非翻訳領域(untranslated region: UTR) で生じる A-to-I RNA 編集が、新たな翻訳領域を生成、または既存の翻訳領域を削除し、下流のタンパク質翻訳を制御する」という、A-to-I RNA 編集を介した遺伝子制御機構が考えられる。

本研究では、上記の A-to-I RNA 編集による遺伝子制御機構を実験的に証明することを目的とし、独自に設計したモデル配列を用いた研究を行なっている。まず、AUI トリプレットが開始コドンとして機能するかを確認するため、ルシフェラーゼ（Luc）mRNA のオリジナルの開始コドン AUG を AUA コドンに置換したモデルレポーターRNA を設計した。このレポーターmRNA に対して、ガイド RNA と組換え ADAR2 を用いた RNA 編集反応を行い[3]、開始コドンの位置に AUI トリプレットを有するレポーターmRNA を取得した。次いで、得られたレポーターmRNA を用いて in vitro 翻訳反応を行い、発光強度測定により Luc の発現量を解析した。結果、AUA≥AUI＞AUG の順となり、確かに A-to-I RNA 編集により、新たな翻訳開始点が生成できることを確認した。次いで、Luc mRNA の 5'-UTR に AUG トリプレットを挿入したレポーターRNA を新たに構築し、挿入した AUG を IUG に変換することで、上流翻訳領域の欠失による遺伝子発現への影響を評価した。結果、Luc の発光強度は AUG＜IUG≒GUG となり、上流の AUG を IUG に変換することで下流の翻訳領域の翻訳量が増加することが示された。以上の結果は、非翻訳領域の A-to-I RNA 編集が遺伝子発現量を制御できることを示唆している。本発表では、上記 in vitro での実験結果に加え、培養細胞内で評価した結果も併せて報告する。

1. Vogel P. et al., ACS Synth Biol., 6(9), 1642-1649(2017).
2. Karginov T. A. et al., Trends Genet.,33(2), 129-142(2017).
3. Fukuda M *et al., Sci. Rep.*, **7,** 41478 (2017).

単分子励起光源を利用した分子内エネルギー移動

○南出悠貴・高野史章・谷本晃一・葛谷明紀（関西大化学生命工）

Intramolecular energy transfer utilized single molecule excitation light source ((Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University,) MINAMIDE, Yuki; TAKANO, Fumiaki; TANIMOTO, Koichi; KUZUYA, Akinori

植物は光合成において太陽光を効率的に活用するため、光アンテナという集光機構を備えている。これは数百個のクロロフィル分子で構成されており、光エネルギーを補足して高エネルギーな電子を生み出す。励起電子のエネルギーは分子から分子へと次々に受け渡されていき、最終的に 2 個のクロロフィル分子からなるスペシャルペアに集められる。この過程におけるエネルギー移動は無放射の共鳴機構により実現されている。このようなエネルギーを受け渡す機構の模倣が試みられてきた。しかし、バルクの励起光源を用いて光アンテナのように同一蛍光色素で再現した場合、励起光が全ての蛍光物質を同時に励起してしまうため、直接的なエネルギー移動を観察できなかった。また、異なる蛍光物質を配列し、エネルギー準位を少しずつ下げることでエネルギー移動を試みた例もあるが、配列できる蛍光物質の数に制限があり伝送距離が短くなるという課題があった。

そこで本研究では生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) に注目した。BRET とは発光基質が光を発する為に使うエネルギーが極近傍にある蛍光物質へと移動する現象のことである。当研究室では相補な二本の DNA のうち片方に発光タンパク質を化学修飾し、もう片方に蛍光色素を修飾することで、DNA をリンカーとした BRET システムを報告している。本研究ではこれを応用し、リンカーとなる DNA の鎖内に複数個の蛍光色素を挿入し、発光タンパク質の近傍に局在化した蛍光色素のみを励起することで同一蛍光色素による分子内エネルギー移動を試みた。

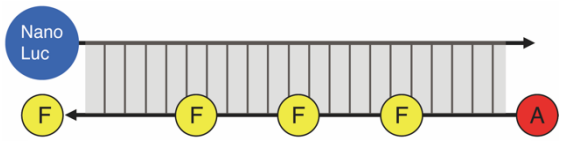


Fig. 1 Schematic diagram of this system.

本研究では発光タンパク質に NanoLuc ルシフェラーゼ [1]を選択した。これは深海エビ由来の青色発光を示す発光タンパク質であり、小断片側のペプチド鎖 (HiBiT) と大断片側の LgBiT に分割できる。このスプリット体のうち HiBiT を DNA に修飾し HiBiT-DNA を合成した。次に HiBiT-DNA に相補な DNA の鎖内に FAM を複数個挿入し、5'末端に Alexa 594 を修飾した DNA を合成した。この二本の DNA をハイブリダイゼーションさせた後、LgBiT を加えて NanoLuc を再構築させ Furimazine を加え発光スペクトルを測定した。その結果、リンカーの DNA に挿入した FAM の数が多いほど Alexa 594 への FRET 効率が向上した。

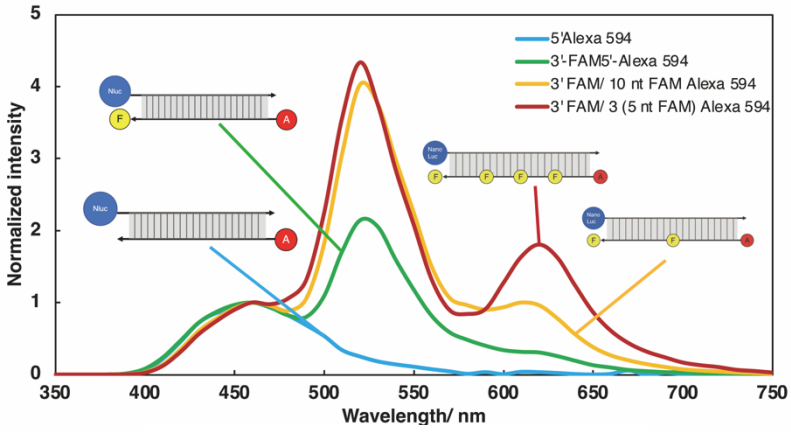


Fig. 2 Normalized spectra of this system.

1) A. S. Dixon, *et al.*, *Anal. Chem.* **2016**, *11*, 400-408.

四核銅(II)錯体による DNA 切断の高速化とがん細胞選択的細胞毒性

○徳永拓人・畑真知・人見穣・小寺政人（同大院理工）

Accelerated DNA double-strand break and cancer cell-selective cytotoxicity induced by tetranuclear copper complex. (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) TOKUNAGA, Takuto; HATA, machi; HITOMI, Yutaka; KODERA, Masahito

ブレオマイシン(BLM)の鉄錯体は，DNA を二本鎖切断して細胞死を導く細胞障害性の抗がん剤として広く臨床利用されている[1]．Que らは N4Py 配位子の単核鉄(II)錯体$[Fe(N4Py)(MeCN)]^{2+}$ (**5**)を BLM の機能モデルとして報告した．Roelfes らは 2 分子の **5** をリンカーで繋いだ$[Fe_2(di\text{-}N4Py)(MeCN)_2]^{4+}$ (**6**)が還元剤存在下で **5** より高い DNA 切断活性を示すことを報告した[2]．しかし，これらの錯体は，がん細胞選択性がなく，正常細胞に対しても同様の毒性を及ぼした．

がん細胞は，正常細胞に比べて活性酸素種(ROS)や還元性物質の濃度が高い特異環境にあることが知られている．我々は，副作用の少ない抗がん剤の開発を目指し，がん細胞の特異環境で DNA 切断を加速する金属錯体を開発してきた．これらの研究の中で，四核銅(II)錯体$[Cu_4(\mu\text{-}OAc)_4(L2^{4\text{-}H})]^{2+}$(**3**)が還元剤であるアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)の存在下，DNA の二重鎖切断に対して高い活性を示すことを見出した．**3** では 2 つの二核銅が協同的に働き，O_2 活性化を加速することを示した．今回の研究で，四核銅(II)錯体 **3** では各種細胞株に対する細胞毒性が二核銅(II)錯体$[Cu_2(\mu\text{-}OAc)_2(L1^{4\text{-}H})]^{+}$ (**1**)の約 6-12 倍に大きく向上することを見出した．ICP-MS の測定から，**3** の細胞取込量は **1** の約 1.1 倍であり，その細胞膜透過性は同程度であることがわかった．従って，**3** による ROS 生産能の増大が細胞毒性の向上の原因と考えられる．肺や膵臓のがん細胞と正常細胞に対する細胞毒性の比較から，**3** は **1** と同程度のがん細胞選択性を示すことがわかった．

これまでの我々の研究で **1** の py 環の 4 位に MeO 基を導入した二核銅(II)錯体$[Cu_2(\mu\text{-}OAc)_2(L1^{4\text{-}OMe})]^{+}$ (**2**) が，反応初期に高い DNA 切断活性を示すとともに，各種細胞株に対して **1** よりも約 4-7 倍高い細胞毒性を示すことが明らかになった．**2** の高い細胞毒性は細胞取込率が **1** よりも約 7.2 倍高いことによる．また **2** は肺と膵臓の細胞株に対して **1** より高いがん細胞選択性を示すことがわかっている．

そこで今回，さらに高い DNA 切断活性及びがん細胞選択的細胞毒性を示す金属錯体の開発を目指し，新規四核銅(II)錯体$[Cu_4(\mu\text{-}OAc)_4(L2^{4\text{-}OMe})]^{2+}$(**4**)を合成した．本発表では，**3** の細胞毒性とともに，**4** の DNA 切断活性と細胞毒性について報告する．

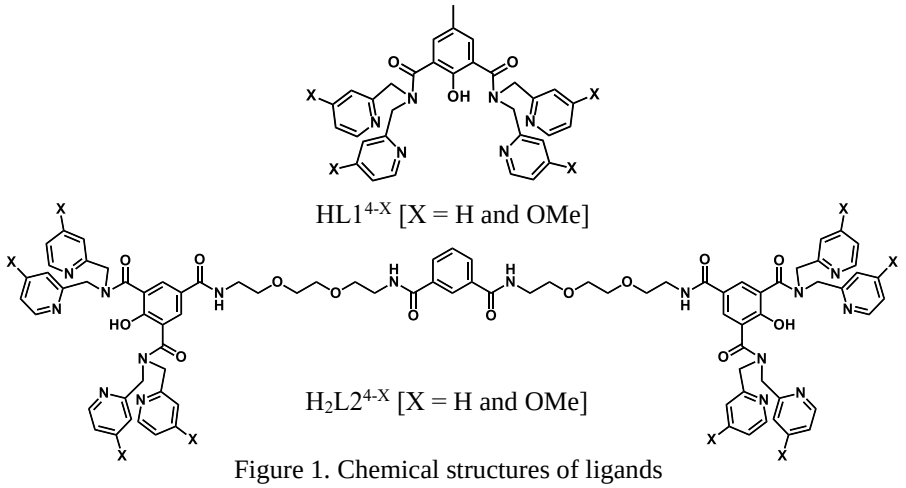


Figure 1. Chemical structures of ligands

[1] Solomon, E.I. et.al., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4719–4733.

[2] Roelfes, G. et al. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1723–1733.

抗 EpCAM アプタマー修飾金フィルターを用いた CTC の捕捉

○林 榛菜[1], 北村 裕介[1], 中島 雄太[1], 安田 敬一郎[2], 岩槻 政晃[3],熊本 清太郎[2], 勝田 陽介[1], 中西 義孝[1], 馬場 秀夫[3], 井原 敏博[1] ([1]熊本大院先端, [2]株式会社オジックテクノロジーズ, [3]熊本大院生命)

Specific capture of circulating tumor cells by anti-EpCAM aptamer-modified filters. (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University[1]; OGIC technologies Co., Ltd[2]; Faculty of Life Sciences, Kumamoto University[3]) Haruna Hayashi[1]; Yusuke Kitamura[1]; Yuta Nakashima[1]; Keiichiro Yasuda[2]; Masaaki Iwatsuki[3]; Seitaro Kumamoto[2]; Yousuke Katsuda[1]; Yoshitaka Nakanishi[1]; Hideo Baba[3]; Toshihiro Ihara[1]

【緒言】原発腫瘍組織から剥離し、血流に乗って全身を循環している細胞を血中循環腫瘍細胞（Circulating tumor cell, CTC）と呼ぶ。CTC は、簡易検査では判断が難しい微小癌などのがん患者においても確認されており、新たながん診断マーカーとして注目を集めている。しかしながら、血液 1 mL あたりにおよそ 50 億個の血球細胞が存在するのに対し、CTC はわずか数個～数十個しか存在しない。このため、その検出は容易ではなく、前処理として選択的に CTC を濃縮する工程を必要とする。本研究では、がん患者の全血中から CTC の選択的捕捉を試みた。細胞捕捉用の基体としてスリットの入った金フィルターを用いた（Fig. 1）。このフィルターは流体圧力に応じて開口する仕組みとなっており、開口度によっては血球細胞より大きいがん細胞の方がフィルター上に残存し易いことが期待される。また、多くの固形癌種の細胞膜上には EpCAM という膜タンパク質が高発現している。同フィルターに抗 EpCAM アプタマーを修飾させることで、サイズ選択的な物理的選別と標的特異的な結合親和性に基づいた化学的選別の二つの要素により腫瘍細胞が選択的に捕捉されることを期待した。

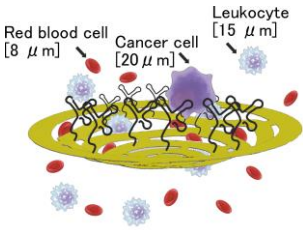


Fig. 1. 抗 EpCAM アプタマー修飾金フィルターによる細胞捕捉の概要図。

【実験】SAM 膜形成分子である 6-Mercapto1-hexanol と 5’末端抗チオール化 EpCAM アプタマーを、様々な割合で混合した。調製した混合溶液を、ピラニア溶液にて洗浄したフィルター表面に滴下し、25°C で 16 時間静置することで SAM 膜形成およびアプタマー修飾を行った。アプタマーの修飾密度はクロノクーロメトリーで測定した。続いて、あらかじめ細胞核を Hoechst33342 にて染色した MDA-MB-453（ヒト乳癌細胞）と HEK-293T 細胞（ヒト胎児腎細胞）をフィルターに通液し、洗浄後、フィルター表面を蛍光顕微鏡で観察した。がん患者の血液からも同様な手順にて CTC の捕捉を試みた。CTC の検出は免疫染色にて行なった。

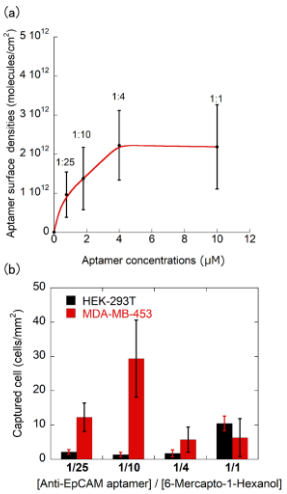


Fig. 2. (a)チオール化抗 EpCAM アプタマーと、6-Mercapto-1-Hexanol を様々な混合比率で修飾した時のアプタマーの修飾密度。両者の合計濃度を 20 μM に固定し、混合比率を変化させた。(b)アプタマー修飾金フィルターでの細胞捕捉の結果。

【結果および考察】アプタマーの修飾密度は、その混合比率と比例した（Fig. 2a）。細胞懸濁液 1 mL を流速 0.5 mL/h にてフィルターに通液したところ、SAM とアプタマーの割合が 10 : 1 であるフィルターにおいて最も多くの MDA-MB-453 が確認され、HEK-293T はほとんど観察されなかった（Fig. 2b）。これより、腫瘍細胞の捕捉数は適切なアプタマー修飾密度において最も多くなることが示唆された。続いて食道胃接合部がん患者の血液 1 mL を用いて実験を行ったところ、4 個の CTC が確認された。抗がん剤治療後に再度実験を行ったところ、CTC の捕捉数は 1 個に減少し、患者の病態との相関が確認された。一方健常者の血液を通液したフィルターからは、腫瘍細胞は確認されなかった。

3 種の酵素を用いたクレアチニン検出用バイオ電極の作製

○原口真綺[1]・中村暢文[1]（[1]東京農工大院工）

Preparation of bioelectrodes for creatinine detection using three enzymes (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1]) HARAGUCHI, Maki[1]; NAKAMURA, Nobuhumi[1]

クレアチニンは筋収縮の際にエネルギー源となるクレアチンの代謝産物であり、その 1 日の尿中排出量は筋肉量によりほぼ一定である。随意尿中クレアチニン濃度を尿中成分濃度の補正に利用するため、簡便なクレアチニン測定法が必要とされる。その一例として、酵素電極を用いて電気化学的かつ特異的に尿中クレアチニンを検出するアンペロメトリッククレアチニンバイオセンサがある。アンペロメトリッククレアチニンバイオセンサとしては Creatininase (CRN)、Creatinase (CN), Sarcosine Oxidase (SOx)の 3 段階の酵素反応を利用するものが多い。これによりクレアチニンがクレアチンに、クレアチンがサルコシンに、サルコシンがグリシンに変換され、最後の酸化反応電流を観測する(Fig. 1)。このような複雑な機構からアンペロメトリッククレアチニンバイオセンサの開発には改善すべき点が多くある。SOx は電極と電子の授受が直接にはできないため、SOx と電極間の電子移動反応を仲介する酸化還元物質(メディエータ)が必要となる。SOx のメディエータとしてはフェロセンカルボン酸 (FcCOOH) が有効であることが知られている [1)]。電極への酵素の固定法の一つとしてポリカチオンとポリアニオンの静電的相互作用を利用したポリイオンコンプレックス(PIC)による包括固定が挙げられる。これまでに当研究室では、他の酵素で poly-L-lysine (PLL)および poly-L-glutamic acid (PGA)を組み合わせた PIC による固定化が有効であることを確認している。本研究では、尿中クレアチニン検出用バイオ電極の作製を目的とし、PLL と PGA を組み合わせた PIC による 3 種の酵素の固定化とレドックスポリマー（FcCONH-PLL）によるメディエータの固定化も試みた。



Fig. 1. Schematic illustration of creatinine detection on a bioelectrode using three different enzymes.

グラッシーカーボン電極上に PLL、PGA と酵素の混合液をキャスト、風乾して酵素を固定した。作製した電極を作用極とし、フェロセンカルボン酸をメディエータに用いてサイクリックボルタンメトリー(CV)測定を行った。初めに、電極と電子移動を行う SOx のみについて PIC による電極への固定化を試みた。PIC を形成する PLL および PGA の濃度を変化させた電極を複数作製し、適切な PLL と PGA の濃度について検討した。CV 測定の結果、25 mM の PLL および PGA を用いた場合にサルコシンの酸化反応に由来する触媒電流が明瞭に確認できた。したがって、以後の実験では 25 mM の PLL と PGA を用いて PIC を形成させた。続いて、CRN、CN、SOx の 3 種の酵素の固定化について検討した。電極上へキャストする混合液中の 3 種の酵素の濃度比を決定するため、(CRN : CN : SOx = 0.25 : 1 : 1)、(CRN : CN : SOx = 0.25 : 1.5 : 1)または(CRN : CN : SOx = 0.25 : 2 : 1)に調製した電極を作製し、CV 測定を行った。その結果、(CRN : CN : SOx = 0.25 : 2 : 1)の場合にクレアチニン存在下で触媒電流が確認できた。次に、レドックスポリマーを利用したメディエータの固定を検討した。PLL とフェロセンカルボン酸を EDC、NHS を用いて縮合させてレドックスポリマーFcCONH-PLL を作製した。電極上に PLL、PGA、FcCONH-PLL と SOx の混合液をキャスト、風乾してメディエータと SOx を固定した。CV 測定の結果、サルコシン存在下で触媒電流が確認できた(Fig. 2)。

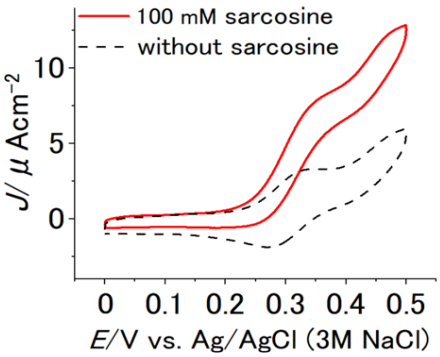


Fig. 2. Cyclic voltammograms of PLL (FcCONH-PLL-SOx) PGA/GCE in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Scan rate 10 mVs^{-1}.

1) U. Lad, G. Kale, and R. Bryaskova, *J. Electrochem. Soc.*, **161**, B98 (2014).

組織イメージングを指向したヘム選択的生体分子修飾化剤の開発

○垣内 亮[1]・平山 祐[1]・辻 翔平[1]・嶋澤 雅光[1]・田村 朋則[2]・浜地 格[2]・
辻 美恵子[1]・永澤 秀子[1]（[1]岐阜薬大院薬、[2]京大院工）

Development of heme-selective biomolecule-labeling probes for tissue imaging (Gifu Pharmaceutical University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2]) KAKIUCHI Ryo[1]; HIRAYAMA Tasuku[1]; TSUJI Shohei[1]; SHIMAZAWA Masamitsu[1]; TAMRA Tomonori[2]; HAMACHI Itaru[2]; TSUJI Mieko[1]; NAGASAWA Hideko[1]

【背景】ヘムは二価鉄とポルフィリンの複合体であり、ヘムタンパク質として酸素運搬、電子伝達、酵素反応などの生理的に重要な機能を担う。一方、タンパク質非結合・弱結合型のヘム（遊離ヘム）も存在し、種々のシグナルや、酸化ストレスに関連する。特に、その高い細胞毒性のために、病理学的にも重要な化学種である。しかしながら、ヘムの輸送体やトランスポーター等、ヘムの細胞内・体内動態は現在も不明な点が多く、ヘムの細胞内動態解明のための有用な分析手法も少ない。当研究室ではごく最近、ヘム鉄選択的発蛍光型プローブ H-FluNox を開発した(*J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 3793.)。H-FluNox はヘムに対して高い選択性と応答性を示し、生細胞イメージングで遊離ヘムを検出することに成功している。一方、よりマクロな系である生体組織でヘムを検出しようとした場合、小分子は固定・洗浄操作で流出してしまうため、小分子蛍光プローブを使用するのは困難である。そこで本研究では、遊離ヘムにより活性化され、生体組織に共有結合するプローブ分子を開発し、生体組織でのヘムイメージングを実現することを目指した。

【方法】当研究室でこれまでに開発した二価鉄選択的蛍光プローブにおいて、第三級アミン *N*-オキシドの脱酸素化反応の際、*N*-オキシドを酸素源として鉄オキソ種の生成が示唆されたことと(*Chem. Sci.*, **2017**, *8*, 4858.)、ヘムが遊離の二価鉄よりも鉄オキソ種の生成効率が高いことに着目し(*Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 377)、ヘムによって活性化され生体分子を修飾するフェニレンジアミン-*N*-オキシド(PDANO)構造を開発した(図 1)。PDANO の *N*-オキシドがヘムにより脱酸素化されると、鉄-オキソ種とフェニレンジアミン(PDA)が生成する。フェニレンジアミンは鉄オキソ種により容易に酸化され、ラジカルカチオンとなり、近傍の生体分子と共有結合を形成する。以上の分子設計を基盤とし、*in vitro* 及び細胞・組織イメージング実験用にそれぞれフルオレセインを導入した AANox と、ヘム生合成の場であるミトコンドリアを標的とした MtAANox を合成し、機能を評価した。

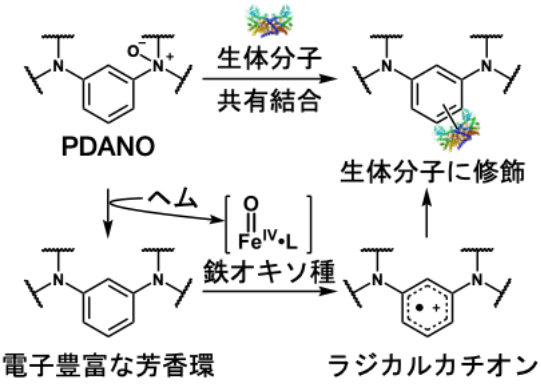


図1. ヘム選択的生体分子修飾化反応の機構

【結果】まず、AANox を用いて、試験管中でウシ血清アルブミンのラベル化実験を行ったところ、ヘム存在下でのみラベル化が進行することがわかった(図 2)。次に、MtAANox を用いて、蛍光イメージングを実施したところ、5-アミノレブリン酸を投与してヘム合成を誘導した場合、強い蛍光シグナルが検出され (図 3)、メタノール固定後でも顕著な蛍光シグナルが検出された。本発表では MtAANox を用いたオミクス解析、組織イメージングの詳細についても述べる。

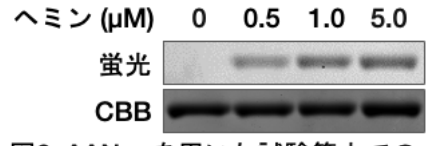


図2. AANoxを用いた試験管中でのヘム選択的生体分子修飾反応の評価

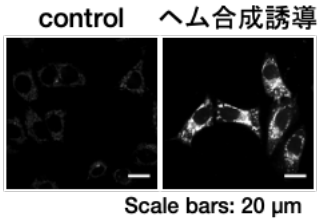


図3. MtAANoxを用いた生細胞でのヘム選択的生体分子修飾反応の評価

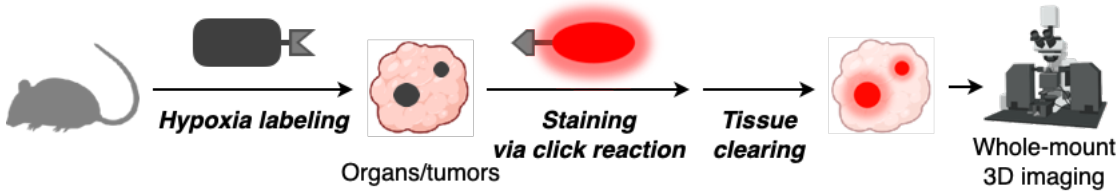
銅触媒クリック反応による低酸素環境の三次元蛍光イメージング法の開発

○田村伊織[1]・坂本大地[1]・伊博[1]・齋藤雄太朗[1]・山田直生[1]・高草木洋一[2]・久保田晋平[3]・田井中一貴[4]・山東信介[1]（[1]東大院工・[2]量子科学技術研究開発機構・[3]北大遺伝子病制御研究所・[4]新大脳研究所）

Development of a three-dimensional fluorescence imaging method for hypoxia utilizing Cu-catalyzed click reaction (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology[2], Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University[3], Brain Research Institute, Niigata University[4]) TAMURA, Iori[1]; SAKAMOTO, Daichi[1]; YI, Bo[1]; SAITO, Yutaro[1]; YAMADA, Naoki[1]; TAKAKUSAGI, Yoichi[2]; KUBOTA, Shimpei[3]; TAINAKA, Kazuki[4]; SANDO, Shinsuke[1]

組織透明化技術は、生体組織を丸ごと深部まで蛍光観察できる技術として近年注目されている。生体組織の構造や生体分子の局在を、全身・臓器スケールかつ一細胞レベルの高い解像度で 3D 解析できる本技術は、医学・生物学研究での活用が広がっている。先行研究では、抗体染色や蛍光タンパク質の遺伝的導入などにより、架橋剤によって固定化可能なタンパク質や核酸といった生体分子を可視化した形態学的な解析が主流である。一方、疾患や生命現象の解明には、形態学的解析に加えて、小分子の濃度や酵素活性といった動的微小環境の解析が重要である。そこで本研究では、動的微小環境の一例として、がんをはじめとする様々な疾患と関連する低酸素を標的として設定し、透明化組織における低酸素環境の蛍光イメージング手法の開発を目的とした。

本研究では、組織摘出とともに失われてしまう低酸素環境を記憶させるために、低酸素に応答して近傍のタンパク質と共有結合を形成する分子プローブを用いることとした。また分子プローブの物性・体内動態や他の標的への応用可能性を考え、低酸素応答・結合部位と蛍光団をクリック反応タグによって分割することで、生体中での低酸素標識と、摘出後組織中でのクリック反応による蛍光標識という 2 ステップにより低酸素領域を可視化する戦略をとった。クリック反応としては生体組織中の安定性や反応特異性を考慮し、反応タグが安定で副反応の少ない銅触媒を用いたアジド–アルキン環化付加反応（CuAAC）を選択した。以上の戦略に従い、従来の低酸素分子プローブを母骨格にアルキンタグを導入した分子プローブと、アジド基を導入した蛍光色素を設計・合成した。実際に、腫瘍・腎・肝組織に対するこれら分子群の低酸素標識能の評価と組織透明化イメージングへの適用を行った。本発表ではその成果について報告する。



©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

コロニーの形態や光学特性を利用したコロニーフィンガープリント法に基づく食中毒菌同定モデルの開発

○多胡光[1]・田中雄介[1]・染谷拓海[1]・前田義昌[1]・林泰圭[2]・原田学[2]・吉野知子[1]・松永是[1]・田中剛[1]（東京農工大学院工[1]、株式会社マルコム[2]）

Development of Identification Model for Foodborne Pathogens Based on Colony Fingerprinting Using Colony Morphology and Optical Properties (Division of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1], Malcom Co., Ltd.[2]) TAGO, Hikaru[1]; TANAKA, Yusuke[1]; SOMEYA, Takumi[1]; MAEDA, Yoshiaki[1]; LIM, Tae-Kyu[2]; HARADA, Manabu[2]; YOSHINO, Tomoko[1]; MATSUNAGA, Tadashi[1]; TANAKA, Tsuyoshi[1]

飲食品製造現場において、病原性微生物の混入は製品の劣化や腐敗、食中毒を引き起こし、公衆衛生上の問題となる。病原性微生物の混入事故を防ぐために、原材料の受入の段階で存在確認が行われている。一般的な検査法である培養法は、信頼性が高い一方で、迅速性や簡便性に欠ける。そのため、培養法は日々検査を行う食品現場には適しておらず、迅速・簡便化が求められてきた。これまで迅速・簡便法として、PCR 法や、MALDI-TOF-MS 法が開発されてきたが、使用機器や試薬が高価なため、中小零細企業が中心である食品製造業に導入することは実態に即していない。したがって、上記の手法と同等に迅速かつ簡便でありながら、より安価な手法が求められている。そこで、当研究室ではコロニーに光を照射し、得られた光学パターンから機械学習によって菌種同定を行うコロニーフィンガープリント法 (colony fingerprinting (CFP)法)を開発してきた[1,2](Fig. 1)。本研究では、コンセプト証明に向けて、9 属 20 菌種からなる CFP ライブラリを構築し、菌種同定を行なった。

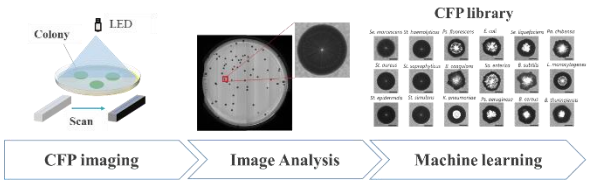


Fig. 1 Overview of bacterial species identification by the CFP methodology.

食品混入微生物として広く知られている真正細菌 20 菌種 (グラム陰性菌 7 種、グラム陽性菌 13 種)を対象として CFP を撮像した。得られた CFP から、形態や光学パターンおよび成長速度を定量する 16 種類の画像特徴量を算出した。続いて、XGBoost を用いて機械学習を行い、菌種を予測した。その結果、判別精度は最高で 95%以上となり、高精度な同定が可能であることが確認された。

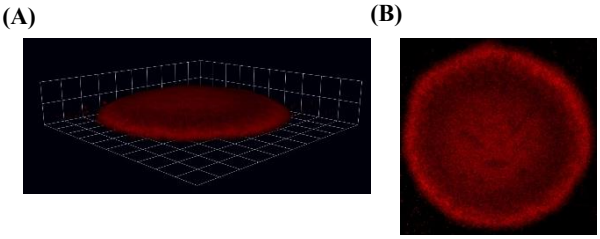


Fig. 2 Fluorescent images of (A) spatial structure and (B) surface structure of *Escherichia coli* colony.

次に、菌特異的な CFP パターンを生じさせる要因の解明にむけ、共焦点顕微鏡を用いてコロニーの 3D 撮像を行った。Nile Red を混合した寒天培地上で GFP を発現した *E. coli* を培養した結果、ドーム状のコロニー形態が認められた (Fig. 2A)。また、コロニー表面において、CFP の中心に表れる輝度値が高い領域と関連する構造は確認されなかった (Fig. 2B)。これより、コロニーが平凸レンズのように、入射光を散乱・集光させた結果、CFP パターンが生じていることが示唆された。

1) Y. Maeda, Y. Sugiyama, A. Kogiso, T. K. Lim, M. Harada, T. Yoshino, T. Matsunaga, T. Tanaka, *Sensors*, 18, 9 (2018).

2) Y. Maeda, Y. Sugiyama, T. K. Lim, M. Harada, T. Yoshino, T. Matsunaga, T. Tanaka, *Biosens Bioelectron* 146, 15 (2019)

フェニルボロン酸含有人工核酸を用いた代謝物解析手法の開発

○本橋優人・西原達哉・田邉一仁（青学大院理工）

Development of system for metabolite analysis using phenylboronic acid-modified artificial oligonucleotides

(Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) MOTOHASHI, Yuto; NISHIHARA, Tatsuya; TANABE, Kazuhito

近年、疾病診断、及び病態の解明に向けて、代謝物が注目されている。とりわけ標的代謝物を単一細胞レベルで解析することは、より詳細な病態の分子メカニズムの解明が期待できることから、広くその手法論の開発が求められている。これまで、代謝物の単一細胞解析には、キャピラリー電気泳動-質量分析法 (CE-MS) などが利用され、アミノ酸を中心に複数成分の代謝物解析が実現されてきた。しかし、CE-MS では 1 細胞ごとの解析が前提とされるため、細胞数をスケールすることは、困難とされてきた。

この課題を解決するため、本研究では次世代シーケンサー (NGS) に着目した。現在、シングルセルトランスクリプトームにおいて、細胞情報を DNA 配列情報に紐づけた後に、NGS による解析を行うことで膨大な数の細胞へ適用可能となっている。すなわち、標的代謝物情報、及び細胞情報を DNA 配列情報へと変換することができれば、NGS による代謝物解析が多数の細胞に対して適用できると考えた。本研究で考案したシステムを **Figure 1** に示した。まず、標的代謝物と反応する官能基を末端に備えた DNA をビーズ上に積載し、標的代謝物と反応後の DNA のみを選択的に回収する。その後、NGS による一斉定量解析を行うことで、代謝物のハイスループット解析の実現を目指した。

本研究では、標的代謝物として乳酸を選択し、代謝物情報を DNA 配列情報へ置き換え可能か検証した (**Figure 1.**)。乳酸の情報を DNA 配列情報へ置き換えるにあたり、フェニルボロン酸を末端に有する人工核酸 (PheBA-ODN)、及び乳酸オキシダーゼ (LOx) を活用した。LOx は、乳酸と反応することにより過酸化水素 (H_2O_2) を産生する。一方、PheBA-ODN は、H_2O_2 との反応でアミノ基末端の人工核酸 (ODN-NH_2) を生成物として与える。このようにして得られた ODN-NH_2 に対して、回収用タグとしてビオチンを付加した後、ストレプトアビジン修飾した磁性ビーズで回収・定量することで乳酸の定量を行うこととした。

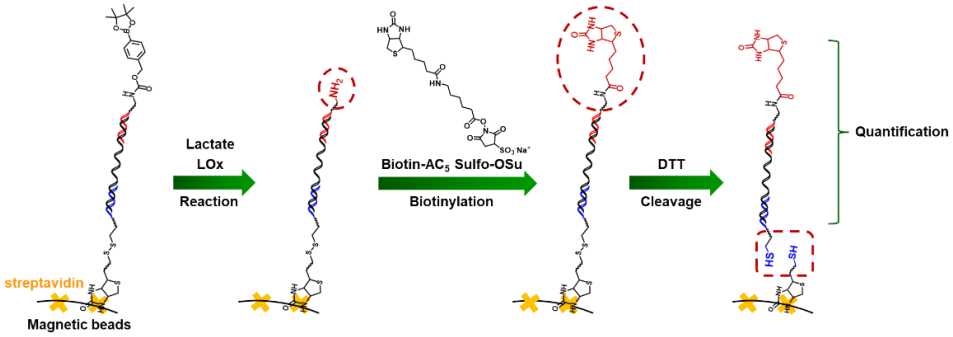


Figure 1. Schematic illustration of lactate quantification using PheBA-ODN on magnetic beads.

まず、乳酸を含む水溶液に対して、LOx、及び PheBA-ODN を添加した後、HPLC にて反応を追跡した。その結果、LOx と乳酸の反応に伴い H_2O_2 が産生し、乳酸濃度に依存して ODN-NH_2 が得られることが確かめられた。次に、磁性ビーズ上に PheBA-ODN を担持し、乳酸の有無に応じて、DNA が回収可能か検証した。具体的には、PheBA-ODN を担持したビーズに対して、乳酸、及び LOx を加え反応させた後、ビオチン化反応試薬 (Biotin-AC_5 Sulfo-OSu) を含む溶液と置換し、ビオチン化した。続いてビーズと DNA の間に設けたジスルフィド結合を DTT によって切断し、上澄を回収した。上澄中に含まれる DNA を定量 PCR により定量した結果、乳酸の存在下で回収 DNA の有意な増加を確認した。本発表では、これら詳細について報告する。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

機能化薄層クロマトグラフィーを用いた組織内グルタチオンイメージング

○西田光輝・西原達哉・田邉一仁（青学大院理工）

Glutathione Imaging in Frozen Tissue Slice Using Functional Thin-Layer Chromatography (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) NISHIDA, Koki; NISHIHARA, Tatsuya; TANABE, Kazuhito

様々な種類の細胞が集まり構成される組織は、その領域ごとに固有の機能を発現している。そのため、組織内に含まれる生体分子の空間分布解析は、生命現象の詳細な理解において有用である。現在、組織内の代謝物は、凍結組織切片に対してイメージング MS を行うことで、その空間分布解析が実現されている。また、豊富な MS スペクトルデータを活用することで多数の代謝物解析も可能である。しかしながら、定量性の乏しさや、解析時間の長さ、装置依存の解析など、多くの課題を抱えている。以上を踏まえ、本研究では、標的代謝物に対する蛍光ラベル化剤をコートした薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いることで、組織内に含まれる代謝物を、簡便かつ、迅速に定量することを目指した。

今回は、グルタチオン (GSH) を標的分子とし、本方法論の実現可能性を検証した。GSH は、酸化還元を担う主要な分子種であり、近年の研究において、がんやアルツハイマー病などの様々な疾病、さらには老化などとの関連が示唆されている重要な分子種である。GSH の検出にあたり、まず初めに、GSH ラベル化剤 (GLA) を設計し、合成した (Fig. 1)。GLA は光解離性リンカー (o-ニトロベンジル) を介して、蛍光色素 (1-ピレンメチルアミン、PMA) 、及び GSH のチオール基と選択的に反応するマレイミド基を備えている。次に、GLA をコートした TLC を用いた代謝物解析を以下に示す。まず、合成した GLA を TLC に塗布する。その後、凍結組織切片を数秒間スタンプし、TLC 上で、組織中の GSH と GLA を反応させる。GSH ラベル化剤 (GLA) と生成物 (GLA-GSH) は極性が大きく異なるため、順相 TLC を用いると生成物を反応部位に保持可能となる。最後に、TLC への紫外光照射によりラベル化剤から蛍光色素 PMA を放出させる。PMA 由来の蛍光発光を定量し、標的分子である GSH の位置、及び量を解析する。

実際に、GSH 入りのアガロースゲルを用いた評価を行ったところ、GSH 添加ゲルを静置した際に、ゲルの形状を保持したまま蛍光が観察された。また、添加する GSH 濃度に応答し蛍光量が線形的に増加した。以上より、GSH の存在位置、及び量を解析可能であることが示唆された。さらに、本方法論を GSH が豊富に含まれる肝臓の凍結切片に対し適用したところ、肝臓由来の GSH と反応し、青色の蛍光発光が検出されることを確かめられた。本発表では、これらの詳細について報告する。

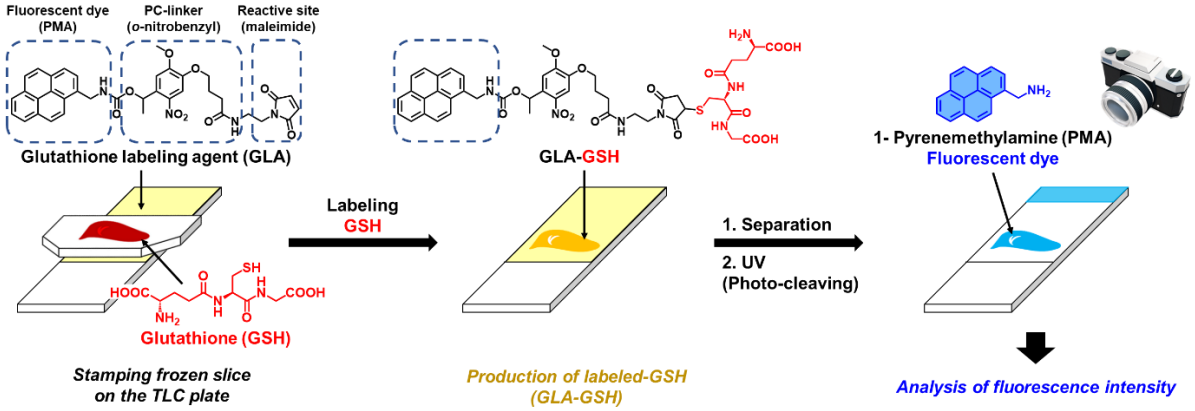


Fig. 1. Schematic illustration of GSH imaging in the frozen slice using functional thin layer chromatography.

「ヒト細胞直交性」の酵素・基質群の開発と細胞のマルチカラー増感分析への適用

○金子諒右[1]・立石宙也[2]・谷戸謙太[2]・山中皓太[2]・神谷典穂[1,4]・竹川薫[5]・新居輝樹[1]・岸村顕広[1,3]・森健[1]・片山佳樹[1,3]（[1]九大院工・[2]九大シス生・[3]九大分子CMS・[4]九大 未来化学創造センター・[5]九大院農）

Development of a group of enzymes and substrates of "human cell orthogonal" and its application to multiple colored sensitization analysis of cells (Graduate School of Engineering, Kyushu University [1], Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University [2], Center for Molecular Systems, Kyushu University [3], Kyushu University Center of Future Chemistry [4], Graduate School of Agriculture, Kyushu University [5]) RYOSUKE, Kaneko[1]; CHUYA, Tateishi[2]; KENTA; Tanito[2]; KOTA, Yamanaka[2]; NORIHO, Kamiya[1,4]; KAORU, Takekawa[5]; TERUKI, Nii[1]; AKIHIRO, Kishimura[1,3]; TAKESHI, Mori[1], YOSHIKI, Katayama[1,3]

【緒言】細胞や組織などの生体サンプルにおけるバイオ分析において、検出感度の向上のために酵素増感反応が用いられる。従来広く用いられてきた増感酵素は西洋わさび由来ペルオキシダーゼ（HRP）やアルカリホスファターゼ（ALP）、β-ガラクトシダーゼ（β-gal）である。しかし、これらの酵素を細胞上のタンパク質検出に用いる際は、細胞に内在する酵素活性が問題となる[1]。加えてこれらの酵素は反応条件が異なるため、同時の利用に適していない。そこで我々は、新しいバイオ分析用の酵素として、ヒト細胞に内在せず、同一の条件下で反応し、互いに交差反応しないものを探索した。見出した酵素のうち α-L-アラビノフラノシダーゼ（α-araf）[2]、α-L-ラムノシダーゼ（α-rha）、β-キシロシダーゼ（β-xyl）の分析酵素としての特性を調べた。これらに対応する turn-on 型の蛍光波長の異なる 3 つの基質を用意したのち、これまでに報告のない試みとして、In cell ELISA での細胞のタンパク質分析を試みた（Fig. 1）。

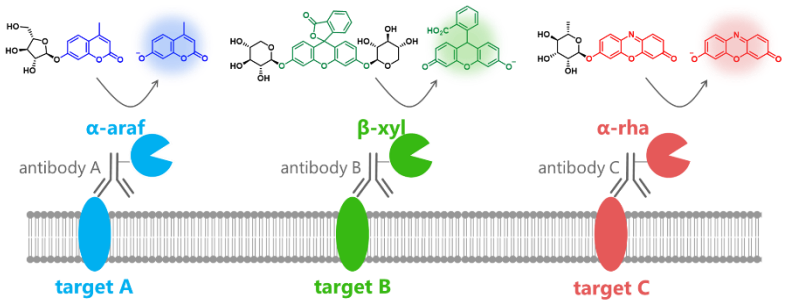


図 1 In cell ELISA での多色分析の概念図

【実験】ビオチン化した酵素及び抗体を、ストレプトアビシン(SA)によって架橋させた。酵素：SA：抗体 ＝3:15:3 μg/mL となるように混合し、18 時間 4℃で架橋させた。酵素がおよそ 1.0 μg/mL となるように 2.0×104 個の SK-BR3 細胞に添加し 4 ℃で 1 時間反応させた。洗浄の後、クマリンの α-アラビノフラノシド基質、レゾルフィンの α-ラムノピラノシド基質、フルオレセインの β-キシロピラノシド基質 100 μM を添加して室温で 1 時間反応させ、蛍光強度を測定した。

【結果と考察】生体サンプルでの低バックグラウンドな分析に有効な増感酵素として α-araf、α-rha、β-xyl を見出した。これらを SK-BR3 細胞上の 3 種の抗原（EGFR、HER2、EpCAM）の同時検出に適用した。これにより 3 種の抗原を同時に増感検出できたことが示された。薬剤や抗体のスクリーニングに有用な In cell ELISA において初となる同時 3 標的分析を達成した。

1) Z. Liu, et. al. J. Immunol. Methods 2000, 234, 153.
2) R. Kaneko, et. al. Chem. Lett. 2021, 50, 1493.

乳酸応答タンパク質内包固定化不織布の開発

○加藤柚奈・水野稔久（名工大院工）

Development of electrospun fibermats, encapsulating the lactate-respondent protein (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) KATO, Yuna; MIZUNO, Toshihisa

これまで当研究室では、蛋白質や機能性核酸などの生体高分子を不織布繊維内部に内包固定化する手法を検討してきており、紡糸途中に架橋反応が進行する後架橋可能な水溶性高分子を利用する SCES（In ***S***itu ***C***rosslinking during ***E***lectro-***S***pinning）法を確立することで、これらの変性を抑えた内包固定化に成功している。これまでに、この手法が適応可能な後架橋可能な親水性高分子の１つとして、生体適合性の高いメタクリルアミド系モノマー2-Hydroxylpropyl-methacrylamide（HPMA）とケトン基を側鎖に持つ Diacetone methacrylamide（DAMA）からなるコポリマーPoly (HPMA/DAMA)、この架橋剤として adipic dihydrazide (ADH)、また表面コートする疎水性高分子として Nylon 6 を用いた検討を行ってきており、これらを電界紡糸することで、均一な繊維径、コアシェル構造を持つ水に不溶な不織布の作製に成功している。本研究ではこちらを用いた蛍光センサー蛋白質内包固定化コアシェル不織布の作製を行なった。内包する蛋白質として、L-乳酸応答性の緑色蛍光バイオセンサーとして知られる eLACCO1.1（**Fig.1**）(*Nature Communications 2021*)を選択し、大腸菌発現系にて発現精製行ったものを不織布の繊維内部に内包固定化した状態にて機能評価を行なった。

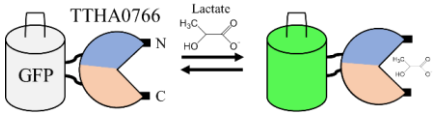


Fig. 1 Schematic diagram of the lactate sensor eLACCO1.1. Conformational changes associated with lactate binding to the TTHA0766 protein are converted to changes in GFP fluorescence intensity.

eLacco1.1 の蛋白質発現は大腸菌 DH10B 株を用いて行い、L-arabinose による発現誘導後 16 ℃で 18 時間培養することにより行った。集菌後、菌体を超音波破砕し、遠心分離後の上清画分を His-Tag カラムにて精製することにより、文献での報告通りに eLacco1.1 を可溶性蛋白質として得た。その後、アミコンによるバッファー交換と濃縮を行なった。eLacco1.1 を繊維内部に内包固定化した不織布作製は、コア繊維成分として Poly (HPMA/DAMA)/ADH、シェル成分として Nylon 6 用いた SCES 法により行なった。コア繊維の前駆体水溶液に、緑色蛍光蛋白質 eLacco1.1 を添加することで、繊維内部への eLacco1.1 の内包固定化は行なった。得られた不織布に対する SEM 測定から、均一な繊維径からなる繊維積層構造の形成、TEM 測定からはコア-シェル構造を持つナノ繊維の形成が確認され（**Fig. 2**）、eLacco1.1 を内包したとしても、不織布ナノ繊維の構造形成は維持されることがわかった。eLacco1.1 を内包固定化したコア-シェル不織布のセンサー機能の評価は、30 mM MOPS バッファー（pH 7.0）、100 mM KCl、1 mM $CaCl_2$ に浸漬後、0~1.0 mM の L-lactate を不織布に添加し、共焦点顕微鏡観察を行うことによりに行なった（**Fig. 3**）。その結果、添加される乳酸濃度と蛍光発光強度に正の相関が得られ、不織布の繊維内部に内包固定化されていても、蛍光センサー蛋白質 eLacco1.1 は必要な構造変化が可能であり、機能を維持できることが分かった。

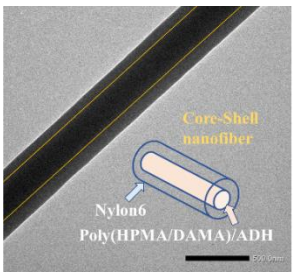


Fig. 2 TEM images of nanofibers in the eLacco1.1-encapsulated core-shell fibermat, consisting of Poly(HPMA/DAMA)/ADH (for core fibers) and Nylon 6 (for shell unit). To get brightness contrast for core and shell portion, phosphotungstic salt was added to the precursor solution of core unit (D = 411.5 ± 16.9 nm).

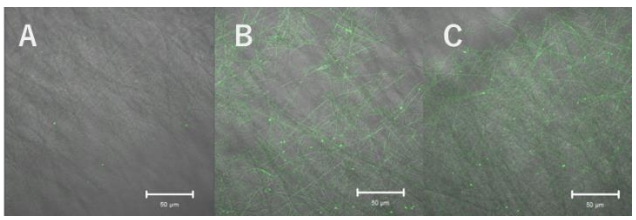


Fig. 3 Confocal microscope images of the core-shell fibermats, encapsulating eLacco1.1, after addition of lactic acid with different concentrations (**A:** 0 mM, **B:** 0.5 mM, **C:** 1.0 mM).

コルチゾール認識ナノ抗体の蛍光免疫センサー化

○井上暁人 [1]・鈴木大凱 [1]・Yinghui Yang[1]・安田貴信 [2]・朱 博 [2]・北口哲也 [2]・上田宏 [2]（[1]東工大生命理工、[2]東工大化生研）

Structure-based design of fluorescent immunosensor using anti-cortisol nanobody (School of Life Science and Technology, Tokyo Tech[1], Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Tech[2]) INOUE, Akihito[1]; SUZIKI, Taiga[1]; YANG, Yinghui[1]; YASUDA, Takanobu[2]; ZHU, Bo[2]; KITAGUCHI, Tetsuya[2]; UEDA, Hiroshi[2]

ナノ抗体はラクダ科動物に由来する重鎖抗体の可変部位であり、安定性が高く、大腸菌等での発現が容易であることから、免疫測定法の新たな結合素子として注目を集めている。我々は以前、抗がん剤・免疫抑制剤であるメトトレキサートを認識するナノ抗体(NbMTX)を用いて、蛍光免疫センサーQuenchbody (nano Q-body)を構築することに成功した [1)]。Q-body は、抗体断片の抗原結合部位近傍に修飾した蛍光色素が近くの Trp 残基によってクエンチされ、それが抗原結合に伴う構造変化により解消されることで蛍光応答を示す。ナノ抗体も Trp 残基が保存されているため Q-body となりうるが、抗体ごとに抗原の結合様式がかなり異なるため、nano Q-body の設計はより難しい問題があった。そこで今回、NbMTX と比べて Trp 残基の位置と抗原の結合する部位が少しだけ異なる、構造既知のコルチゾール認識ナノ抗体 (NbCor) [2)] (Fig. 1)をモデルとし、立体構造に基づく nano Q-body の合理的な設計を試みた。

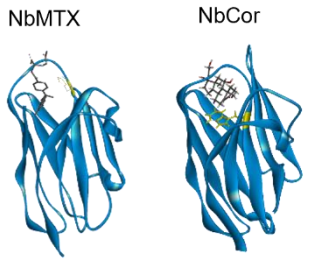


Fig. 1 Comparison of X-ray structure between NbMTX and NbCor. The gray molecule represents antigen and yellow amino acid represents Trp residue.

まず NbMTX と同様の設計で野生型 NbCor (WT)の N 末端に蛍光色素 5-TAMRA を修飾したが、クエンチが確認されなかった。そこで構造上、色素が Trp と相互作用しにくいと考え、N 末端に近い Thr28 を Trp にした変異体(T28W)を作製した。さらに色素としてより抗原結合ポケットに入りやすいと考えられる BDP TMR を使用し、蛍光偏光測定を行った。その結果、5-TAMRA で標識した T28W が約 2 倍の抗原への蛍光応答を示すようになった。一方 BDP TMR 標識体は WT と T28W の両方が抗原依存的蛍光偏光解消を示した(Fig. 2)。

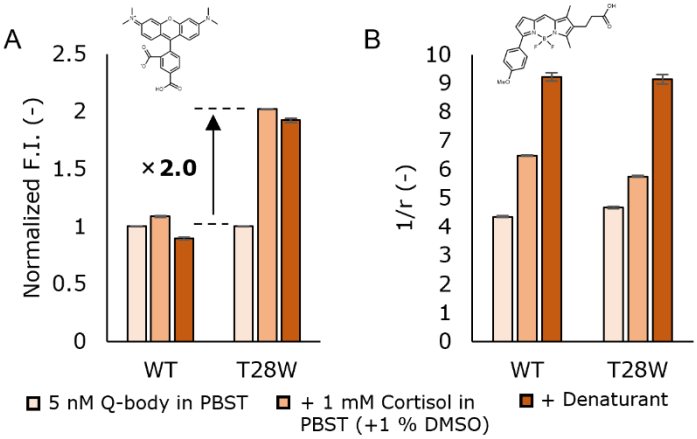


Fig. 2 (A) Normalized fluorescence intensity of 5-TAMRA labeled WT and T28W NbCor. The intensities were normalized by the mean fluorescence intensity of 1 nM Q-body in PBST. (B) Fluorescence polarization assay of BDP TMR labeled WT and T28W NbCor. 1/r shows the dye mobility. The dye structures of 5-TAMRA and BDP TMR are depicted on the top of each graph. The signal upon addition of denaturant indicates maximum response. Error bars represent ± 1 SD (n = 3)

以上の結果から、コルチゾールを認識するナノ抗体の認識部位を立体構造に基づいて改変することで、蛍光免疫センサー化できることが示された。今後変異導入によりこれらのナノ抗体の親和性向上と特異性改変を行うことで、他の低分子に対する高性能な nano Q-body 構築の指針としたい。

1) Inoue, A., Ohmuro-Matsuyama, Y., Kitaguchi, T., Ueda, H., *ACS Sensors* **5**, 3457–3464 (2020).
2) Ding, L. *et al., FEBS Lett.* **593**, 1248–1256 (2019).

イヌ尿路上皮がん由来 CTC 検出に向けたプロトコル確立

○三浦遼[1]・臼井達哉[2]・山本晴[2]・皆上大吾[2]・田中剛[1]・吉野知子[1]（[1]東京農工大院工、[2]東京農工大院農）

Establishment of a protocol for detection of circulating tumor cells from the blood in canine urothelial carcinoma (Graduate School of Technology, Tokyo university of agriculture and technology[1], Graduate School of Agriculture, Tokyo University of agriculture and technology[2]) MIURA, Ryo[1]; USUI, Tatsuya[2]; YAMAMOTO, Haru[2]; AZAKAMI, Daigo[2]; TANAKA, Tsuyoshi[1]; YOSHINO, Tomoko[1]

イヌ尿路上皮がん (Urothelial Carcinoma: UC)は早期発見が困難であり、診断時には高悪性度かつ遠隔転移を伴い、現在の治療法による完全奏功が困難な疾患である。また、イヌが伴侶動物であることや、イヌ UC がヒト UC と類似していることによる動物モデルとしての利点をもつことからイヌ UC のさらなる解析が求められている。近年、低侵襲に得られる組織生検代替試料として、血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC) を用いた診断応用が期待されているが、イヌにおける CTC 研究は殆ど報告がない。当研究室では、末梢血からの CTC 回収に向けてサイズ及び変形能の違いにより CTC を回収可能な Microcavity array (MCA)法を開発し、ヒト臨床試験を進めている [1,2]。本研究ではイヌ末梢血における MCA 法の有効性の評価およびイヌ尿路上皮がん由来 CTC 検出への有用性を検討した。

CTC の回収には、微細貫通孔が配置された Ni 製の丸孔型 MCA (孔径: 8 μm、孔数: 4,000 または 1 万孔)または、長孔型 MCA (孔径: 8-30 μm、孔数: 4,000 孔)を用いた。健常犬血液にイヌ UC 由来細胞株を混合することで作製した罹患犬モデル全血を MCA で補足後、回収効率を算出した。その結果、1 万孔の MCA においては 94%の回収効率であり、4,000 孔の MCA では丸孔型及び長孔型において約 70%であることが確認された。

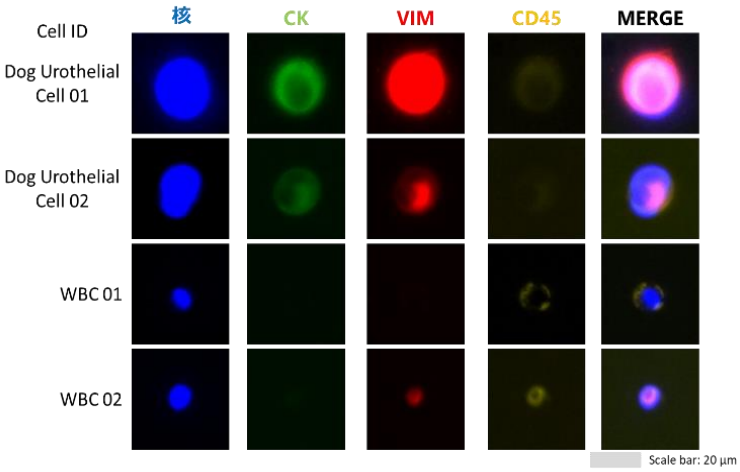


Fig. 2 Fluorescent images of a single dog UC cell or dog while blood cell (WBC) stained by DAPI, cytokeratin (CK), vimentin (VIM), CD45 entrapped on the MCA.

次に PBS 中にてイヌ UC 由来細胞株および健常犬由来白血球細胞(WBC)を混合して作製した罹患犬モデル全血を MCA (孔径 8 μm, 孔数 10,000 孔)を用いたフィルトレーションを行った。抗 CD45 抗体による WBC 染色後に、固定化、透過処理を行い、抗 Vimentin 抗体、抗 Cytokeratin 抗体、DAPI による染色を行った。蛍光観察を行うことで細胞株と白血球の識別を試みた結果、イヌ尿路上皮がん細胞株を DAPI+/Cytokeratin+/Vimentin+/CD45-で、WBC を DAPI+/Cytokeratin-/Vimentin±/CD45+で識別可能であることが確認された。これらの検討をもとに尿路上皮がん罹患犬に対しも、CTC 検出試験を実施している。以上より、本プロトコルを用いたイヌ尿路上皮がん由来 CTC の検出が可能であることが示唆された。

1) R. Negishi et al., *Biosens. Bioelectron*., 67, 438-442 (2015)
2) R. Negishi et al., *Commun. Biol.*, 5(1):20 (2022)

細胞内グルタチオン濃度変化のリアルタイム追跡を可能にするオルガネラ選択的近赤外蛍光プローブの創製

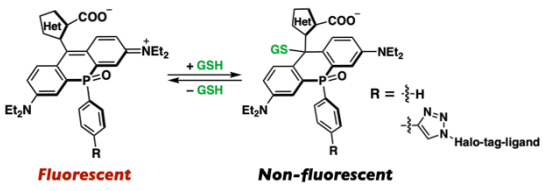
○師悠季[1]・Wu Qian[2]・多喜正泰[2]・山口茂弘[1,2]（[1]名大院理、[2]名大 ITbM）

Organelle-targeted NIR Fluorescent Probe for Real-time Monitoring of Glutathione (Graduate School of Science, Nagoya University[1], ITbM, Nagoya University [2]) MORO, Yuki[1]; WU, Qian[2]; TAKI, Masayasu[2]; YAMAGUCHI, Shigehiro[1,2]

細胞内抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) レベルの変化は、多様な細胞機能や疾病と関連することから、その生体内における動態を低侵襲で長時間にわたり観察可能な蛍光プローブの開発が望まれている。本研究では、近赤外蛍光色素であるホスファローダミンの高い求電子性を利用し、GSH の付加反応によって蛍光応答を示すプローブの開発に取り組んだ。

まず、GSH との親和性を制御するため、ローダミン骨格の 9 位に様々なヘテロアリール基を導入した一連の化合物 (**1**–**4**)を合成し、GSH との解離定数 $K_{d,GSH}$ を調べた。カルボキシフラン置換体 (**1**,**2**) とカルボキシチオフェン置換体 (**3**,**4**) を比較すると、より電子供与性が大きいカルボキシチオフェン置換体ではローダミン骨格 9 位の求電子性が低下し、大きな $K_{d,GSH}$ 値が得られた。また、構造異性体間で比較すると、ヘテロアリール基の 2 位で置換した化合物(**1**,**3**)の方が、3 位で置換した化合物 (**2**,**4**) に比べて小さな $K_{d,GSH}$ 値が得られた。これは、3 位で置換した化合物 (**2**,**4**) では、ヘテロアリール環 4 位の水素原子の立体的な効果により、ローダミン骨格 9 位の炭素原子に対する GSH の求核性が低下したためである。以上、ヘテロアリール基の電子的および立体的な効果により、GSH との親和性を制御することに成功した。化合物 **2** と **3** は、いずれも細胞内 GSH 濃度範囲に適した $K_{d,GSH}$ 値を示したが、化合物の安定性および細胞膜透過性の観点から、3-カルボキシチエニル基を導入した化合物 **3** を GSH プローブとして採用した。

Table 1. Photophysical Properties and $K_{d,GSH}$ Value of synthesized compounds [a].



		R	λ_{abs} /nm	λ_{fl} /nm [b]	ϕ_F [b]	$K_{d,GSH}$ / mM [c]
1		H	736	760	0.03	0.08
2		H	715	740	0.13	2.59
3		H	727	748	0.12	1.12
4		H	711	734	0.16	10.1

a) Measured in 200 mM HEPES buffer (pH 7.4 containing 0.03% DMSO); b) λ_{fl} = 670; c) Determined from absorption spectra.

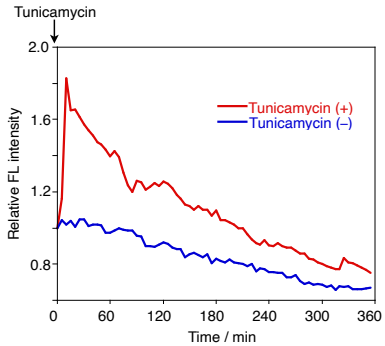


Figure 1. Relative FL intensity in ER stress induced by 1 μg mL^{-1} Tunicamycin.

次に、プローブの細胞内局在を制御するため、化合物 **3** に HaloTag リガンドを導入したプローブ **5** を合成した。HaloTag 融合タンパク質を発現した細胞に対してプローブ **5** を添加し、GSH の捕捉剤である NEM で処理したところ、標的オルガネラからの蛍光シグナルが認められた。以上のことから、プローブ **5** は細胞膜透過性を有し、オルガネラ選択的に GSH 濃度変化を追跡できるといえる。

そこで、プローブ **5** を用いて、小胞体ストレスに対する小胞体内腔の GSH 濃度変化を追跡した。KDEL-Halo を発現させた細胞をプローブ 5 で染色し、その培地にツニカマイシンを添加した。その結果、GSH 濃度の減少に伴う急激な蛍光強度の上昇、および GSH の回復による蛍光シグナルの緩やかな減少が認められた (Figure 1)。このような変化は細胞質中では確認されなかったことから、本プローブは小胞体ストレス研究において有用なツールであることが示唆された。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

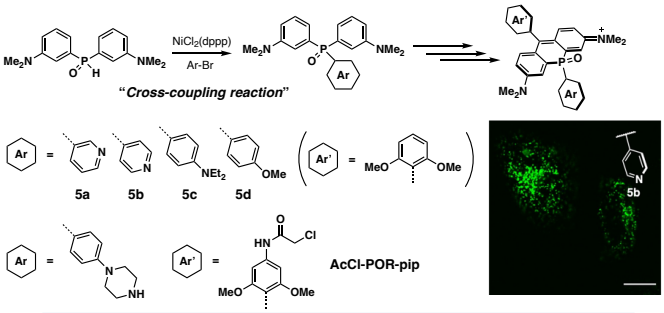
クロスカップリング反応によるホスファローダミン色素の多機能化

○浅田雄一[1]・多喜正泰[2]・山口茂弘[1,2]（[1]名大院理、[2]名大 ITbM）

Multi-functionalization of Phospha-rhodamine Dyes Using a Cross-Coupling Reaction (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University[1], Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University[2]) ASADA, Yuichi[1]; TAKI, Masayasu[2]; YAMAGUCHI, Shigehiro[1,2]

蛍光イメージングは，細胞内で起こる複雑な生命現象を理解するうえで強力な手法である．有機蛍光色素は有用なツールであり，構造修飾によってオルガネラ局在能やセンシング能を付与することにより，細胞内の局所的なイベントをリアルタイムに可視化することができる．細胞動態を長時間にわたり観測するためには，光毒性の影響が小さい赤色～近赤外域で励起可能な高耐光性の蛍光色素が求められる．この課題に対し，当研究室ではローダミン色素の 10 位の架橋酸素原子を電子求引性のホスホリル基 (P=O) で置換した一連のホスファローダミン色素 (POR) を開発してきた．これらは，700 nm 以上の吸収・蛍光極大波長をもち，かつ高い耐光性を有する優れた近赤外蛍光色素群である．また，最近では，リン原子上のベンゼン環が POR の共役系に含まれていないことに着目し，エチニル基を導入した誘導体を開発し，合成最終段階での色素の機能化に成功している．リン原子上の修飾は POR 色素の高機能化において有用な手法であるが，その多様性を広げるためには合成法の煩雑さが課題であった．そこで本研究では，炭素–リン結合を形成するクロスカップリング反応を利用して，POR 色素に種々の官能基を導入する合成法の開発を行った．これらを用いて生細胞の蛍光イメージングに取り組んだ．

ジアリールホスフィンオキシドに対して，$NiCl_2$(dppp)を触媒として用いて各種 Ar-Br を反応させることにより，種々の置換基が導入されたトリアリールホスフィンオキシドを 51~90%の収率で得た．続く Vilsmeier-Haack 反応，DDQ による酸化，およびアリールリチウムとの反応により，9 位と 10 位に異なる置換基を有する一連の POR 色素を得ることに成功した．



クロスカップリング反応による POR 色素の機能化．
5b を用いた生細胞イメージング．

Ar’として 2,6-ジメトキシフェニル基を有する化合物 **5a**–**5d** は，いずれも 704–711 nm に吸収極大波長を有しており，置換基の影響はそれほど認められなかった．また，細胞膜透過性を有しており，リソソームへの局在が認められた，一方，**5c** については，pH 7.4 の緩衝溶液中における蛍光量子収率はΦ_F = 0.003 であり，他の POR に比べて (Φ_F = 0.09~0.12) 著しく蛍光消光していた．この化合物を pH XX の酸性水溶液中では測定したところ，Φ_F = 0.11 となり，約 37 倍もの蛍光増大が観測された．これらの結果は，化合物 **5c** の蛍光消光は，光誘起電子移動 (PeT) に起因することを示している．本手法を用いることにより，キサンテン色素の 10 位においても PeT の蛍光スイッチング部位を導入できるようになったことから，より複雑な細胞内イベントの可視化に向けた高機能なツール分子創製が可能になる．本合成法の有用性を示すため，9 位にタンパク質結合部位であるクロロアセトアミド基，10 位に pH 感受性官能基としてピペラジンを導入した AcCl-POR-pip を合成した．本発表では合成法の詳細に加え，本 pH プローブを用いた細胞イメージングの結果の詳細についても述べる．

1) M. Taki, S. Yamaguchi et al, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2018**, *57*, 32.
2) M. Taki, S. Yamaguchi et al, *Chem. Sci*., **2021**, *12*, 7902.

細胞内部の膜タンパク質の定量的 1 細胞解析法の開発

○梅田侑生[1]・山口哲志[1]・山平真也[2]・中村元直[3]・岡本晃充[1]（[1]東大院工、[2]聖路加国際大、[3]岡山大理）

Quantitative single-cell analysis of membrane proteins inside the cells (School of Engineering, The University of Tokyo[1], Center for Medical Sciences, St. Luke's International University[2], School of science, Okayama University of Science[3]) Umeda, Yuki[1]; Yamaguchi, Satoshi[1]; Yamahira, Shinya[2]; Nakamura, Motonao[3]; Okamoto, Akimitsu[1]

ここから本文を書き始めてください。このテンプレートに直接上書きできます。

細胞内の膜タンパク質は様々な分子ネットワークを形成して幅広い生命現象や疾患に関わるが、細胞内膜上の分子や細胞表層膜上の分子の細胞質側に対して、抗体や阻害剤を作用させて可視化したり機能制御したりすることは困難である。そこで、超音波処理などによって細胞上面の細胞膜を破壊し、底面膜の細胞質側表面を露出させる方法が開発されてきた 1)。我々もマイクロ流体のせん断応力を用いて瞬時に細胞を切断してシート状の細胞底面膜に変換し、露出した細胞質側表面を解析する技術を開発した（図 1）2)。本研究では、光活性化 PEG 脂質表面を用いて並べた 1 細胞アレイにマイクロ流体を作用させ、細胞膜シートアレイを開発した。円形光（直径 14 μm）のアレイパターンを照射してマウス白血球 BaF3 細胞を並べ、高速で生理緩衝液を流すと、均一な円形状の細胞膜シートのアレイを高い変換効率で高密度に調製できた（図 2A）。そして、1 細胞ごとに解析を行うことによって、集団の平均と比べて高い運動性を示した細胞群を検出することに成功している（図 2B）また、電子顕微鏡(SEM)観察などから細胞膜シート上において、アクチン繊維や被服小胞などの細胞内構造を損なわずに観察できることが確認された（図 2C)。また同時に、細胞内膜を含むオルガネラ構造が残されることも示唆され（図 3)、本アレイ上で細胞内部での膜タンパク質の翻訳後修飾と細胞機能との相関を網羅的に 1 細胞定量解析できると期待される。

1) Saka, et al., Nat. Commun. 2014, 5, 4509;
2) Izuta, et al., Sci. Rep. 2017, 7, 14962.

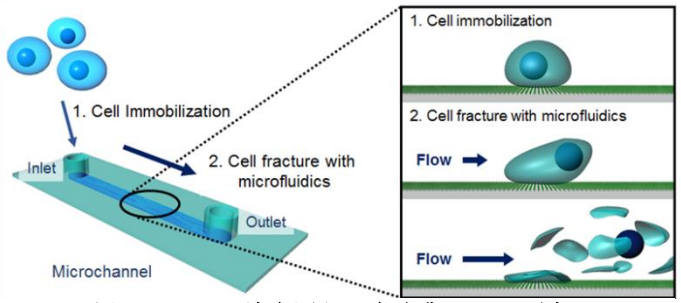


図 1　マイクロ流路を用いた細胞膜シートの形成

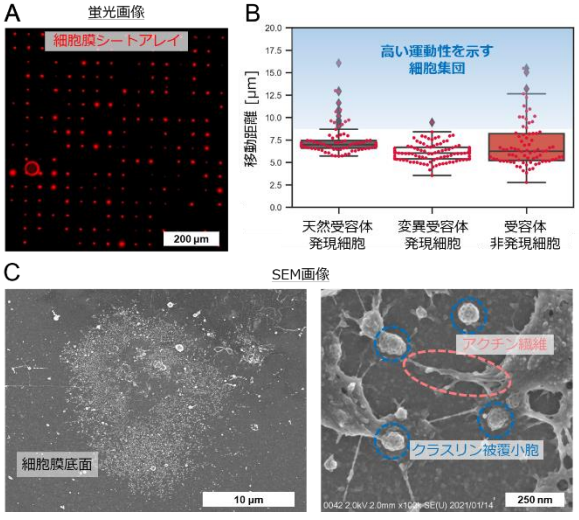


図 2　(A) 均一に並んだ細胞膜シートアレイ、(B) 細胞膜シート上での抗体染色、(C) SEM 観察画像

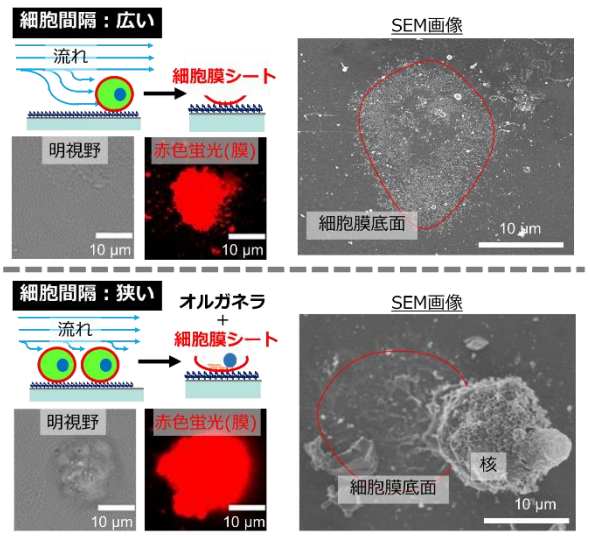


図 3　細胞間隔による細胞破砕後の顕微鏡観察画像の差異

Poster Short Talk

Sun. Sep 11, 2022 11:50 AM - 12:20 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 2:50 AM - 3:20 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Short talks free discussions (P100-P116)

11:50 AM - 12:20 PM JST | 2:50 AM - 3:20 AM UTC

Short talks free discussions

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 1:20 PM - 2:20 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 4:20 AM - 5:20 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Yusuke Takezawa (Graduate School of Science, The University of Tokyo)

1:20 PM - 1:40 PM JST | 4:20 AM - 4:40 AM UTC

[2C-07] Elucidation of G4 binding activity and function of Fibrillarin

*Tatsuki Masuzawa[1], Yamato Karikome[2], Takanori Oyoshi[1,2,3] (1. Graduate school of Science and Technology, Shizuoka University, 2. Graduate school of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 3. Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

1:40 PM - 2:00 PM JST | 4:40 AM - 5:00 AM UTC

[2C-08] Development of Dinuclear Bismuth Complexes as RNA Degraders

*Yutaro Hanatani[1], Takashi Kurohara[1], Yasunobu Yamashita[1], Yuri Takada[1], Yukihiro Itoh[1], Takayoshi Suzuki[1] (1. Osaka University, SANKEN)

2:00 PM - 2:20 PM JST | 5:00 AM - 5:20 AM UTC

[2C-09] Exploring of RNA contact sites on human Dicer-Platform/PAZ by photo-crosslinking

*Yukiko Kamiya[1], Shunya Suzuki[1], Noriko Yokota[1], Koki Tsuda[1], Kenji Yoshida[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

Fibrillarin の G4 結合性と機能の解明

○増澤　樹[1]・苅米　倭[2]・大吉　崇文[1,2,3]（[1]静大院創造、[2]静大院理、[3]静大グリーン研）

Elucidation of G4 binding activity and function of Fibrillarin (Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University[1], Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University[2], Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University[3]) MASUZAWA, Tatsuki[1]; KARIKOME, Yamato[2]; OYOSHI, Takanori[1,2,3]

グアニン四重鎖（G4）は核酸局所構造の一種で、細胞内においてテロメアや様々なプロモーター、さらにリボソーム DNA（rDNA）中に見出されており、遺伝子発現制御や染色体末端の保護などの役割を有していることが知られている。G4 の機能はそれぞれに結合する G4 結合タンパク質によって制御されていると考えられており、テロメアの G4 に対しては、Translocated liposarcoma/ Fused in sarcoma が G4 に結合することで、ヒストン中の特定のリシンをトリメチル化し、ヘテロクロマチン化を誘起する[1)]。また、核小体の rDNA 中の G4 には Nucleolin が結合し、RNA ポリメラーゼ I をリクルートすることで転写を活性化している[2)]。しかし、まだ自然界に多く存在すると考えられる G4 結合タンパク質とその機能については未だ不明な点が多い。

これまでに我々は、G4 に結合するタンパク質を探索する方法として化学修飾を用いた新しい方法により、新規 G4 結合タンパク質を見出した[3)]。この中には、核小体局在タンパク質として有名な Fibrillarin (FBL) が含まれていた。FBL は、rRNA の 2'-O メチル化による rRNA の成熟や、rDNA をコードする遺伝子中のヒストン H2A の 104 番目のグルタミン (H2AQ104) のモノメチル化を促進することで、rDNA の転写を活性化させる[4,5)]。しかし、FBL の G4 結合性、さらに FBL の機能と G4 との関連も報告されていない。そこで、新規 G4 結合タンパク質である FBL の G4 結合性と機能について解析することを本研究の目的とした。

FBL の核酸結合性を解析するために、ビオチン化された G4 rDNA、C-rich rDNA、二本鎖 rDNA に対して、FBL を大量発現させたヒト細胞の細胞抽出液を反応させることで、pull down assay を行った。その結果、FBL は G4 rDNA に対して強い結合性を示した。さらに、FBL が細胞内で受ける修飾として知られいてる特定のアルギニンのメチル化とリシンのアセチル化は、FBL の G4 結合性をそれぞれ制御していることもそれぞれの阻害剤を用いた実験により明らかになった。加えて、FBL の機能の 1 つであるヒストン H2AQ104 のモノメチル化が、G4 結合性小分子の細胞への添加により、減少することも明らかにした。以上の結果から、FBL は細胞内において G4 に結合し、その結合を介してヒストン修飾を行っている可能性が示唆された (Figure)。

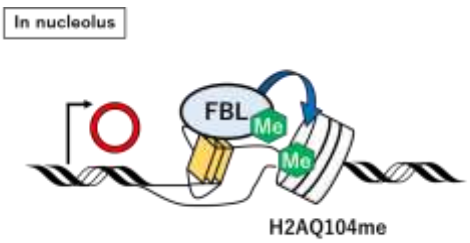


Figure : The model of histone modification mechanism by FBL via G4 binding on rDNA

1) Takahama, K., *et. al., Chem. Biol.*, **2013**, *20*, 341-350
2) Drygin, D., *et. al., Cancer Res.*, **2009**, *69*, 7653-7661
3) Masuzawa, T., *et. al., Chem. Commun.*, **2020**, *56*, 11641-11644
4) Erales, J., *et. al., Proc. Natl. Acad. Soc.*, **2017**, *114*, 12934-12939
5) Tessarz, P., *et. al., Nature*, **2014**, *505*, 564-568

二核ビスマス錯体型 RNA 分解分子の開発

○花谷優太朗・黒原崇・山下泰信・高田悠里・伊藤幸裕・鈴木孝禎（阪大産研）

Development of Dinuclear Bismuth Complexes as RNA Degraders (SANKEN, Osaka University) HANATANI, Yutaro; KUROHARA, Takashi; YAMASHITA, Yasunobu; TAKADA, Yuri; ITOH, Yukihiro; SUZUKI, Takayoshi

ヒトゲノムの 98%の領域を占める非翻訳性 RNA(ncRNA)は、生命現象の制御や疾患の発症に関与していることが分かってきたが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。したがって、特定の ncRNA の機能をコントロールする手法は ncRNA の生物学的機能の解明に有用で、疾患治療への応用も期待できる。そこで、我々は、化学触媒によって特定の RNA を分解することで、その機能を制御する手法を考案した。今回、その基盤技術として DNA に対して RNA を選択的かつ効率的に分解する分子の創製を目指した。

RNA 分解分子として、RNA のリン酸ジエステル結合を開裂する分子を設計することとした。強力なリン酸ジエステル結合を切断するのは容易ではなく、実際に、既知の RNA 分解を引き起こす分子の分解活性は低い。[1] しかし、生体内に存在する RNA 分解酵素の触媒機構に基づいた精密な分子設計を行うことで、有用な RNA 分解分子を創製できると考えた。RNA 分解酵素 RNase H は活性中心に二価マグネシウムイオンもしくは二価マンガンイオンを 2 つ持つ酵素で、その触媒機構は、近傍に存在する水分子を介した RNA の 2'-OH とリン酸エステルの活性化を鍵とする。すなわち、活性化された 2'-OH がリン酸エステルを求核攻撃し、分子内環化反応が起こることで RNA を分解する（Figure 1）。我々は、この RNA 分解機構を基に、金属錯体型 RNA 分解分子として種々の二核金属錯体を設計・合成を行い、その RNA 分解活性について RNA モデル基質を用いて評価した。金属イオンのスクリーニングとリガンド構造の最適化により、毒性の低いビスマス(III)イオンを有する二核ビスマス(III)錯体が、生理的条件下にて、良好な RNA 分解活性を示し、既知の亜鉛錯体よりも優れた活性を示すことが明らかとなった(Figure 2)。さらに、この錯体は類似の DNA モデル基質を全く分解しないことも明らかとなり、DNA に対する高い RNA 選択性を示した(Figure 3)。現在、ケミカルバイオロジー研究への展開に向けた検証実験を実施している。本発表では、二核ビスマス(III)錯体の設計と合成、RNA 分解活性評価および RNA 分解メカニズムについて議論する。

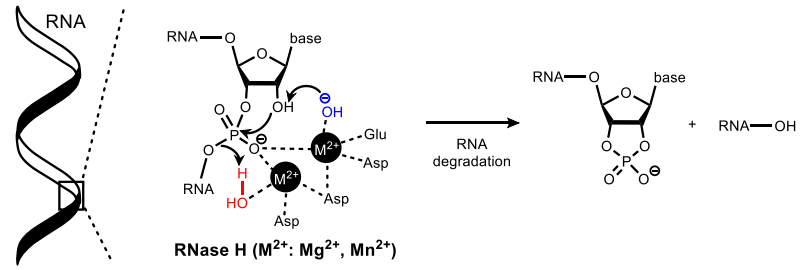
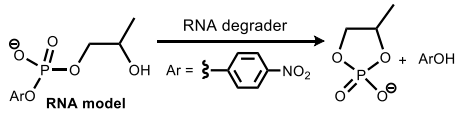


Figure 1. Proposed RNA degradation mechanism by RNase H.



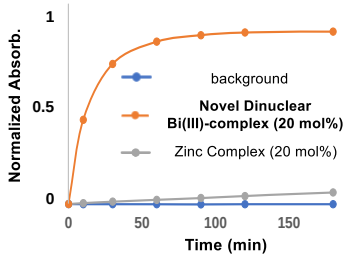
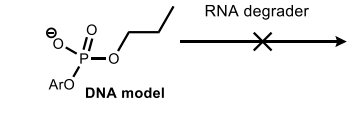


Figure 2. RNA model degradation assay.



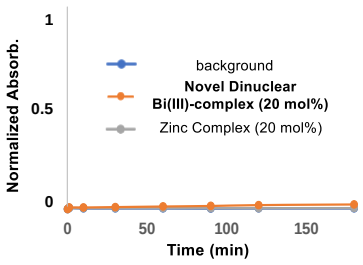


Figure 3. DNA model degradation assay.

1）Cowan, J. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 634–642.

光クロスリンク解析による Dicer-Platform/PAZ の RNA コンタクトサイトの探索

○神谷由紀子[1]・鈴木駿也[1]・横田徳子[1]・津田弘貴[1]・吉田健司[1]・浅沼浩之[1]（[1]名大院工）

Exploring of RNA contact sites on human Dicer-Platform/PAZ by photo-crosslinking (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]) KAMIYA, Yukiko[1]; SUZUKI, Shunya[1]; YOKOTA, Noriko[1]; TSUDA, Koki[1]; YOSHIDA, Kenji[1]; ASANUMA, Hiroyuki[1]

RNA 干渉は遺伝子発現を抑制する生体反応であり、核酸医薬において利用される重要な機構である。本機構は、Dicer によって、前駆体である pre-miRNA や pre-siRNA から生産された短鎖 dsRNA (miRNA、siRNA)によって誘導される。このことから、Dicer による RNA の認識・切断機構の解明は RNAi を理解する上でも、RNAi を基盤とする核酸医薬を開発する上でも非常に重要である。Dicer は分子量 220 kDa からなるマルチドメインタンパク質であり、基質 RNA の選択、切断、生成物の放出のステップで柔軟に構造を変化させると予想されている。これまでに Dicer の各ドメインの結晶構造解析や、RNA と Dicer の複合体のクライオ電子顕微鏡解析が行われているが、活性状態の相互作用は捉えられていない。Dicing 反応の第一段階は、前駆体 RNA の末端に Dicer の Platform ドメインと PAZ ドメイン(Dicer-PP)が結合することである。このことから、Dicing 反応における各状態で Dicer-PP による RNA 結合がダイナミックに変化していることが予想された。そこで本研究では、光クロスリンクを用いて溶液状態における Dicer-PP と基質 dsRNA の相互作用の解明を試みた(Fig. 1a)。

クロスリンカーとして、3 種類のジアジリン誘導体を設計した(Fig. 1a)。これらのクロスリンク性能を解析したところ、Trifluoromethyl phenyl diazirine に平面性分子である Carbazole を導入したクロスリンカー(cD)が RNA 結合タンパク質との相互作用解析に適しているとわかった。そこで、異なる位置に cD を導入した様々な pre-siRNA を調製し、Dicer-PP との光クロスリンクを行った。LC-MS/MS 解析を行うことでクロスリンク部位の同定を行ったところ、PAZ に存在するループ領域や C 末端側のヘリックスと pre-siRNA の内側領域が近接することが明らかとなった(Fig. 1b)。また、Dicer-PP と pre-siRNA のクロスリンク効率は、フルマッチ型の pre-siRNA よりも、内在性の pre-miRNA を模したミスマッチをもつ pre-siRNA において増加した。以上の結果から、Dicer-PP は dsRNA の末端に結合するだけでなく中央領域も認識し、基質識別を行い、pre-siRNA を Dicer 活性部位に導くものと考えられた。

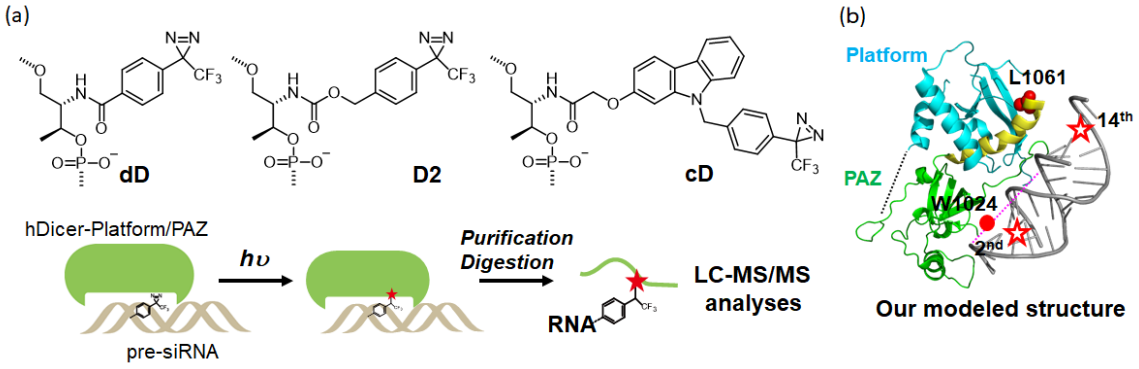


Fig. 1 (a) Schematic illustration of photo-crosslinking and LC-MS/MS analyses for identification of pre-siRNA contact sites on hDicer-Platform/PAZ (b) Modeled complex structure based on the crosslinking results

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 2:30 PM - 3:30 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 5:30 AM - 6:30 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Miki Imanishi (Institute for Chemical Research, Kyoto University)

2:30 PM - 2:50 PM JST | 5:30 AM - 5:50 AM UTC

[2C-10] Chemoenzymatic synthesis of ligand-modified DNA toward the development of metal-responsive DNAzymes

*Yusuke Takezawa[1], Kohei Sakurai[1], Mitsuhiko Shionoya[1] (1. Graduate School of Science, The University of Tokyo)

2:50 PM - 3:10 PM JST | 5:50 AM - 6:10 AM UTC

[2C-11] Lab-free RNA testing of SARS-CoV-2 variants using RICCA and PalmPAGE system

*Radhika Biyani[1], Kiyoshi Yasukawa[2], Masahiro Takagi[1], Manish Biyani[3] (1. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Agriculture, Kyoto University, 3. BioSeeds Corporation)

3:10 PM - 3:30 PM JST | 6:10 AM - 6:30 AM UTC

[2C-12] Functional characterization of the noncoding regions in human genome by biallelic and large-scale editing technology

*Yasunori Aizawa[1,2] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology)

金属イオン応答性 DNAzyme の開発を指向した金属配位子修飾 DNA 鎖のケモエンザイマティック合成

○竹澤悠典[1]・櫻井航平[1]・塩谷光彦[1]（[1]東大院理）

Chemoenzymatic synthesis of ligand-modified DNA toward the development of metal-responsive DNAzymes (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1]) TAKEZAWA, Yusuke[1]; SAKURAI, Kohei[1]; SHIONOYA, Mitsuhiko[1]

デオキシリボザイム(DNAzyme)は触媒活性を有する DNA 鎖であり、今までに様々な化学反応を触媒する DNAzyme が見いだされてきた[1]。特に RNA 鎖を切断する DNAzyme は、バイオセンサーや DNA 分子演算回路、DNA 分子マシンの開発に広く用いられている。我々は、既存の DNAzyme の配列中に、2:1 金属錯体形成を介して対合する金属錯体型塩基対[2]を導入し、金属イオンに応答して触媒活性をスイッチできる DNAzyme の開発を報告してきた[3]。従来は、金属イオンに結合する金属配位子型ヌクレオシドをホスホロアミダイト法に基づく固相合成により DNA 鎖に導入していた。本研究では多様な金属配位子の DNAzyme 鎖への導入を目指し、酵素を用いたポスト合成修飾[4]を検討した。

ウラシル(U)塩基を含む DNA 鎖を原料とし、塩基除去修復酵素であるウラシル DNA グリコシラーゼ(UDG)で処理し、脱塩基部位を生じさせた。生じたアルデヒド基とアミノピコリン酸との還元的アミノ化により、ピコリン酸配位子(Pic)の導入を試みた(図 a)。HPLC および質量分析から、Pic 配位子が導入された DNA 鎖が得られたことがわかった。続いて、この方法で Pic 配位子を中央に含む相補配列の DNA 鎖 5′-CAC ATT A**Pic**T GTT GTA-3′および 3′-GTG TAA T**Pic**A CAA CAT-5′を合成した。一対の Pic 配位子を含む二重鎖(5′-CAC ATT A**Pic**T GTT GTA-3′)·(3′-GTG TAA T**Pic**A CAA CAT-5′)の融解実験を行ったところ、1 当量の Cu^{II} イオンの添加により二重鎖の熱的安定性が著しく上昇した(ΔT_m = + 32 °C)。これは、鎖間での **Pic**–Cu^{II}–**Pic** 錯体の形成により二重鎖が架橋されたためと考えられる。

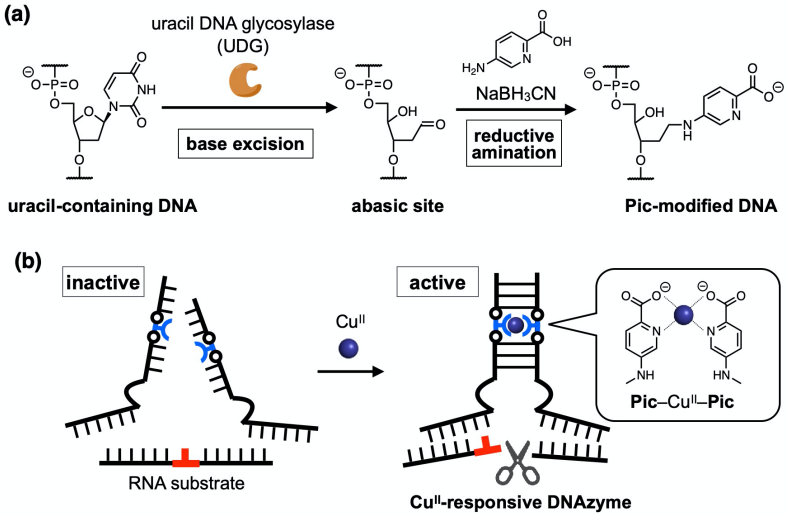


図 (a) 核酸修復酵素を用いた金属配位子修飾 DNA の合成。Pic: ピコリン酸配位子。**(b)** Pic 配位子を導入した Cu^{II} 応答性 DNAzyme の概念図。

最後に、**Pic**–Cu^{II}–**Pic** 錯体形成による二重鎖安定化を利用して、Cu^{II} イオンに応答して活性を制御できる DNAzyme の開発を行った(図 b)。既知の RNA 切断 DNAzyme (E5)[5]を二つに分割し、ステム二重鎖部分に一対の Pic 配位子を導入した DNA 鎖を合成した。等量の基質鎖存在下で 3 時間反応を行い、DNAzyme の RNA 切断活性を評価した。その結果、Cu^{II} 非存在下では基質鎖はほとんど切断されなかったのに対し、1 当量の Cu^{II} 存在下では基質鎖の切断が進行した。これは、ケモエンザイマティック反応により導入した Pic 配位子により、DNAzyme に Cu^{II} イオン応答性を付与できたことを示唆している。

[1] L. Ma, J. Liu, *iScience* **2020**, *23*, 100815. [2] Y. Takezawa et al., *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 622. [3] (a) Y. Takezawa et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 19342. (b) Y. Takezawa et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59*, 21488. (c) T. Nakama et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 10153. (d) T. Nakama et al., *Chem. Commum.* **2021**, *57*, 1392. [4] A. Na et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 11504. [5] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol*. **1995**, *2*, 655.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

Lab-free RNA testing of SARS-CoV-2 variants using RICCA and PalmPAGE system

(Graduate School of Science and Technology, Japan Advanced Institute of Science and Technology (JAIST)[1]; Graduate School of Agriculture, Kyoto University[2]; BioSeeds Corporation[3])

Radhika Biyani[1], Kiyoshi Yasukawa[2] , Masahiro Takagi[1], Manish Biyani[1,3]

The realization of a 'lab-free lab-quality' and scalable testing method to detect known variants of SARS-CoV-2 variants such as Delta or Omicron could be a potential game-changer in the fight against COVID-19 because the methods RT-PCR and whole-genome sequencing (WGS) which are the current gold-standard assay for SARS-CoV-2 variant identification face the challenge of high-cost and requirements of laboratory-equipped bulky expensive instrumentation . To address this challenge, it is required to have a simple yet reliable, rapid and field-deployable molecular diagnostic tool for the detection of nucleic acid sequences of variants of SARS-CoV-2 virus for both clinical and public health arenas that can help in preventing human-to-human disease transmission and COVID-19 pandemic. In this study, we utilized our newly developed isothermal nucleic acid amplification method RICCA (RNA Isothermal Co-assisted Coupled Amplification) [1] as an alternative to RT-PCR method and integrated RICCA with the principles of temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) method for identifying SARS-CoV-2 variants, Alpha and Delta, as an alternative to eliminate the need for genomic sequencing approach [2]. PalmPAGE, which is a viable solution for field-applicable, hand-held and affordable gel electrophoresis system has been utilized in this study. In summary, we introduced an integrated approach of RICCA and PalmPAGE system, for 'lab-free lab-quality' testing of Alpha and Delta variants of SARS-CoV-2 viruses (Figure 1). We believe this new system can be an effective way for rapid testing of SARS-CoV-2 variants and other viruses in resource limited areas.

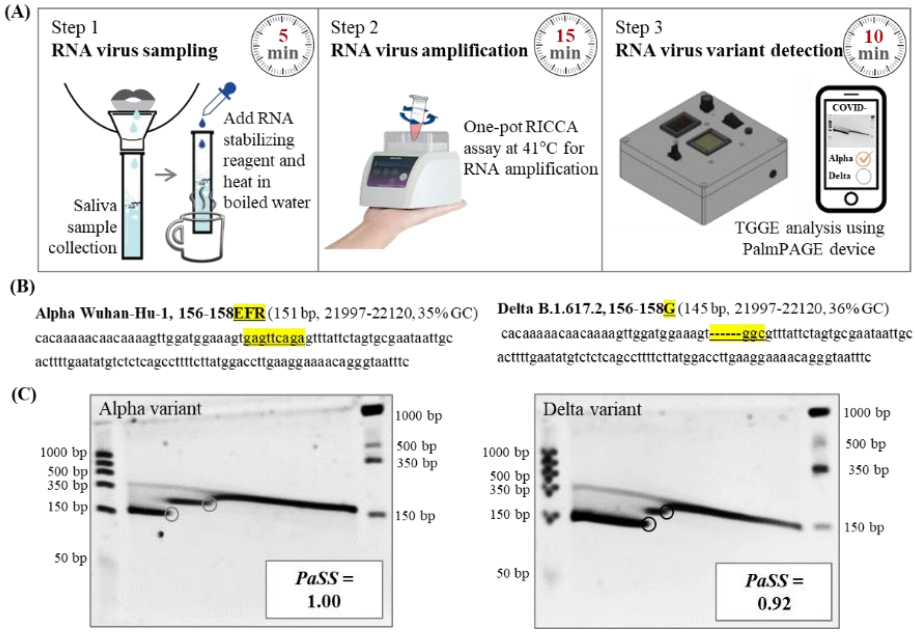


Figure 1. (A) A working flowchart of testing with a sample-to-answer period of less than 30 min using a DNA melting profile-based sequence analysis of SARS-CoV-2 variants, (B) Sequence of targeted gene fragment in Spike protein region with the 156-157 deletion and R158G mutation in the Delta variant, (C) Experimental melting profiles using TGGE and *PaSS* value calculation.

1) Biyani, R., Sharma, K., Kojima, K., Biyani, M., Sharma, V., Kumawat, T., ... & Biyani, M. (2021). Development of robust isothermal RNA amplification assay for lab-free testing of RNA viruses. *Scientific reports*, *11*(1), 1-13.

2) 保川清. (2022). RICCA と PalmPAGE システムを用いた SARS-CoV-2 亜種の迅速 RNA 検査のための非ゲノム配列解析アプローチ. *電気設備学会誌*, *42*(2), 109-112.

両アリル大規模ヒトゲノム改変技術による非コード領域の機能探究

○相澤康則[1,2]（[1]東工大生命、[2]神奈川県立産総研）

Functional characterization of the noncoding regions in human genome by biallelic and large-scale editing technology (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology[1], Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology[2]) AIZAWA, Yasunori[1,2]

ヒトゲノムのドラフト配列が解読されて約 20 年の今年、T2T（Telomera-to-telomera）と表現されたヒトゲノム配列を端から端まで解読するプロジェクトの論文が本年発表された。この論文でも強調されているように、ヒトゲノムの 98%以上を占める非コード領域の配列は明らかになったものの、その機能的意味に関する我々の理解はほとんど進んでいない。その理由は、この長大な非コードゲノム領域を生細胞内で直接にかつ正確に改変し、その影響を調べる技術が欠落していたからである。

我々のグループでは近年、ヒト細胞内で 100kb 規模のゲノム領域をアリル特異的に改変する技術 Universal Knock-in System（UKiS 法；Ohno T et al 2022）を開発した。本発表では、UKiS 法を使って狙ったイントロンやトランスポゾン領域だけを両アリルから正確に欠損し、その影響を調べた研究を紹介する。アリル特異的で大規模かつ正確なヒトゲノム改変技術がもたらすであろう学術的及び産業的有用性についても議論したい。

Oral Session

Sun. Sep 11, 2022 3:40 PM - 5:00 PM JST | Sun. Sep 11, 2022 6:40 AM - 8:00 AM UTC | Venue C E and S building E and S hall

Nucleic acids

Chair: Masayuki Tera (Faculty of Biotechnology and Life sciences)

3:40 PM - 4:00 PM JST | 6:40 AM - 7:00 AM UTC

[2C-13] Large-scale analysis of RNA-fluorescence indicator interaction and screening for RNA-binding molecules

*Kazumitsu Onizuka[1,2], Ryosuke Nagasawa[1,2], Kaoru R Komatsu[3], Emi Miyashita[3,4], Ryohei Iwata[1,2], Mamiko Ozawa[1], Hirohide Saito[4], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. Graduate school of science, Tohoku University, 3. xFOREST, 4. CiRA, Kyoto University)

4:00 PM - 4:20 PM JST | 7:00 AM - 7:20 AM UTC

[2C-14] Oncolytic hairpin DNA pair: Selective cytotoxic inducer through microRNA-driven DNA self-assembly

*Kunihiko Morihiro[1], Hiraki Osumi[1], Akimitsu Okamoto[1] (1. The University of Tokyo)

4:20 PM - 4:40 PM JST | 7:20 AM - 7:40 AM UTC

[2C-15] Controll of Liquid-liquid phase separation of nucleic acids with peptide nucleic acid (PNA)

*Yuichiro Aiba[1], Rikuto Soma[1], Masanari Shibata[1], Shinya Ariyasu[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

4:40 PM - 5:00 PM JST | 7:40 AM - 8:00 AM UTC

[2C-16] Chemical Synthesis of mRNA by Chemical Capping Reaction

*Yasuaki Kimura[1], Naoko Abe[1], Akihiro Imaeda[1], Masahito Inagaki[1], Fumitaka Hashiya[1], Satoshi Uchida[2], Hiroto Iwai[3], Masakazu Honma[3], Junichiro Yamamoto[3], Hiroshi Abe[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Graduate School of Medicine, Kyoto Prefecture University of Medicine, 3. Kyowa Kirin Co., Ltd)

RNA－蛍光指示薬間相互作用大規模解析と RNA 結合分子探索

○鬼塚和光[1,2]、長澤瞭佑[1,2]、小松リチャード馨[3]、宮下映見[3,4]、岩田遼平[1,2]、小澤眞美子[1]、齊藤博英[4]、永次史[1,2] ([1]東北大多元研、[2]東北大院理、[3]xFOREST、[4]京大 CiRA)

Large-scale analysis of RNA-fluorescence indicator interaction and screening for RNA-binding molecules

(IMRAM, Tohoku University[1], Graduate School of Science, Tohoku University[2], xFOREST[3], CiRA, Kyoto University[4]) ONIZUKA, Kazumitsu[1,2]; NAGASAWA, Ryosuke[1,2]; KOMATSU, Kaoru R.[3]; MIYASHITA, Emi[3,4]; IWATA, Ryohei[1,2]; OZAWA Mamiko[1]; SAITO, Hirohide[4]; NAGATSUGI, Fumi[1,2]

RNA 標的創薬は近年、オリゴ核酸に加え、経口投与可能な低分子でも効果を期待できる標的が増え、開発が飛躍的に進展している。RNA 標的医薬の中には、重篤な遺伝性疾患に対して治療効果が期待できるものもあり、遺伝性・難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている。RNA は様々な分子内相互作用により、様々な高次構造を形成することが知られている。創薬標的として、このような高次構造モチーフを低分子で狙う場合、多くの類似した構造から標的のみを選択的に認識し、強く結合する必要があるため、高い結合性と選択性を併せ持つ優れた RNA 結合分子の開発は容易ではない。そのため、標的特異的結合分子を創出する優れた評価法・探索法の開発が強く望まれている。

蛍光指示薬競合置換アッセイは、RNA 結合性分子を効率的に探索するための代表的な方法である。本アッセイは、RNA と結合し蛍光が大きく変化する蛍光指示薬を用いて、対象化合物との競合置換により、RNA 結合性をハイスループットに評価するものである。従って、様々な RNA に対する蛍光指示薬の結合親和性情報は、競合置換アッセイの適用範囲を拡張するために極めて重要である。

一方で我々は最近、マイクロアレイ技術を利用することで、RNA ライブラリ [1)]（数千配列）に対する RNA-低分子間の結合親和性を一挙にランク化できる評価法の開発に成功した。本研究では、代表的な蛍光指示薬であるチアゾールオレンジ系の化合物 [2)]、TO および TO-3 の RNA 結合情報を大規模に解析し、結合親和性の大規模情報を取得した(Fig.)。次に得られた情報に基づき、標的 RNA と蛍光指示薬を選択し、競合置換アッセイを行うことで、RNA 結合分子の探索を行った。本発表では新しい解析法およびスクリーニングシステムに関して詳しく報告する予定である。

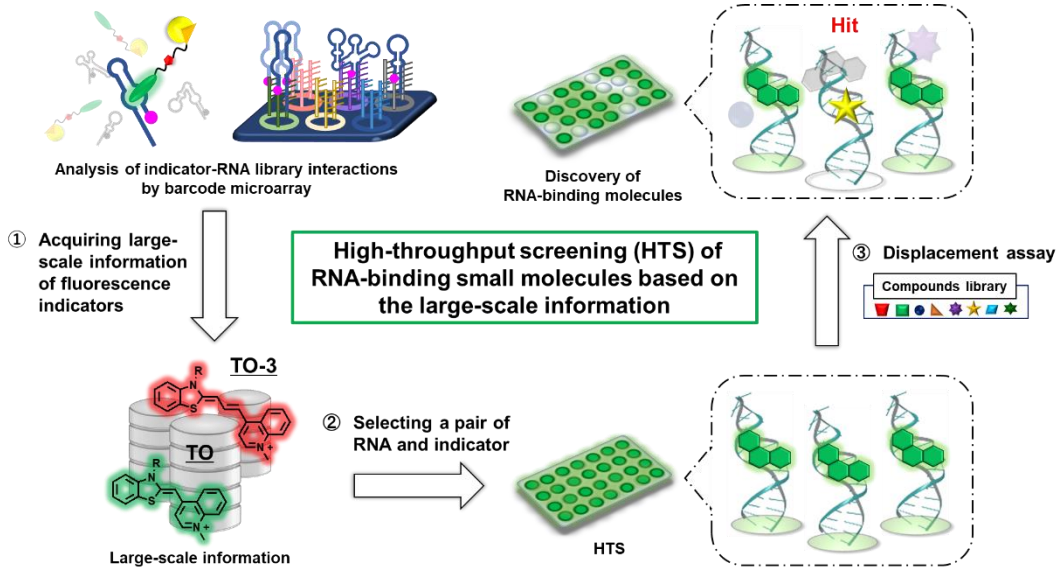


Fig. 大規模情報に基づく RNA 結合低分子のハイスループットスクリーニングシステム

1) Saito, H., *et al.*, *Nat. Commun.* **2020,** *11,* 6275. 2) Nishizawa, S., *et al.*, *Chem.Commun*. **2019**, *55*, 3183.

腫瘍溶解性ヘアピン DNA ペア：マイクロ RNA 駆動型 DNA 自己組織化を介した選択的細胞毒性誘導剤

○森廣邦彦・大住拓輝・岡本晃充（東大院工）

Oncolytic hairpin DNA pair: Selective cytotoxic inducer through microRNA-driven DNA self-assembly

(Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) MORIHIRO, Kunihiko; OSUMI, Hiraki; OKAMOTO, Akimitsu

体外から侵入した核酸分子は細胞内外の様々なセンサー分子に認識されて自然免疫を惹起することから、がん免疫療法の有望な素材として注目されている。しかし、通常核酸分子はがん細胞選択的に機能しないため、全身免疫毒性などの副作用が問題となり得る。この問題を解決するべく、我々はヘアピン DNA の細胞内自己組織化を利用したがん選択的な核酸免疫医薬の開発に取り組んでいる[1]。本研究ではまず、多くのがん細胞内で過剰発現が認められるマイクロ RNA である miR-21 を腫瘍のマーカー分子として利用し、2 種のヘアピン DNA から長鎖 DNA 二重鎖を選択的に細胞内構築する技術を開発する (Fig. 1)。がん細胞内で産生された長鎖 DNA 二重鎖は cGAS をはじめ様々な DNA センサーに認識されることで自然免疫応答を惹起し、インターフェロンの発現などを介して選択的に細胞毒性を誘導すると考えられる。

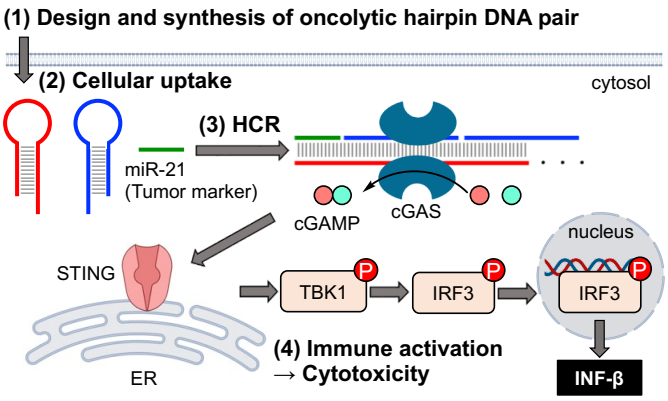


Fig 1. Induction of cancer-selective cytotoxicity using miR-21-driven DNA self-assembly.

独自に配列設計したヘアピン DNA ペアを miR-21 を発現している複数のがん細胞に導入した結果、miR-21 を発現していない正常細胞と比較して効率良く長鎖 DNA 二重鎖が細胞内構築されることが分かった。また、ヘアピン DNA ペアを導入したがん細胞では自然免疫活性化の指標であるインターフェロン β の発現が亢進しており、miR-21 に依存した細胞毒性を誘導できることが明らかとなった (Fig. 2A)。細胞内の主要な DNA センサーである cGAS-STING 経路に着目し、siRNA によって STING をノックダウンした状態でヘアピン DNA ペアを細胞内導入した結果、インターフェロン β の mRNA 発現量が大幅に減少することが分かった。このことから、今回設計したヘアピン DNA ペアは当初の設計通り、がん細胞選択的に自然免疫を惹起することで細胞毒性を発揮していることが示唆された。さらに、メラノーマ細胞を移植した担がんマウスモデルにヘアピン DNA ペアを局所投与した結果、腫瘍の増大を有意に抑制することができた (Fig. 2B)。本シンポジウムでは、ヘアピン DNA ペアの配列設計から抗がん剤としての評価について詳細を発表し、新分類の核酸医薬としての可能性を議論したい。

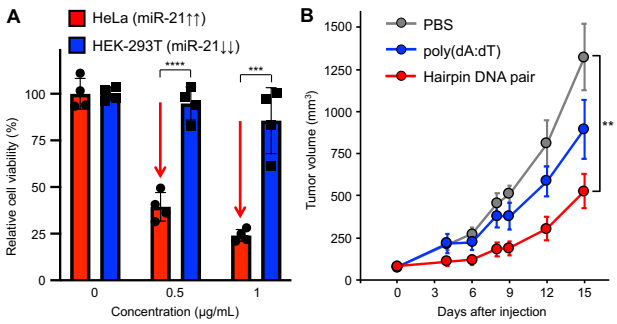


Fig 2. (A) Comparison of cytotoxicity between HeLa and HEK-293T cells. (B) Averaged tumor volume of each group. The drug was topically administered at 0, 4, and 8 days. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, and $^{****}P < 0.0001$ by unpaired Student's *t*-test.

1) K. Morihiro, H. Osumi, S. Morita, T. Hattori, R. Ohashi, A. Okamoto, submitted.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

ペプチド核酸（PNA）による核酸の液-液相分離制御

○愛場雄一郎・相馬陸杜・柴田将成・有安真也・荘司長三（名大院理）

Control of liquid-liquid phase separation of nucleic acids with peptide nucleic acid (PNA) (Science, Nagoya University) AIBA, Yuichiro; SOMA, Rikuto; SHIBATA Masanari; ARIYASU Shinya; SHOJI Osami

生体分子が集合し、液滴を形成する液-液相分離（生物学的相分離）[1]という現象が報告され、その生物学的な機能が大きな注目を集めている（Fig. 1）。2009 年に細胞内で相分離液滴が観察されたことで[2]、相分離現象が生命現象に関わる反応を制御しているという仮説が提唱されている。このような生体分子の相分離現象およびやその生物学的な機能を正確に理解するためには、その相分離状態を制御するための技術が必要不可欠である。これまで、タンパク質を中心に様々な技術が開発されてきたが、核酸の相分離状態を主眼においた研究は限定的であり、これまで核酸の液-液相分離を配列選択的に制御した例はなかった。一方で、ヌクレオソームの相分離や、核酸の生物学的相分離も翻訳などに関与していることが報告されており、生体内で生じる核酸の相分離現象も生命現象において非常に重要であることは間違いない。そこで本研究では、人工核酸であるペプチド核酸（PNA）[3),4)]を用いることで、核酸の液-液相分離を制御する新規手法の開発を目指した。

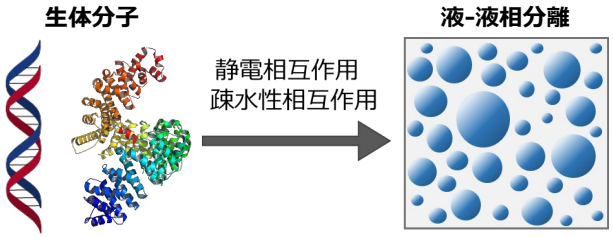


Fig. 1 生体分子の液-液相分離制御

PNA は DNA の糖-リン酸骨格の代わりに *N*-(2-aminoethyl)glycine 骨格をもつ人工核酸である（Fig. 2）。PNA は骨格に電荷を持たないため、DNA と静電反発を生じず、非常に安定な PNA/DNA 二本鎖を形成可能である。さらに、ペプチド結合という共通点から、PNA へのアミノ酸の導入が容易であり、その電荷を制御可能である。そこで、アミノ酸の導入によって電荷や疎水性を変化させた PNA を用いて、静電相互作用と疎水性相互作用が重要な役割を果たす液-液相分離現象に対し、核酸の相分離状態の配列選択的な制御について検討を行った（Fig.3）。用いた PNA は、Fmoc ペプチド固相合成法を用いて合成し、HPLC 精製、MALDI-TOF MS による同定を行った。さらに PNA と DNA を混合し、形成される液滴を観察することで、PNA の相分離性の違いを評価した。

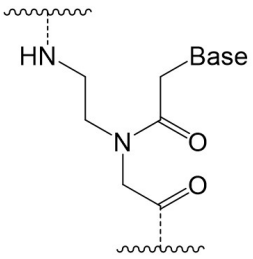


Fig. 2 PNA の構造

相補的や非相補的な標的 DNA に対し PNA を混合することで、DNA 配列に応じた液滴や凝集体の形成が確認された。さらに、溶液中の塩濃度を高めることで、PNA と DNA との間の静電相互作用の変化させることで、液滴や凝集体の溶解も確認し、これらの形成に静電相互作用が重要であることを明らかにした。本研究により、PNA は DNA の液-液相分離の誘導に有効であるという新たな知見が得られ、人工核酸を用いた配列選択的な DNA 液滴形成の制御に初めて成功した。本研究は、核酸を介した液-液相分離の原理とその生物学的機能についての理解に向けた様々な応用が期待される。

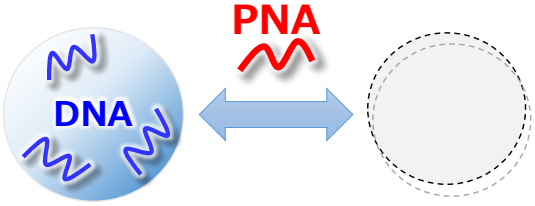


Fig. 3 PNA による DNA の液-液相分離制御

1) Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A. & Rosen, M.K. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 285–298 (2017).
2) Hoege, C., Gharakhani, J., Jülicher, F. & Hyman, A. A. *Science* **324**, 1729–1732 (2009).
3) Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. & Buchardt, O. *Science* **254**, 1497–1500 (1991).
4) Aiba, Y., Shibata, M., Shoji, O. *Appl. Sci.* **12**, 3667 (2022)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

化学的キャップ化反応を用いた mRNA の完全化学合成法の開発

○木村康明[1]・阿部奈保子[1]・今枝昭裕[1]・稲垣雅仁[1]・橋谷文貴[1]・内田智士[2]・岩井宏徒[3]・本間正一[3]・山本潤一郎[3]・阿部洋[1]（[1]名大院理、[2]京都府立医大、協和キリン株式会社[3]）

Chemical Synthesis of mRNA by Chemical Capping Reaction

(Graduate School of Science, Nagoya University[1], Graduate School of Medicine, Kyoto Prefecture University of Medicine[2], Kyowa Kirin Co., Ltd[3])
KIMURA, Yasuaki[1]; ABE Naoko[1]; IMAEDA, Akihiro[1]; Masahito Inagaki[1]; Fumitaka, Hashiya[1]; Satoshi Uchida[2]; IWAI, Hiroto[3]; HONMA, Masakazu[3]; YAMAMOTO, Junichiro[3]; ABE, Hiroshi[1]

mRNA の医薬応用において、安定性や翻訳能向上などの観点から mRNA への化学修飾導入は有効なアプローチである。これまでの mRNA 医薬開発においては、ウリジン/1-メチルシュードウリジン置換に代表される核酸塩基への修飾導入は広く行われているが、それ以外の mRNA への化学修飾導入については、合成手法上の制約もあり未開拓である。翻訳効率を最大化するためには位置特異的に特定の化学修飾を導入することが必要であるが、そのためには mRNA の完全化学合成法の開発が有効である。一方真核系 mRNA の合成において、RNA 鎖 5'末端へのキャップ構造導入が重要なプロセスであるが、これまでに実用的な化学的キャップ化法は報告されていなかった。今回我々は迅速かつ定量的に進行する RNA の化学的キャップ化反応を開発した。化学合成した 5'-リン酸化 RNA を、m^7GDP のイミダゾリデート体(Im-m^7GDP)と活性化剤存在下、有機溶媒中で反応させることで、キャップ化 RNA がほぼ定量的に得られることを見出した。本発表では、種々の化学修飾 mRNA について翻訳活性への影響を HeLa 細胞で評価した結果[1]について発表する。

Reference

1. Abe, N.; Imaeda, A.; Inagaki, M.; Li, Z.; Kawaguchi, D.; Onda, K.; Nakashima, Y.; Uchida, S.; Hashiya, F.; Kimura, Y.; Abe, H. *ACS Chem Biol* **2022**, *17* (6), 1308–1314.

Graduate Student Session

Mon. Sep 12, 2022 10:00 AM - 12:00 PM JST | Mon. Sep 12, 2022 1:00 AM - 3:00 AM UTC | Online
Site A Online Streaming

Graduate Student Session

Chair: Yuya Nakajima (Nagoya University), Hiroaki Inaba (Nagoya University), Jun Sasahara (Nagoya University)

10:00 AM - 10:40 AM JST | 1:00 AM - 1:40 AM UTC

[3ONA-01] Next-generation Biological Nano-quantum Sensor Technologies Pioneered by Surface Chemical Modification

*Igarashi Ryuji[1] (1. Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology)

10:40 AM - 11:20 AM JST | 1:40 AM - 2:20 AM UTC

[3ONA-02] Frontier of Structural Studies of Intercellular Junctions Using Cryo-Electron Microscopy

*Atsunori Oshima[1] (1. Cellular and Structural Physiology Institute, Nagoya University)

11:20 AM - 12:00 PM JST | 2:20 AM - 3:00 AM UTC

[3ONA-03] Large-scale Evolution Experiments of Microorganisms ~ Toward Prediction and Control of Evolution ~

*Chikara Furusawa[1] (1. Center for Biosystems Dynamics Research, RIKEN)

表面化学修飾が拓く次世代の生体ナノ量子センサー技術



氏名　　：五十嵐　龍治
所属　　：量子科学技術研究開発機構 量子生命科学研究所
e-mail　：igarashi.ryuji@qst.go.jp
研究分野：量子生命科学、ナノマイクロ科学
座右の銘：なし
研究者を志す学生に一言：この先「その研究は何の役に立つのか？」と何度も聞かれますが、どうかその様な問いに惑わされないでください。

細胞内で起こる現象をいかにして定量的に解析するか、これは未だ生物学に残された重要な課題である。細胞の大きさはわずか数十 μm ほどしかなく、その中は更に数 μm から数十 nm という小さな分子集団（細胞小器官、生体分子凝縮体、生体分子複合体など）で構成されている。各々の分子集団はそれぞれ特徴的な機能を持ち、複雑に相互作用することで細胞としての恒常性が生み出されている。この様な微細構造を持つ細胞内システムを定量的に解析するためには、それぞれの分子集団が作り出す複雑な微小環境に対して、多様な物理化学パラメータを高精度で定量できるナノサイズのセンサーの実現が必要となる。

近年、「窒素-空孔中心（Nitrogen-Vacancy center; NV センター）」を含有する蛍光性ナノダイヤモンドが、有望な微小環境測定センサーとして注目されている。NV センターは三重項電子を持つ蛍光性格子欠陥として、緑色光で光励起することにより 650-750 nm の赤色蛍光を発することが古くから知られている。その蛍光強度は三重項電子スピンの状態と厳密に共役していることから、スピンに影響を与えるナノダイヤモンド周辺の微小環境を光学検出によって高精度計測可能である。従って、細胞内の計測したい分子集団に蛍光ナノダイヤモンドを送達できれば、その微小環境の多様な物理化学パラメータを定量計測する蛍光ナノプローブとして活用できることになる。

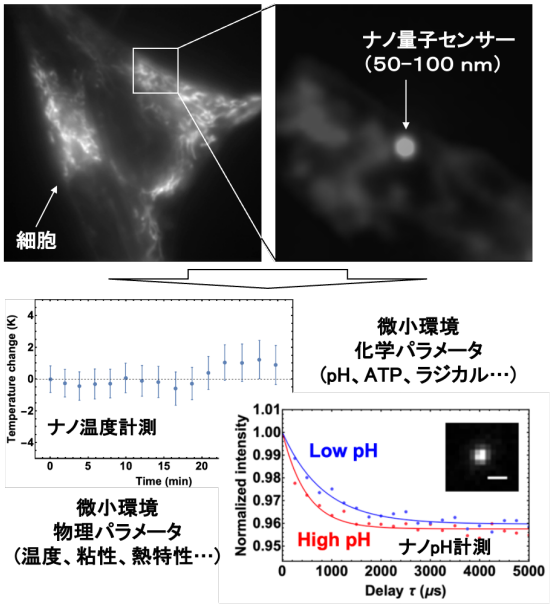


図 ナノ量子センサーによる細胞内微小環境計測

実際このアイデアは、細胞イメージングや生体イメージングなどの蛍光バイオイメージング技術との親和性が高い。このため細胞生物学、神経科学、免疫学など、様々な生物分野への応用が期待されており、実際に細胞内ナノ環境の温度やラジカルなどの計測が実現し初めている。その一方で、細胞内における効率的な送達や、更に多様なパラメータに対する適用などが課題として残されており、これを解決するナノ粒子表面の化学修飾技術の開発が強く求められている。

本講演では、ナノダイヤモンド表面の化学修飾技術によってナノ量子センサーによる細胞内微小環境計測の可能性がいかに広がりつつあるかを紹介する。特に、非特異的な生体分子の吸着をいかにして抑制するか、また表面官能基を改変することによっていかにして新たなセンサー機能を付与するかについて、実例を交えて概説する。

細胞間結合チャネルの構造と膜輸送メカニズム

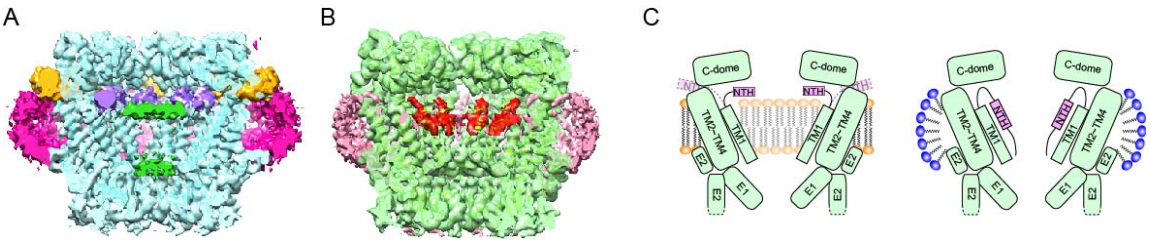


氏名　　：大嶋　篤典
所属　　：名古屋大学細胞生理学研究センター
e-mail　：atsu@cespi.nagoya-u.ac.jp
研究分野：構造生物学
座右の銘：　個性と気づき
研究者を志す学生に一言：教員の言うことを鵜呑みにしない

多細胞生物の多くは、細胞間シグナル伝達を担う手段としてギャップ結合チャネルを持つ。これは隣接細胞の細胞質を直接連絡する communication channel として機能し、電気的、化学的にカップリングさせる機能を果たしている。イオンのほかに、核酸やアミノ酸などの代謝産物を通すほどの大きな通路を持つことから、large pore channel とも呼ばれる。脊椎動物ではコネキシンが、無脊椎動物ではイネキシンがギャップ結合チャネルの遺伝子ファミリーとして知られているが、その両者にアミノ酸配列の相同性は見られない。脊椎動物には、イネキシンのホモログが見つかっており、これはパネキシンと名付けられている。これは主に単一膜チャネルとして機能して ATP の放出が示されており、ギャップ結合とは本質的に機能が異なるが、チャネル通路のサイズの大きさからこれも large pore channel に分類される。ギャップ結合チャネルを含む large pore channel の開閉機構に関して、その構造基盤は理解が進んでいない。

我々は線虫の持つ innexin-6(INX-6)ギャップ結合ヘミチャネルとヒト pannexin-1(PANX1)チャネルを脂質ナノディスクに再構成し、クライオ電子顕微鏡によって高分解能構造を報告した(Burendei et al. (2020) Sci. Adv.)。ナノディスク再構成した INX-6 ではチャネル通路の内側に二層の密度が膜面に沿って現れ、チャネルの通路は塞がれていた(図 A)。界面活性剤による可溶化された状態の INX-6 を構造解析すると、チャネルの内側ではN末端領域がファネルを形成して直径15Å 以上の大きな通路を形成していた(図 B)。この構造解析と合わせて、チャネルの機能解析、MD シミュレーションを共同研究で行い、脂質がチャネルの開閉の制御に関与する脂質ゲーティングという開閉メカニズムを提示した(図 C)。

また、ヒト PANX1 チャネルをナノディスク再構成した状態でクライオ電子顕微鏡構造解析にも成功した(Kuzuya et al. (2022) Sci. Signal.)。野生型 PANX1 の apo 状態では N 末端がファネルを形成し、阻害剤添加状態ではチャネル通路が二層で閉塞された構造が得られた。さらに、各サブユニットの隙間には脂質と思われる密度が多数存在していた。これらの構造が示唆するギャップ結合ファミリータンパク質の開閉メカニズムにおける脂質の寄与と、脂質の動きについて議論する。



微生物の大規模進化実験
～進化の予測と制御へ向けて～



氏名　　：古澤　力
所属　　：理化学研究所 生命機能科学研究センター
　　東京大学大学院理学系研究科
e-mail　：chikara.furusawa@riken.jp
研究分野：生物物理学・普遍生物学
座右の銘：まずは手を動かす
研究者を志す学生に一言：気負わずに研究を楽しみましょう

生物システムは環境変動に応じてその内部状態を柔軟に変化させ、多様な環境に対して適応・進化する能力を持つ。一方で、その過程における状態変化は任意の方向に生じるのではなく、そこには明確な拘束条件と方向性が存在する。その拘束条件を理解し、生物システムを適切に記述する少数の自由度を抽出することは、その状態変化を予測し制御する技術の開発につながるであろう。

我々のグループではこうした考えの下で、ラボオートメーションを活用した微生物の大規模進化実験を展開している。用いた培養システムは、クリーンブースに設置された分注器とそれに接続されたマイクロプレートリーダーから構成され、16,000 を超える独立培養系列を全自動で維持することが可能である[1]。このシステムを用い、様々に異なるタイプのストレス環境下での大腸菌の進化実験を行い、得られた進化株の表現型・遺伝子型を解析した[2]。このデータを適切な機械学習に供することにより、大腸菌の取り得る表現型が比較的低次元に拘束をされていること、多様な突然変異が類似した表現型変化を引き起こすことなどが見出された。さらに、この手法を複数の微生物種を含む生態系に拡張し、様々に異なるストレス環境下での生態系進化実験を行ったところ、独立進化系列が少数の生態系のパターンに収束すること、また種間相互作用によってストレス耐性が大きく変化することなどが見出されている。

これらの結果は、複雑かつ高次元な細胞や生態系の状態変化を、比較的少数の自由度によって記述できることを示唆しており、その自由度を通じて系の振る舞いを予測し制御可能であることを期待させる。そこで我々のグループでは、択圧にフィードバック制御を加えることにより、進化軌跡を制御する実験手法を構築している。さらに、この手法を生態系や動物の培養細胞に展開することにより、医学・工学・農学分野へと応用することを計画している。本発表では、こうした大規模進化実験による生物システムのデザインとその応用について議論したい。

参考文献
[1] Horinouchi et al. Jour Lab Automation 19(5): 478-82 (2014)
[2] Maeda et al. Nature Commun. 11(1):5970 (2020)

Poster Session

Mon. Sep 12, 2022 1:00 PM - 2:00 PM JST | Mon. Sep 12, 2022 4:00 AM - 5:00 AM UTC | Online Site A Online Streaming

Poster Session (P1-P33)

[P1] The development of a FRET detection system for elucidation of intracellular mechanisms of SNA modified anti-miRNA oligonucleotide

*Hongyu Zhu[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University.)

[P2] Syntheses of base-labile pseudo-complementary nucleobases of SNA and L-*a*TNA phosphoramidite monomers

*Fuminori Sato[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P3] Chemical modification of tripodal quinone-cyanine fluorescent dye for regulating the recognition of nucleic acids structure

*Yuka Muraoka[1], Yu Yasuhara[2], Marina Iwai[2], Takashi Sakamoto[1,2] (1. Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University, 2. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

[P4] Kinetic analysis of DNA G-quadruplexes folding with structured loop regions

*Minori Nakata[1], Naoki Kosaka[1], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University)

[P5] Evaluation of tripodal quinone-cyanine dies as photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer

*Junya Muramoto[1] (1. Faculty of Systems Engineering, Wakayama University)

[P6] The reactivity of Topoisomerase I to G-quadruplex-containing DNA

*Koya Sakamoto[1], Ryoma Yokosawa[1], Maiko Yamanashi[1], Takanori Oyoshi[1] (1. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University)

[P7] Development of functional polypeptides regulating G4-containing promoter

*Yamato Karikome[1], Maiko Yamanashi[1], Akinori Ishihara[1], Takanori Oyoshi[1,2,3] (1. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 2. Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, 3. Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

[P8] Nucleic acid detection using DNA probes that release a ligated product between ruthenium and platinum complexes in a sequence specific manner

*Takeshi Asahina[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University)

[P9] Development of Structural Selective G-Quadruplex Ligand with Novel Ligand Screening

*Yoshiki Hashimoto[1], Takeru Torii[1], Matsuki Kinoshita[1], Keiko Kawauchi[1], Hisae Tateishi-Karimata[2], Naoki Sugimoto[1,2], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University, 2. FIBER, Konan University)

[P10] Development of long-chain elongation reaction based on kinetic analysis of chemical template-directed ligation of L-*a*TNA and SNA

*Hikari Okita[1], Keiji Murayama[1], Hiroyuki Asanuma[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P11] Construction of Highly Diverse Monobody and Macrocyclic Peptide Libraries Based on the Effect of mRNA Sequences on Translation Efficiency and Accuracy

*Shun Umemoto[1], Taishi Kondo[1], Tomoshige Fujino[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P12] Development of fluoregenic synthtic fluorephore/protein hybrid probe for detection of methylated RNA

*Kamikawa Takuya Takuya[1,2], Yuichiro Hori[2], Keisuke Nomura[1], Akari Matsuki[1], Kazuya Kikuchi[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Graduate School of Science, Kyushu University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[P13] Regulation of liquid-liquid phase separation by small molecules targeting RNA G-quadruplex

*Nagisa Takamiya[1] (1. FIRST, Konan University)

[P14] Development of long-chain DNA assembly technology by using 3'-thio-phosphorothiolate oligodeoxynucleotides

*Mikiya Kase[1], Masahito Inagaki[1], Haruka Hiraoka[1], Humitaka Hashiya[1], Naoko Abe[1], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P15] Synthesis and Evaluation of Hoechst-Tethered Oligodeoxynucleotides that Accumulate in Cell Nucleus

*Hiroki Makanai[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University))

[P16] Elucidation of gene function based on RNA Hacking technology by super selectivity Staple oligomer

*Tomoki Tomoki Kida[1], Yousuke Katsuda[1], Takuto Kamura[1], Kotone Lavin[1], Yusuke Kitamura[1], Masaki Hagihara[2], Shin-ichi Sato[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P17] Sequence specific control of liquid droplets composed of RNA G-quadruplex

*Mitsuki Tsuruta[1], Takeru Torii[1], Kazuki Kohata[1], Keiko Kawaichi[1], Hisae Tateishi-Karimata[2], Naoki Sugimoto[1,2], Daisuke Miyoshi[1] (1. FIRST, Konan University, 2. FIBER, Konan University)

[P18] Mechanism of cancer-cell-selective cytotoxicity by dicopper complexes

*Machi Hata[1], Yasuomi Urano[2], Yutaka Hitomi[1], Noriko Noguchi[2], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University, 2. Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University)

[P19] Flexible gene expression increase technology by RNA hacking

*Yua Itsuki[1], Yousuke Katsuda[1], Yusuke Kitamura[1], Hagihara Masaki[2], Sato Shin-ichi[3], Ihara Toshihiro[1] (1. Affiliation Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University, 2. Faculty of Advance Science and Technology, Hirosaki University, 3. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P20] Dynamic control of DNA scaffolded BRET system using strand displacement reaction

*Fumiaki Takano[1], Yuki Minamide[1], Tomoya Niki[1], Shiori Tabana[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University)

[P21] Construction of enzyme complexes for fast degradation of plastics

*Minami Sawada[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P22] Chemoproteomic Identification of Blue Light-Damaged Proteins

*Kohei Toh[1], Motonari Uesugi[1] (1. Institute for Chemical Research, Kyoto University)

[P23] Studies on the association character and structural analysis of tetrameric antibody light chain

*Takahiro Sakai[1], Fitriana Wahyu[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Shohei Yamaguchi[1], Emi Hifumi[2], Taizo Uda[3], Hideaki Ogata[4], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Institute for Research Management, Oita University, 3. Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies, 4. Graduate School of Science, University of Hyogo)

[P24] Analysis of Mechanical Stability of a Cell Surface Protein AtaA_Chead by Molecular Dynamics Simulation

*Jun Sasahara[1], Takayuki Hashimoto[1], Kazushi Fujimoto[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P25] Creation of a bacterial-size liposome with the leaflets of asymmetric protein composition for artificial bacteria.

*Kosaku Noba[1], Shogo Yoshimoto[1], Yoshikazu Tanaka[2], Tomoaki Matsuura[3], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya university, 2. Department of Molecular and Chemical Life Sciences, Tohoku University, 3. Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology)

[P26] Development of small molecule-responsive synthetic protein clustering systems

*Yoko Fukaya[1], Masaru Yoshikawa[1], Sachio Suzuki[1], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P27] Trafficking studies of intracellular and cell surface AMAP-type glutamate receptors using ligand-directed chemistry.

*Yutaro Sugihara[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2,3], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University, 3. ERATO, JST)

[P28] New caged compounds for site-specific activation of AMPA-type glutamate receptors

*Kyohei Soga[1], Toshiaki Furuta[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Department of Biomolecular Science, Toho University)

[P29] Single-molecule toughness analysis of the C-terminal passenger domain of AtaA using AFM

*Amane Kato[1], Shogo Yoshimoto[1], Katsutoshi Hori[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P30] Acceleration of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition induced by antibody-antigen interaction

*Kentaro Nishiyama[1], Hiroki Akiba[1,2], Satoshi Nagata[2], Kouhei Tsumoto[2], Haruhiko Kamada[1,2], Hiroaki Ohno[1,2] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 2. National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)

[P31] Understanding the catalytic behavior of cross-linking enzyme under crowded condition

*Ryo Sato[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P32] Development of photochromic ligands for quantitative and photo-reversible protein labeling

*Satoshi Hamaguchi[1], Toshiyuki Kowada[1,2,3], Takato Mashita[2], Himadri S. Sarkar[3], Toshitaka Matsui[1,2,3], Shin Mizukami[1,2,3] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Graduate School of Science, Tohoku University, 3. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University)

[P33] Construction and structural analysis of a three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion

*Kodai Fujiwara[1], Haruki Onishi[1], Tsuyoshi Mashima[1], Naoya Kobayashi[1], Masaru Yamanaka[1], Kento Yonezawa[1], Hironari Kamikubo[1], Takayuki Uchihashi[2], Shun Hirota[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Science, Nagoya University)

SNA 型抗アンチセンス核酸の細胞内作用機構解明に向けた FRET 検出システムの開発

○朱紅宇[1]・神谷由紀子[1]・浅沼浩之[1]（[1]名大院工）

The development of a FRET detection system for elucidation of intracellular mechanisms of SNA modified anti-miRNA oligonucleotide (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1].) Hongyu Zhu[1], Yukiko Kamiya[1], Hiroyuki Asanuma[1]

MicroRNA (miRNA) は遺伝子発現を抑制する Non-coding RNA の一種である。miRNA は miRISC (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)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]。しがしながら、開発した SNA-AMO による miRNA 阻害機構の詳細は明らかになっていない。特に、AMO は miRISC と結合して、miRNA の機能を阻害することが一般的に考えるが、これまでに、AMO は miRISC と結合している様子を、直接的に観察した例は、報告されていない。そこで、本研究では、開発した SNA-AMO の miRNA 阻害機構の解明を目指し、miRNA が発現するまでの過程で、SNA-AMO がどの段階で阻害効果を発揮しているか明らかにする。

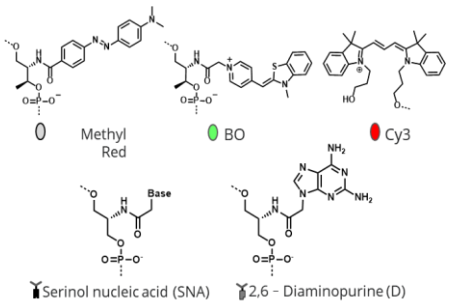


Fig1. Chemical structure of fluorophores, SNA and 2,6-

そのため、蛍光共鳴エネルギー移動 FRET 技術を用いて、細胞内における SNA-AMO と miRISC の相互作用解析することを試みた(図 1、2)。具体的には、細胞内で miRISC を選択的に可視化するため、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、活性を妨げない特定の部位に導入した。また鎖選択性を制御することで、miRNA 特異的な miRISC 形成も可能にした。そこに Cy3 を導入した SNA-AMO を作用させ、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)を検出することにより、生細胞内における miRNA と AMO の相互作用の観察に成功した。さらに、これらの蛍光シグナルと miRISC タンパク質である AGO2 を同時に可視化したところ、SNA-AMO と miRISC が細胞内共局在している様子が観察された。このことから、AMO は miRISC に作用するものと考えられた。

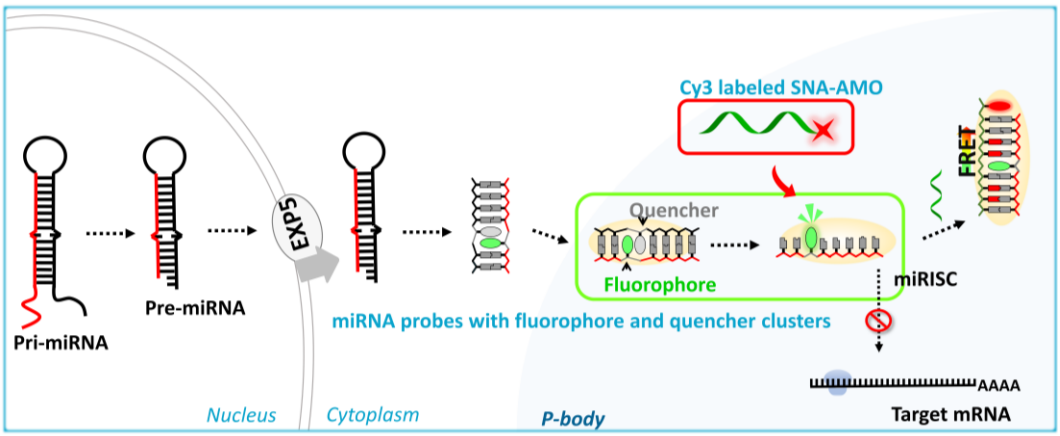


Fig2. Schematic illustration of SNA-AMO mechanism of action

[1] Kamiya, et al., *ChemBioChem*, **2017**, 18, 1917-1922.

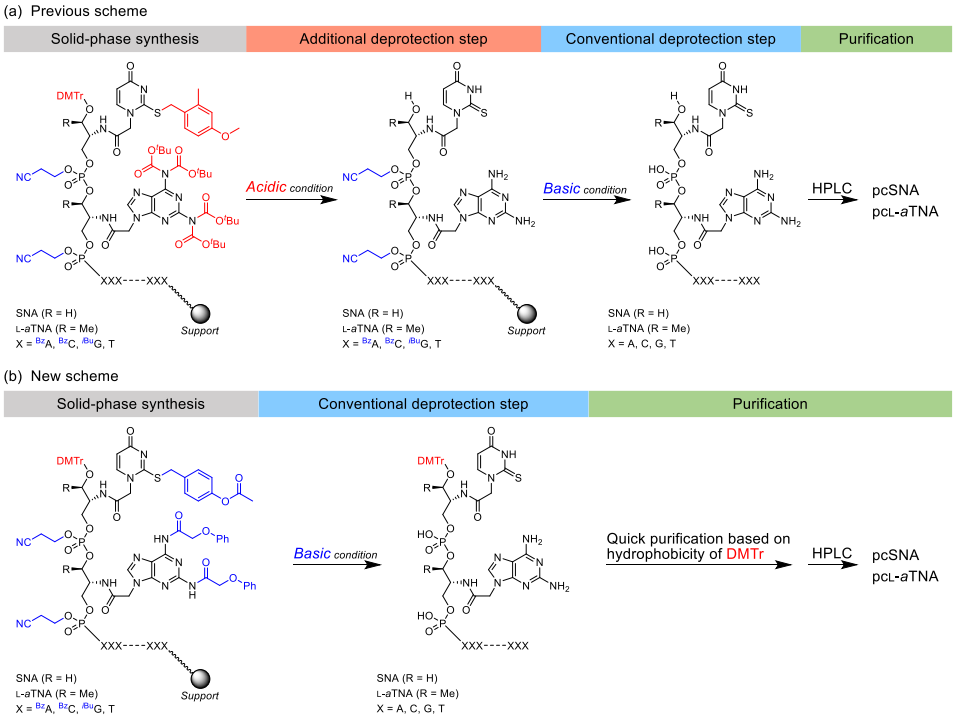
塩基性条件下で脱保護可能な Pseudo-complementary 核酸塩基の SNA/L-*a*TNA ホスホロアミダイトモノマーの合成

○佐藤史経[1]・神谷由紀子[1]・浅沼浩之[1]（[1]名大院工）

Syntheses of base-labile pseudo-complementary nucleobases of SNA and L-*a*TNA phosphoramidite monomers (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]) SATO, Fuminori[1]; KAMIYA Yukiko[1]; ASANUMA Hiroyuki[1]

Pseudo-complementary 塩基対として知られる 2,6-Diaminopurine（D）と 2-Thiouracil（sU）の導入は、オリゴヌクレオチドの自身の自己相補領域を介した二重鎖形成を抑制し、相補的な DNA または RNA との二重鎖形成を促進する。非環状型人工核酸: SNA または L-*a*TNA は相補的な DNA や RNA と配列特異的な二重鎖形成が可能であるが、自身と非常に安定な二重鎖を形成する特徴をもつ[1]。そのため、SNA や L-*a*TNA に対する D-sU の導入は、SNA や L-*a*TNA の自己相互作用を回避するための有効な手法である。これまでに私たちは、Boc 保護 D または、2-Methyl-4-methoxybenzyl (MMPM) 保護 sU を有する SNA ホスホロアミダイトモノマーの合成を報告した[2]。D, sU を含む SNA オリゴヌクレオチドの合成には、従来のホスホロアミダイト法のプロトコルにくわえて、酸による Boc および MMPM の脱保護ステップが必要であった（Scheme 1a）。また、酸による脱保護の過程で DMTr 基が除去されてしまうため、逆相カラムによる簡易精製が行えず、精製工程に手間がかかっていた。そこで、本研究では、塩基で除去可能な Pac 保護 D および 4-Acetoxybenzyl 保護 sU を使用した新たな SNA および L-*a*TNA ホスホロアミダイトモノマーを開発した。これらのモノマーにより、追加の工程を必要としない、一般的なオリゴヌクレオチド合成スキームを用い、D, sU を含む SNA(pcSNA)および L-*a*TNA(pcL-*a*TNA)を調製することに成功した（Scheme 1b）。

Scheme 1. Preparation of pcSNA or pcL-*a*TNA by using (a) our previous scheme with acid-labile D and sU phosphoramidite monomers or (b) new scheme with base-labile D and sU phosphoramidite monomers.



[1] (a) H. Kashida *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 1285-1288, (b) K. Murayama, *et al.*, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 6500-6503. [2] Y. Kamiya, F. Sato, *et al.*, *Chem. Asian J.*, **2020**, *15*, 1266-1271.

３脚型キノン-シアニン蛍光色素の核酸構造認識を制御するための化学修飾

○村岡優香[1]・安原優[2]・岩井まり奈[2]・坂本隆[1,2]（[1]和歌山大院シス工、[2]和歌山大シス工）

Chemical modification of tripodal quinone-cyanine fluorescent dye for regulating the recognition of nucleic acids structure (Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University[1], Faculty of Systems Engineering, Wakayama University[2]) MURAOKA, Yuka[1]; YASUHARA,Yu[2]; IWAI, Marina[2]; SAKAMOTO, Takashi[1,2]

４重鎖（G4）核酸の蛍光イメージング技術は、細胞内における G4 核酸の働きを理解する上で有効であり、これまでにさまざまな G4 核酸検出用の蛍光プローブが開発されてきている。最近我々は３つの *N*-メチルベンゾチアゾリウムカチオン（MeBT）を持つ３脚型キノン-シアニン色素（QCy(MeBT)$_3$）が、dsDNA および G4 DNA に対して異なる波長の蛍光で OFF/ON 応答し、生細胞内の dsDNA と G4 DNA を色分けイメージングできるユニークな蛍光プローブであることを見出した[1)]。しかし、その構造と蛍光プローブとしての機能の相関は明らかではなく、プローブの化学構造の最適化には至っていなかった。

本研究では、この QCy(MeBT)$_3$ の構造と機能の相関を明らかにし、その核酸構造認識能を制御することを目的に、ベンゾチアゾリウムカチオンの N３位に種々の官能基を導入した３脚型キノン-シアニン色素の誘導体（図１、QCy(RBT)$_3$）を設計・合成した。また、QCy(RBT)$_3$ の dsDNA と G4 DNA に対する蛍光応答を評価することで、化学修飾による核酸構造認識制御効果を検証した。

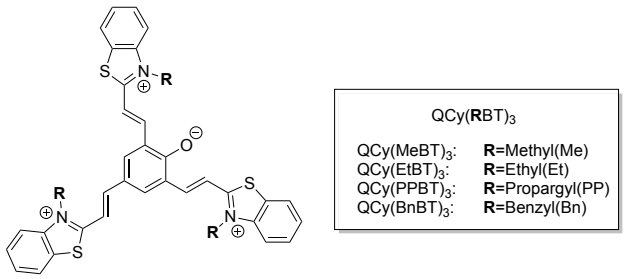


図 1. 合成した３脚型キノン-シアニン蛍光色素の構造

結果、N３位に導入した官能基のサイズの増大とともに、dsDNA に対する蛍光強度増加倍率の低下および、G4 DNA に対する蛍光強度増加倍率の増加が見られ、この位置にバルキーな官能基を導入することで dsDNA に対する結合親和性を抑制でき、G4 DNA に対する結合選択性を制御できる可能性が示された。蛍光滴定により各 DNA に対する相互作用の強さを比較した結果、導入した官能基のサイズの増大とともに、dsDNA に対する結合親和性の低下、および G4 DNA に対する結合親和性の増大がみられた。このことから、ベンゾチアゾリウムカチオンの N３位近傍の化学構造が、dsDNA との結合に大きく影響することが示唆され、この位置への官能基修飾により G4 DNA への結合の選択性を制御できることが明らかとなった。また、N３位にベンジル基を導入した QCy(BnBT)$_3$ では、G4 DNA 添加時に 790 nm 付近にピークトップを持つ蛍光が顕著に増加し、QCy(MeBT)$_3$ の蛍光応答に比べて大幅なレッドシフト（$\Delta\lambda \sim 70$ nm）が観測され、N３位への官能基導入により蛍光波長の制御が可能であることが示された。さらに QCy(BnBT)$_3$ は大幅な蛍光増強が見られたため、有望な G4 DNA 検出プローブであることが示唆された。そこで、細胞内 G4 核酸検出蛍光プローブとして機能するかを検証するために、HeLa 細胞に QCy(BnBT)$_3$ を添加し蛍光顕微鏡観察を行なった結果、生細胞内でも G4 DNA のみに対し蛍光を示したことから、生細胞内 G4 核酸検出プローブとして機能することが明らかとなった。

1) T. Sakamoto, Z. Yu, Y. Otani, *Anal. Chem.*, **2022**, *94*(10), 4269–4276.

グアニン四重らせん構造のループ領域に着目したフォールディング機構の解明

○中田実紀・小坂直暉・三好大輔（甲南大 FIRST）

Kinetic analysis of DNA G-quadruplexes folding with structured loop regions (Graduate school of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University) NAKATA, Minori; KOSAKA, Naoki; MIYOSHI, Daisuke

グアニンに富む核酸鎖は、グアニン四重らせん構造(G4)を形成する。G4 は 4 つのグアニンが Hoogsteen 塩基対によって結合したもの(G-quartet)が積層することで形成される。G4 形成には中心部分にカチオンの配位が必須であり、K^+や Na^+存在下で高い熱安定性を示す。G4 が同定されて以降、主にヒトテロメアで形成される G4 配列を用いて、立体構造やその熱安定性、さらには低分子化合物との相互作用に関する研究が行われてきた。これらの研究により、G4 は塩基配列、共存するカチオン種類、小分子の結合などによって鎖の配向性が変化し、複製・転写における調節的役割を果たすことが明らかになりつつある。[1,2] このように、G4 の構造および熱力学的側面における研究は多く行われている。一方で G4 のフォールディング機構については、速度論的な検討が行われているものの、未だ統一的な見解は得られていない。

G4 のフォールディング機構を速度論的に検討することは、G4 の複雑な形成経路に生じる中間体の存在を明らかにすることができる。さらに、フォールディングに必要なタイムスケールを決定することは、小分子やタンパク質などによって G4 のフォールディングがどのように調節されているか、また生物学的反応のスケールに相当しているかを明らかにするためにも重要である。これまでの速度論的な研究は主にヒトテロメア配列を用い、高速反応装置や分光器を使用して行われてきた。MD シミュレーションにより、G ヘアピン→G トリプレックス→G4 の順に形成されることが提唱された。[3] (Fig. 1) 現在までの研究からは、G4 は G ヘアピンを核とし、様々な中間体を経由してミリ秒から数分単位でフォールディングすることが示唆されている。さらに近年、ループ領域が構造化されている G4（ヘアピン G4）が、構造化されていない G4 よりも速くフォールディングすることが示された。[4] ヘアピン G4 は遺伝子のプロモーター領域に局在しているため、生物学的にも意義のある要素である。

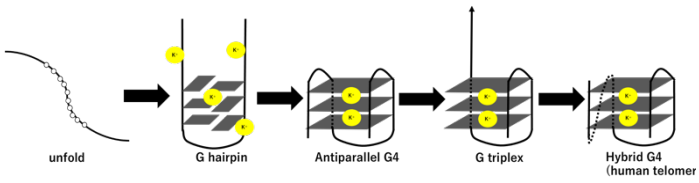


Fig. Proposed pathway of human telomere G4 formation.

そこで本研究では、ループ領域の構造に着目し配列を系統的に変化させることで G4 のフォールディング速度に及ぼす効果を検討した。その結果、ループ領域を不安定にさせた配列やヘアピンループ構造を形成しない配列では、ヘアピンを形成している配列と比べ速度定数が著しく小さくなることが示された。これらの結果から、ループ領域の構造が G4 のフォールディングにとって重要であることが示された。

1）D. Sen, *et al., Nature* **344**, 410-414 (1990).
2）M. Kim. *et al., J. Am. Chem. Soc*. **124**, 2098-2099 (2002).
3） T. Mashimo, *et al., J. Am. Chem. Soc*. **132**, 14910-14918 (2010).
4）T. Q. N. Nguyen, *et al., J. Phys. Chem. B* **124**,5122-5130 (2020).

がんの光線力学療法を指向した３脚型キノンーシアニン色素の光増感活性の評価

○村元順哉[1]・安原優[1]・坂本隆[1,2]（[1]和歌山大シスエ、[2]和歌山大院シスエ）

Evaluation of tripodal quinone-cyanine dies as photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer

(Faculty of Systems Engineering, Wakayama University[1], Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University[2]) MURAMOTO, Junya[1]; YASUHARA, Yu[1]; SAKAMOTO, Takashi[1,2]

非標準的な核酸構造の１つである４重鎖（G4）核酸は、染色体テロメア領域や、種々のがん関連遺伝子のプロモーター領域にも多く存在し、がん治療の標的になると期待されている。フタロシアニン亜鉛錯体は、そのG4核酸への選択的結合能とNIR光励起による活性酸素種（ROS）放出能から、がんの光線力学療法（PDT）の光増感剤となることが報告[1)]されているが、このようなG4核酸に選択的な光増感剤の報告例は稀である。

本研究ではG4核酸を標的とするPDTを実現するための新たな光増感剤候補の探索を行うこととし、その化学構造の基本骨格として、最近我々が開発した３脚型キノン-シアニン骨格に着目した。３脚型キノン-シアニン蛍光色素である$QCy(MeBT)_3$（図１）は、２重鎖及びG4 DNAを異なる波長の蛍光増強で検出できる優れた蛍光プローブ[2)]であるが、その蛍光量子収率は0.01以下であり、励起エネルギーのほとんどが無輻射過程を経て基底状態に戻る。すなわち、緩和過程でROSを放出している可能性が高いと考えられる。

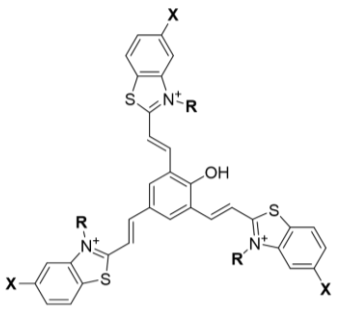


図 1. 用いた３脚型キノン-シアニン色素の構造

これを実証するために、まずは光照射530 nmによる$QCy(MeBT)_3$のROS放出能力を評価した。一重項酸素（$^1O_2$）に選択的に反応するフルフリルアルコール（FA、2.1 mM）の低粘度（0%グリセロール）および高粘度（50%グリセロール）水溶液に$QCy(MeBT)_3$（10 μM）を添加し、光照射120分後の残存FA量を比較した。結果、高粘度水溶液の場合、顕著なFAの減少（30%）が観測され、$QCy(MeBT)_3$の分子内運動の減少により$^1O_2$が生成することが確認できた。また、このFAの減少は光照射した場合のみ観測されたことから、$QCy(MeBT)_3$が光増感剤としての能力を持つことが明らかとなった。

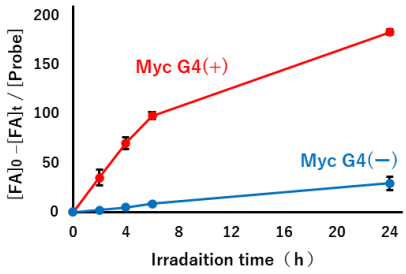


図 2. $QCy(MeBT)_3$ の光照射による G4 DNA 依存的な一重項酸素の放出．[MycG4] = 0 or 10 μM, $[QCy(MeBT)_3]$ = 10 μM [FA] = 2.1 mM in 50 mM Tris-HCl (pH7.5) containing 100 mM KCl.

次に、G4 DNA（Myc G4）、$QCy(MeBT)_3$およびFAのバッファー溶液に光照射（530 nm）を行い、$^1O_2$生成のG4 DNA依存性を評価した。FA減少量の24時間後までの経時変化を計測した結果（図２）、G4 DNA添加によるFA減少量の顕著な増加が見られ、$QCy(MeBT)_3$への光照射による$^1O_2$の生成が、G4 DNA依存的に引き起こされることが明らかとなった。発表では、G4 DNAへの選択性を高めた$QCy(BnBT)_3$、さらに重原子として臭素を導入した$QCy(BnBT\text{-}Br)_3$を用い、G4 DNA選択的な光増感剤としての能力を検討した結果も合わせて報告する。

1) K. Kawauchi, W. Sugimoto, T. Yasui, K. Murata, K. Itoh, K. Takagi, T. Tsuruoka, K. Akamatsu, H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, D. Miyoshi, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2271.
2) T. Sakamoto, Z. Yu, Y. Otani, *Anal. Chem.* **2022**, *94(10)*, 4269–4276.

グアニン四重鎖を含む DNA に対するトポイソメラーゼ I の反応性

○坂本皓哉[1]・横澤龍馬[1]・山梨舞子[1]・大吉崇文[1]（[1]静岡大院理）

The reactivity of Topoisomerase I to G-quadruplex-containing DNA ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University) SAKAMOTO, Koya[1]; YOKOSAWA, Ryoma[1]; YAMANASHI, Maiko[1];OYOSHI, Takanori[1]

グアニン四重鎖（G4）構造は、4 つのグアニン塩基がフーグスティーン型の水素結合によって形成された G カルテットが重なることで出来る核酸局所構造の一つである。ゲノム DNA 中での G4 の形成は転写の制御やテロメア末端の保護などに関与しており、生体内において重要な役割を果たしていることが知られている [1, 2)]。

G4 の形成は DNA のねじれの状態によって制御されており、ネガティブスーパーコイル DNA 中でその形成が促進されるが、生体内でネガティブスーパーコイル DNA のねじれは、トポイソメラーゼ I（Top1） によって解消され、Relax 状態に巻き戻されることが知られている [3)]。さらに Top1 は、G4 DNA に結合することが報告されている [4)]。しかし、G4 を含むネガティブスーパーコイル DNA に対する Top1 の反応性は、未だ明らかになっていない。そこで我々は、G4 を含むネガティブスーパーコイル DNA に対する Top1 の反応性を解析することを目的とした。

G4 を含むネガティブスーパーコイル DNA に対する Top1 の反応性を解析するため、G4 形成配列を含むプラスミドと含まないプラスミドを用意し、これらプラスミドに対して Top1 を反応させた後、アガロースゲル電気泳動によってプラスミドのスーパーコイル状態の変化を解析した。その結果、Top1 は G4 形成配列を含むプラスミドの方をより早くリラックス状態に移行させた。さらに、触媒活性部位を欠損させることで、DNA に結合することは出来るが Relax 化させることが出来ない Top1 の変異体である Top1 ΔCterm を Hela 細胞内に発現させ、Top1 ΔCterm と G4 の局在を免疫蛍光染色によって調べた結果、Top1 と G4 DNA が共局在していることが分かった。この結果から、Top1 が G4 構造を認識し、その周囲のネガティブスーパーコイルを効率的に解消することが示唆された(Figure 1)。

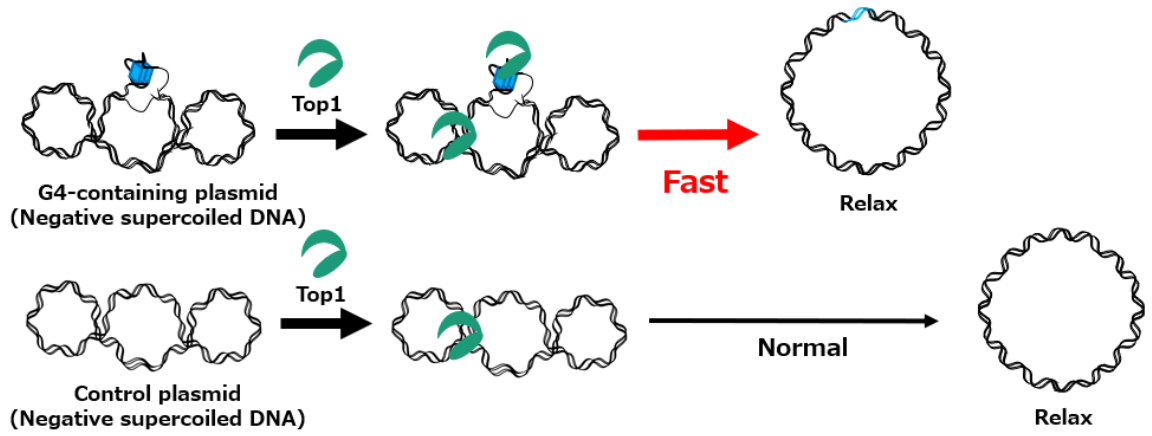


Figure 1. A model of Top1 reactivity to G4-containing plasmid

1) *Proc Natl Acad Sci USA,* 99, 11593-11598, 2002
2) *J Am Chem Soc,* 134, 11974-11976, 2012
3) *J Med Chem,* 52, 2863-2874, 2009
4) *Nucleic Acids Res,* 28, 4832–4838, 2000

G4 含有プロモーターを制御する機能性ポリペプチドの開発

○苅米 倭[1]・山梨舞子[1]・石原顕紀[1]・大吉崇文[1,2,3]（[1]静大院理、[2]静大院創造、[3]静大グリーン研）

Development of functional polypeptides regulating G4-containing promoter (Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University[1], Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University[2], Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University[3]) KARIKOME, Yamato[1]; YAMANASHI, Maiko[1]; ISHIHARA, Akinori[1]; OYOSHI, Takanori[1,2,3]

グアニン四重鎖（G4）構造形成配列は多くのプロモーター配列に存在することが報告されており、転写に対する重要な構造として考えられている[1)]。プロモーター中に G4 構造を有するガン遺伝子である *bcl-2* は、G4 結合性転写因子である Nucleolin によって転写が活性化される一方で、同様にプロモーター中に G4 構造を有する *c—myc* においては、Nucleolin によって転写が抑制されることが報告されている[2,3)]。このように異なるプロモーター中の G4 によって転写の制御機構が異なっているが、G4 と G4 結合性タンパク質による転写に関わる詳細な制御機構はほとんど明らかになっていない。そこで我々は、G4 構造をプロモーターにもつ遺伝子について、人工的に転写を抑制および活性化を行うことができる G4 結合性ポリペプチドの開発を行い、各遺伝子におけるプロモーター中の G4 構造の役割を明らかにすることを目的とした。この G4 結合性ポリペプチドとして、当研究室で既に G4DNA に特異的に作用することが報告した TLS/FUS の RGG 領域を基にした新規 G4DNA 結合性ポリペプチドを（RGGF）を用いることとした[4)]。さらに、この RGGF に単純ヘルペスウイルスの転写活性化因子である VP16 の転写活性化領域を RGGF に融合させた VP16-RGGF を作成した[5)]。

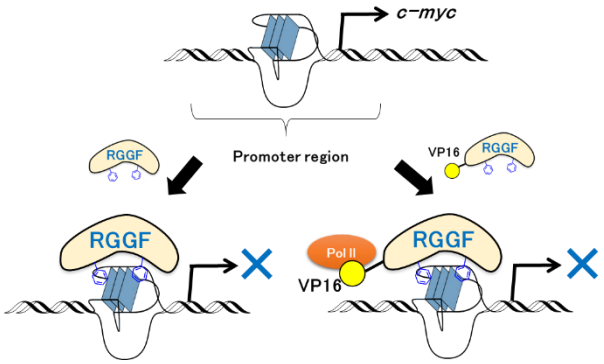


Fig 1. The model transcriptional mechanism with functional polypeptide in *c-myc*

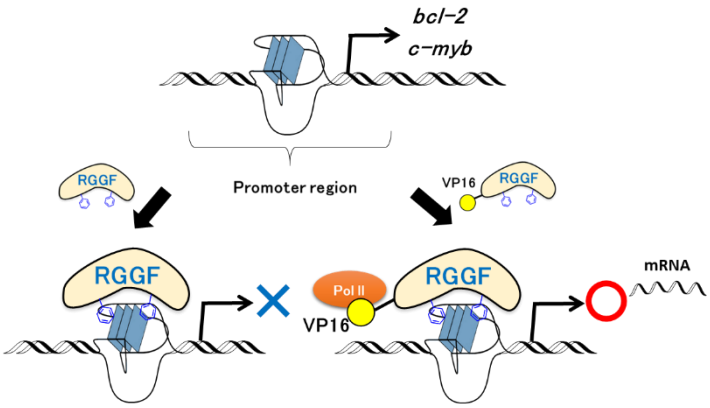


Fig 2. The model transcriptional mechanism with functional polypeptide in *bcl-2* and *c-myb*

RGGF をヒト細胞に高発現させたとき、プロモーター中に G4 構造を有する *bcl-2* と *c-myb* 及び *c-myc* の遺伝子において、転写が抑制された(Fig. 1,2)。さらに、VP16-RGGF をヒト細胞に高発現させたとき、*bcl-2* と *c-myb* の転写は活性化されたが、*c-myc* の転写は抑制された(Fig. 1,2)。これらの結果より、*bcl-2* と *c-myb* 及び *c-myc* のプロモーター中の G4 は、結合する G4 結合性タンパク質によらず、各プロモーター中の G4 の転写制御における役割が異なっていることが示唆された。

1) *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 406-413, 2) *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 12439-12449,
3) *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 23622-23635, 4) *ACS. Chem. Biol.* **2015**, *10*, 2564-2569,
5) *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 275-280

ルテニウム–白金連結錯体を鋳型特異的に脱離する DNA プローブを用いた核酸検出

○朝比奈 雄志・小嶋 美鈴・北村 裕介・勝田 陽介・井原 敏博（熊本大院先端）

Nucleic acid detection using DNA probes that release a ligated product between ruthenium and platinum complexes in a sequence specific manner. (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University) ASAHINA, Takeshi; KOJIMA, Misuzu; KITAMURA, Yusuke; KATSUDA, Yousuke; IHARA, Toshihiro

標的核酸を鋳型としてプローブ核酸同士を連結し、その連結体を質量分析で確認することで、標的核酸を間接的に検出する手法は、ハイスループットな核酸分析法として高い注目を集めている。しかし、核酸のイオン化効率が低いことや、反応基質のプローブに比べ連結体が安定に標的核酸と結合し、未反応のプローブ核酸と置換されないため、シグナルの増幅が困難である。そこで本研究では、イオン化効率が高い金属錯体に着目し、特徴的な同位体存在比を有する Ru と Pt を中心金属とする錯体を用いた。これらの錯体を修飾したプローブには、プローブの核酸部位と錯体部位を連結するリンカー部位にプロテインスプライシング反応を起こすペプチドユニットを導入している（Fig. 1）。そのため、両プローブが標的核酸に結合して近接するとスプライシング反応が誘発され Ru-Pt 連結錯体を脱離する。カチオン性の錯体の脱離によって二本鎖が不安定化するため、プローブを過剰に加えておけば、未反応のプローブと錯体脱離後のプローブが置換し、連結・脱離反応が繰り返し起こると予想される。本戦略により、標的の遺伝情報を生成物である連結錯体の質量とユニークな同位体パターンの変化として高感度に検出できると期待される（Fig. 2）。

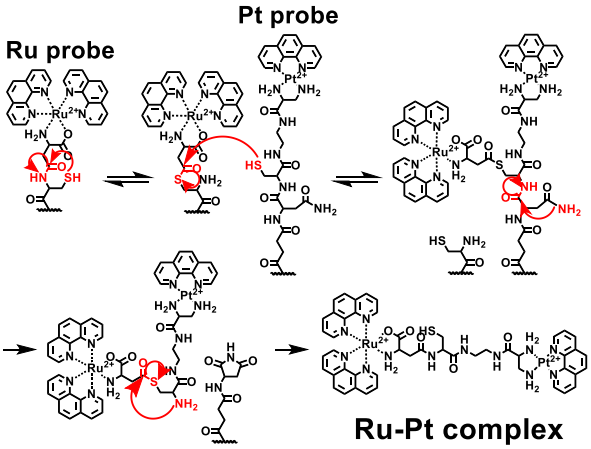


Fig. 1. Schematic representation of the formation and release of ruthenium-platinum complexes.

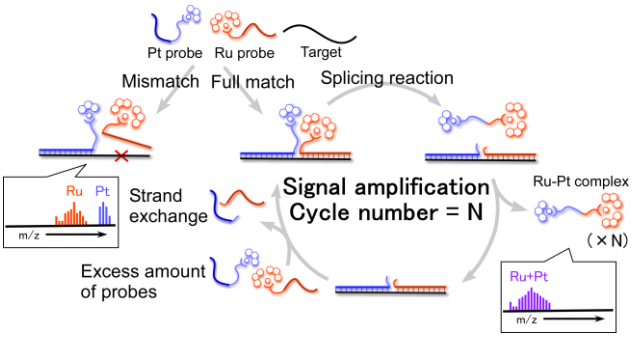


Fig. 2. Signal amplification based on the reaction cycle for the autonomous and successive formation and release of ruthenium-platinum complexes.

Ru 錯体修飾プローブを以下の手順で合成した。まず、**Fmoc-Cys(Mmt)-NHS**（NHS : N-ヒドロキシスクシンイミド）を 3’アミノ化 DNA とカップリングし、Fmoc 脱保護後、Ru 錯体の NHS 活性エステル体 **[Ru(phen)$_2$Asp-NHS](PF$_6$)$_2$** と反応させた。AgNO$_3$/DTT により Mmt 基を脱保護することで目的物を得た。Pt 錯体修飾プローブは以下の手順で合成した。合成した **Alloc-EDA-Cys(Mmt)-Asn(Mtt)-SC-NHS** を固相担体上で 5’アミノ化 DNA とカップリングし、Alloc 脱保護後、Pt 錯体の NHS 活性エステル体 **[Pt(phen)dap-NHS]Cl$_2$** と反応させ、固相から切出し、単離した。AgNO$_3$/DTT および AcOH により Mmt 基、もしくは Mtt 基を脱保護することで目的物を得た。合成した両プローブと標的 DNA を 0°C にて 15 分間インキュベートした。マトリックスを用いずにそのまま MALDI-TOF/MS で測定を行った結果、両プローブと完全相補的な DNA 存在下では、連結錯体の質量が検出された。一方、Ru 錯体プローブと一塩基ミスマッチ部位を有する DNA 存在下では複合錯体は検出されなかった。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

新規 G4 リガンドスクリーニングを用いた構造選択的 G4 リガンド開発

○橋本佳樹[1]・取井猛流[1]・木下菜月[1]・川内敬子[1]・建石寿枝[2]・杉本直己[1,2]・三好大輔[1]（[1]甲南大 FIRST、[2]甲南大 FIBER）

Development of Structural Selective G-Quadruplex Ligand with Novel Ligand Screening (Graduate School of Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University [1], Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research, Konan University [2]) HASHIMOTO, Yoshiki[1]; TORII, Takeru[1]; KINOSHITA, Natsuki[1]; KAWAUCHI, Keiko[1]; TATEISHI-KARIMATA, Hisae[2]; SUGIMOTO, Naoki[1, 2]; MIYOSHI, Daisuke[1]

グアニンに富んだ核酸配列はグアニン四重らせん構造 (G4) を形成することが可能である。G4 はテロメアやがん関連遺伝子のプロモーター領域・mRNA の 5'-UTR 領域に局在し、テロメア伸長抑制や遺伝子の発現調節など、様々な生物学的プロセスに関与する [1)]。そのため、G4 は新規がん治療薬の標的として注目されている。さらに G4 の生物学的な意義を解明するために、G4 リガンドを用いた細胞内 G4 のイメージングも近年注目されている。これらのような目的で G4 リガンドの細胞内応用が盛んに試みられている。G4 リガンドの細胞内応用にあたって、細胞内の核酸存在環境に注目すると、細胞内ではゲノム DNA の大部分が二重らせん構造を形成し、塩基数にして 6000×10^6 塩基存在する。一方で G4 はゲノム上に 70 万ヶ所の形成可能配列が存在し、塩基数に換算すると約 14×10^6 塩基である [2)]。このように、細胞内では G4 と比較して大過剰の二重らせん構造が存在する。そのため、細胞内で応用する G4 リガンドには高い構造選択性が要求される。しかしながら、これまでに高い構造選択性を有する G4 リガンドはほとんど報告されていない。その原因として、構造選択的 G4 リガンドを取得するためのハイスループットスクリーニングシステムがいまだに開発されていないことや、構造選択性をもたらす G4 リガンドの分子骨格が明らかにされていないことが挙げられる。

そこで本研究では、G4 構造選択的な蛍光プローブである Thioflavin T (ThT) [3)]を用いたスクリーニングシステムである ThT-Displacement assay (TD assay) を構築した。本手法は細胞内の核酸環境を模倣した過剰二重らせん構造 DNA 存在下で実施可能なハイスループットスクリーニングシステムである。本手法によって、構造選択的 G4 リガンド候補を取得し、転写活性や細胞増殖に及ぼす抑制効果を検討した。さらに取得した候補化合物の誘導体を用い、G4 に対する結合親和性を検討することで構造選択性に重要である構造因子を明らかにした。発表では取得した構造選択的 G4 リガンド群とその物性についても報告する。

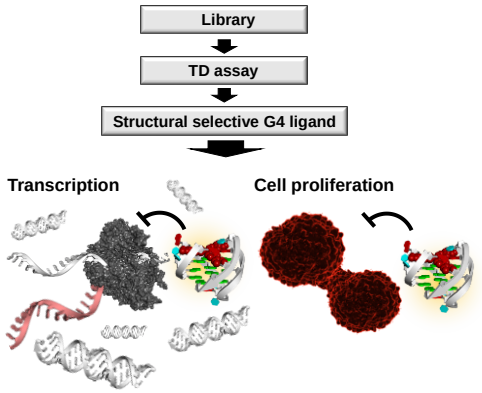


Fig. Schematic illustration of structural selective G4 ligand development.

1) D. Rhodes, *et al., Nucleic. Acid. Res*. **43**, 8627-8637 (2015).
2) V. S. Chembers, *et. al., Nat. Biotechnol*. **33**, 877-881 (2015).
3) V. Gabelica, *et al., Biochemistry* **52**, 5620-5628 (2013).

人工核酸 L-*a*TNA と SNA の化学的な鋳型合成の速度論解析を基盤とした長鎖伸長反応法の構築

○沖田ひかり・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

Development of Long-Chain Elongation Reaction Based on Kinetic Analysis of Chemical Template-Directed Ligation of L-*a*TNA and SNA (Graduate School of Engineering, Nagoya University) OKITA, Hikari; MURAYAMA, Keiji; ASANUMA, Hiroyuki

DNA のリボース骨格を改変した XNA(ゼノ核酸)は高い分解酵素耐性を有しており、当研究室でも非環状型の XNA を創出してきた。特に L-*a*TNA[1]や SNA[2]は各々、相補鎖だけでなく、天然核酸とも安定な二重鎖を形成できるため、生物学的ツールとしての応用が期待されている(Fig. 1)。しかしながら、XNA 骨格が酵素に認識されないため、酵素反応へ応用することが困難であった。そこで、酵素の代わりに縮合剤 *N*-cyanoimidazole と Mn^{2+}を用いた化学連結法によって非環状型 XNA の鋳型合成法の開発を行ったところ、3-mer の L-*a*TNA ランダム配列プールを用いた 17-mer L-*a*TNA の配列複製に成功した[3]。また、8-mer 断片の連結反応において L-*a*TNA の方が SNA よりも 17 倍以上連結速度が速いことも確認している。本研究では(1) L-*a*TNA-SNA キメラ配列の反応解析を行い、その結果をもとに(2)最適な伸長方向・二価金属イオンを検討し、最終的に(3)化学連結法による L-*a*TNA の長鎖伸長反応法の高効率化を試みた。

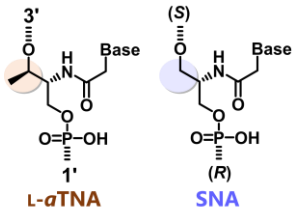


Fig. 1. Chemical structures of L-*a*TNA and SNA.

(1)連結部位または末端部位に数個の L-*a*TNA を導入した L-*a*TNA-SNA キメラ配列を用いて、8-mer 断片の連結反応を比較した。その結果、連結部位に L-*a*TNA を導入した方が末端部位に導入した場合に比べ 7 倍以上連結速度が速く、連結部位における L-*a*TNA の骨格構造が連結効率の向上に重要であることが示唆された。また、連結部位のリン酸基側が L-*a*TNA であると加速の効果が大きいことも明らかになったことから、プライマー(反応開始鎖)の連結部位にリン酸基が存在すると連結効率が向上するのではないかと考え、伸長方向の検討を行うことにした。

(2)伸長方向の検討では 3 種類の 3-mer の L-*a*TNA 断片を用いた 17-mer の配列複製にて 1'→3'方向と従来の 3'→1'方向の伸長速度を比較したところ、1'→3'方向の方が高い連結効率を示した(Fig. 2)。更に反応を加速させるために、リン酸基との相互作用が予想される二価金属イオンの種類を検討したところ、Cd^{2+}を用いた場合、極めて高い連結効率を示すことが明らかになった。

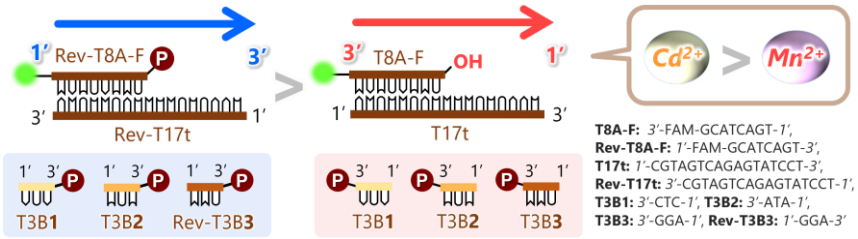


Fig. 2. Elongation direction and divalent metal cation in L-*a*TNA replication.

(3)最後に、最適化された 1'→3'方向かつ Cd^{2+}の条件のもと、従来の 17-mer よりも長い 23-mer、29-mer の L-*a*TNA 鋳型鎖上で 3-mer の L-*a*TNA ランダム配列プールを用いた逐次的な連結反応を試みたところ、両場合とも高効率に目的産物が得られたことが明らかになった。以上の結果より、反応条件の最適化を行うことで、長鎖 L-*a*TNA の配列複製法の確立に成功した。

[1] K. Murayama *et al*, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 6500. [2] H. Kashida *et al, Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 1285. [3] K. Murayama, H. Okita *et al*, *Nat. Commun.*, **2021**, *12*, 804.

mRNA 配列の翻訳効率と精度への影響の網羅的解析と人工抗体・環状ペプチドの高多様性ライブラリ創製への応用

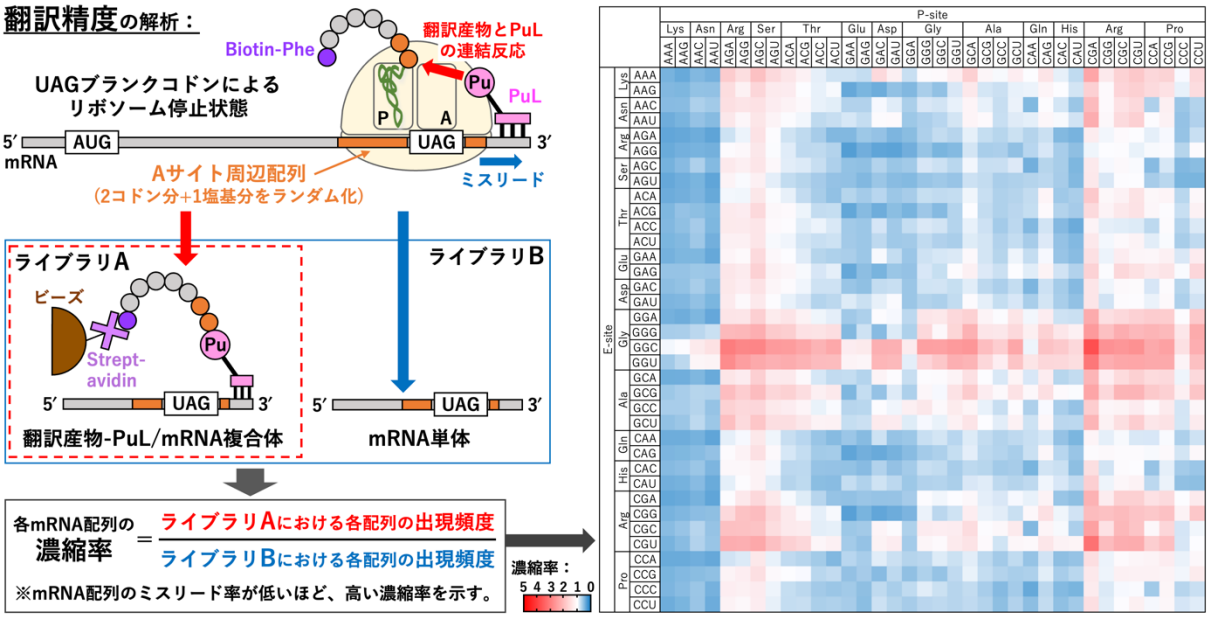
○梅本駿[1]・近藤太志[1]・藤野公茂[1]・林剛介[1]・村上裕[1,2]（[1]名大院工、[2]名大ナノライフ）

Construction of Highly Diverse Monobody and Macrocyclic Peptide Libraries Based on the Effect of mRNA Sequences on Translation Efficiency and Accuracy (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University[2].) UMEMOTO, Shun[1]; KONDO, Taishi[1]; FUJINO, Tomoshige[1]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1,2]

タンパク質の翻訳効率と翻訳精度は、mRNA 配列による影響を受けることが知られている。mRNA 配列が翻訳効率に与える影響については、*in vivo* で大規模に解析した例がこれまでに数多く報告されている[1-2]。しかし、*in vivo* での翻訳量は mRNA の転写効率などの違いも反映されるため、翻訳効率を直接評価することができない。そこで、私たちは再構成無細胞翻訳系と mRNA 提示法を用いて、*N* 末端領域の mRNA 配列による翻訳効率への影響を直接的に大規模解析した。その結果、*N* 末端領域が及ぼす翻訳効率への影響は、5'-UTR 配列とタンパク質の塩基配列に強く依存することが分かった。

翻訳精度に対しては、mRNA 配列が及ぼす影響を大規模に解析した研究はない。そこで、私たちは先ほどと類似の手法で、リボソームの A サイト周辺に存在する mRNA 配列による翻訳精度への影響を大規模解析した。翻訳精度の指標となる濃縮率を比較した結果、E サイトおよび P サイトのコドンが翻訳精度に大きく影響することが分かった。A サイトの UAG コドン直後の 1 塩基については、ピリミジン塩基よりもプリン塩基の方が A サイトのミスリードを強く誘発した。

これらの解析結果を活用して、より大きな多様性を持つ Monobody ライブラリ[3]と大環状ペプチドライブラリ[4]の構築を試みたところ、1 mL の翻訳液換算で約 100 兆種類のライブラリが調製できることが示された。進化分子工学的手法においてライブラリの多様性は機能性の高い分子を創製するために最も重要な要素の一つであるため、この成果は有用な人工抗体・大環状ペプチドの開発に貢献するものと期待される。



[1] Kudla, G., et al. *Science* **324**, 255-258 (2009). [2] Goodman, D. B., et al. *Science* **342**, 475-479 (2013).
[3] Kondo, T., *et al. Sci. Adv.* **6**, eabd3916 (2020). [4] Ishizawa, T., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **135**, 5433-5440 (2013).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

メチル化 RNA を検出する発蛍光性合成色素/タンパク質ハイブリッドプローブの開発

○上川 拓也[1,2]・堀 雄一郎[2]・野村 佳祐[1]・松木 星[1]・菊地 和也[1,3]（[1]阪大院工、[2]九大院理、[3]阪大免フロ）

Development of fluorogenic synthetic fluorophore/protein hybrid probes for detection of methylated RNA ([1]*Graduate School of Engineering, Osaka University*, [2]*Graduate School of Science, Kyushu University,* [3]*Immunology Frontier Research Center, Osaka University,*) KAMIKAWA, Takuya[1,2]; HORI, Yuichiro[2]; NOMURA, Keisuke[1]; MATSUKI, Akari[1]; KIKUCHI, Kazuya[1,3]

アデノシンの *N* ^{6}-メチル化は、重要な RNA 転写後修飾のひとつとしてよく知られている。*N* ^{6}-メチルアデノシン(m^{6}A)は、RNA の安定化・スプライシングなどの遺伝子発現制御に関与するだけでなく、II型糖尿病・COVID-19・癌などの疾患と関連することが報告されていることから、その検出技術の開発は、生命科学に加え医学分野においても重要な課題である [1]。しかし、メチル化 RNA を可視化するために従来開発された、m^{6}A 結合タンパク質と蛍光タンパク質を融合させたバイオプローブを用いる手法は、遊離状態のプローブからも蛍光がみられるなどの課題を残している [2] 。

本課題を解決するため、演者らが開発してきた PYP (Photoactive yellow protein)タグと合成蛍光色素を用いるタンパク質ラベル化技術を応用した [3]。これまでに、本技術を用いて、メチル化 DNA と結合した際に蛍光強度が増大する発蛍光プローブを開発し、生きた細胞内の細胞分裂過程におけるメチル化 DNA 動態の可視化を達成している [4]。本研究では、この設計戦略を応用し、m^{6}A の蛍光検出法の構築を志向した発蛍光性を示す合成色素/タンパク質ハイブリッドプローブの開発を行った。ハイブリッドプローブは、m^{6}A を認識し結合する YTH ドメインと PYP タグを組み合わせた融合タンパク質と核酸と結合した際にその蛍光性を回復する核酸結合色素により構成されている (Figure 1)。ハイブリッドプローブの蛍光特性を調べた結果、メチル化 RNA を in vitro で蛍光検出できることを示した。本発表では、ハイブリッドプローブの分子設計、蛍光特性および m^{6}A を有した RNA に対する結合能についての詳細を報告する。

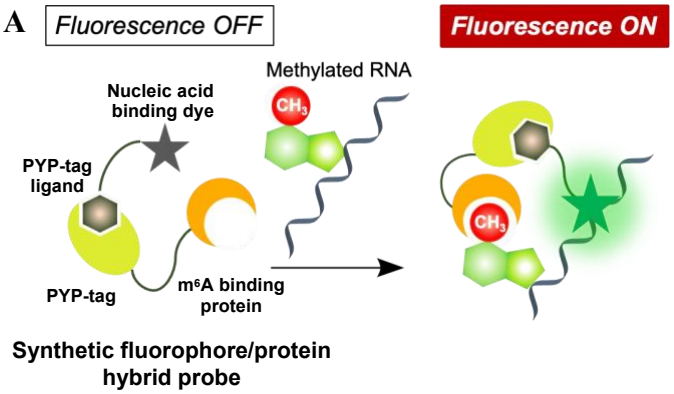


Figure 1. Principle of fluorogenic detection of methylated RNA constructed by PYP-tag labeling system.

1) T. Sun, R. Wu, L. Ming, *Biomed. Pharmacother.* **112**, 108613 (2019).

2) L. Kan, A. V. Grozhik, J. Vedanayagam, D. P. Patil, N. Pang, K. S. Lim, Y. C. Huang, B. Joseph, C. J. Lin, V. Despic, J. Gao, D. Yan, S. Kondo, W. M. Deng, P. C. Dedon, S. R. Jaffrey, E. C. Lai, *Nat. commun.* **8**, 15737 (2017).

3) S. I. Reja, Y. Hori, T. Kamikawa, K. Yamasaki, Mi. Nishiura, S. D. Bull, K. Kazuya. *Chem. Sci.* **13**, 1419 (2022).

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

RNA 四重らせん構造を標的とした小分子による液液相分離の制御

○高宮渚[1]・鶴田充生[1]橋本佳樹[1]川内敬子[1]三好大輔[1]（[1]甲南大 FIRST）

Regulation of liquid-liquid phase separation by small molecules targeting RNA G-quadruplex (Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University[1]) TAKAMIYA, Nagisa[1]; TSURUTA, Mitsuki[1]; HASHIMOTO, Yoshiki[1]; KAWAUCHI, Keiko[1]; MIYOSHI, Daisuke[1]

筋萎縮性側索硬化症（ALS）や脆弱 X 関連振戦/失調症候群（FXTAS）などの神経変性疾患は、詳細な発症メカニズムが解明されておらず、治療薬・治療法の開発における課題となっている。近年、これらの神経変性疾患の原因タンパク質と mRNA が液液相分離現象（LLPS）を誘起することが報告されている[1)]。LLPS は、均質な液相を 2 つの異なる液相に分離する現象であり、ストレス顆粒や核小体などの Membraneless organelle（MLO）の形成につながる。LLPS は代謝やシグナル伝達、遺伝子発現などの重要な生体反応を制御するために用いられている。一方で、異常な LLPS はタンパク質の凝集やフィブリルの形成を誘発する。このことから、LLPS を抑制することで、フィブリルの形成が抑制し、疾患治療に繋がる可能性がある。LLPS を抑制させる化合物として、タンパク質に結合し LLPS を可溶化する Bis-ANS が報告されている[2)]。しかし、この化合物は特異性がないため、正常な LLPS も抑制してしまうことが問題である。このことから、疾患に関連する LLPS を特異的に抑制する化合物を同定する必要がある。LLPS に関与するタンパク質のドメインは天然変性領域として知られ特定の構造を形成しない。そのため、LLPS を制御する際に特定のタンパク質を標的とする低分子化合物を開発することは困難である。LLPS においてタンパク質と同様に重要な役割を果たす生体分子に mRNA がある。神経変性疾患に関与する MLO であるストレス顆粒には、FMR1 遺伝子の非翻訳領域に存在する GC 反復配列が異常拡張された mRNA が含まれる。このようなグアニンに富んだ配列は、グアニン四重らせん構造（G4）を形成できる。さらに、FMR1 遺伝子から翻訳されるタンパク質である FMRP の RGG domain を模倣したペプチドは G4 に選択的に結合することが報告されている。これらのことからストレス顆粒に G4 の形成が関与していることが示唆されている。これまでに様々な G4 に対して親和性を有する小分子が報告されていることから[3)]、G4 を標的とすることことで LLPS を制御できる化合物の創製できる可能性がある。

そこで本研究では、まず標的 RNAG4［$r(G_2C)_4$ 及び $r(G_4C_2)_4$］に結合する化合物の同定を行った。（Fig 1.）次に、RNAG4 含む LLPS モデルシステムを用い、同定した化合物の LLPS に対する効果を検討した（Fig 2.）。その結果、LLPS を抑制することができる化合物群を見出した。

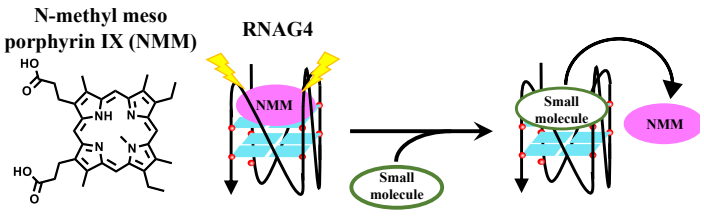


Fig 1. Schematic illustration of the method used in this study, an experiment to evaluate the affinity of small molecules for RNAG4.

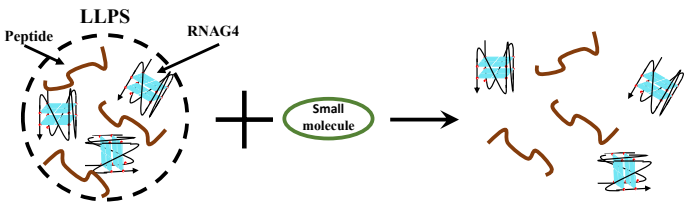


Fig 2. Schematic illustration of the method used in this study, an experiment to evaluate the effect of small molecules on LLPS.

1) J. P. Taylor, *et. al., Nature*, **539**, 197-206 (2016)
2) W. K. Surewicz, *et. al., Nat. Commun.*, **11**, 5574-5590 (2020)
3) S. Balasubramanian, *et. al., Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 261-275 (2011)

3’チオ化オリゴ核酸を用いた長鎖 DNA アセンブリ技術の開発

○加瀬光希弥[1]・稲垣雅仁[1]・平岡陽花[1]・橋谷文貴[2]・阿部奈保子[1]・木村康明[1]・阿部 洋[1,3,4]（[1]名大院理、[2]名大物国センター、[3]JST CREST, [4]iGCORE）

Development of long-chain DNA assembly technology by using 3’-thio-phosphorothiolate oligodeoxynucleotides (Graduate School of Science, Nagoya University[1], Research Center for Material Science, Nagoya University[2], Japan Science and Technology Agency, JST-CREST[3], Institute for Glyco-core Research (iGCORE)[4]) Mikiya, Kase[1]; Inagaki, Masahito[1]; Hiraoka, Haruka[1]; Hashiya, Humitaka[2]; Abe, Naoko[1]; Kimura, Yasuaki[1]; Abe, Hiroshi[1,3,4]

近年、CRISPR-Cas9 に代表されるゲノム編集技術の発展に伴い、人工的にゲノム DNA を合成する研究が注目されている。数十万塩基対を越えるような長いゲノム DNA を合成するためには、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅した短鎖 DNA 断片を正確かつ高効率に連結する DNA アセンブリ技術の開発が重要である。DNA アセンブリ技術は、酵素的手法と化学的手法に大別される。酵素的手法の代表としてゴールデンゲート法が挙げられるが、制限酵素を用いるため切断配列に制限があり、複数の DNA 断片を連結する場合には配列設計の自由度が低いという問題点が指摘されている [1]。また、調製できる接着末端の長さが 4 塩基に規定されてしまうため、連結効率がリガーゼの活性に依存し、コントロールすることが困難である。そこで我々は、制限酵素を用いること なく化学的核酸鎖切断により任意の配列と塩基数を有する接着末端を調製し、リガーゼによる連結効率向上を可能にする手法の開発に取り組んでいる。本研究では、高効率かつ正確な核酸連結により、ゲノムサイズ DNA 合成へと応用しうる新規化学的核酸鎖切断法の開発に取り組んだ。具体的には、オリゴ核酸中、任意の位置のリン酸ジエステル結合 3'酸素原子を硫黄原子に改変したチオリン酸ジエステル結合を導入する [2] ことにより、チオリン酸ジエステル結合部位において特異的に化学的鎖切断を誘起する手法を開発した。このような鎖切断反応は、銀ナノ粒子を用いることにより誘起可能であることを見出した。さらに、チオリン酸化オリゴ核酸をプライマーとして用いた PCR により目的配列 DNA を増幅後、得られた増幅産物 DNA を貴金属ナノ粒子で処理することにより任意の長さ・配列を有する接着末端を調製できることを明らかにし、つづく DNA リガーゼによる DNA 連結により数百塩基対を超える長鎖 DNA を合成することに成功した。本発表では、3’チオ化核酸の高効率合成法の開発、銀ナノ粒子によるオリゴ核酸鎖切断反応の実証とその長鎖オリゴ核酸合成への応用について紹介する。

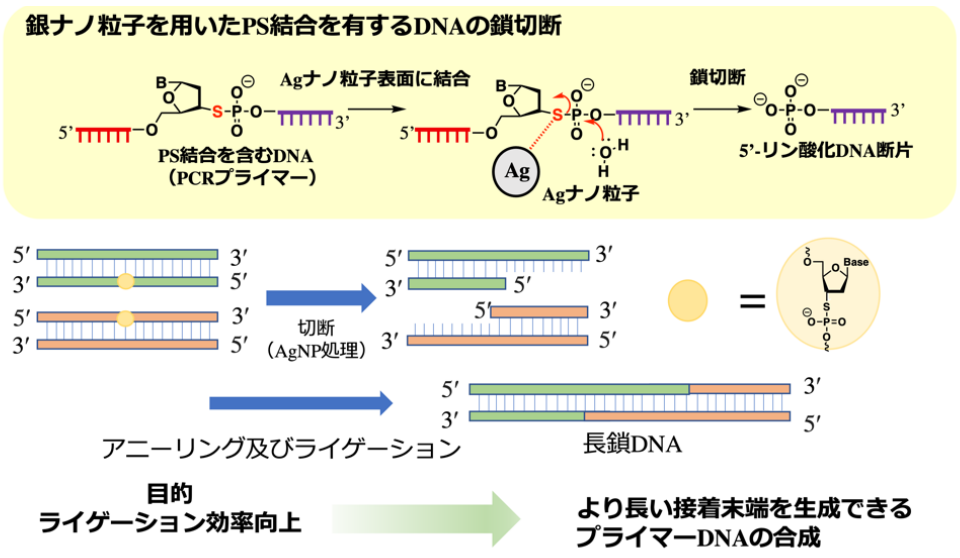


Fig 1. DNA Assembly Method Based on Silver Nanoparticle Induced Strand Cleavage

1） S. Marillonnet, *et al., PLoS ONE*, **2008**, *3*(11), e3647.
2） (a) J. S. Vyle, *et al, Biochemistry*, **1992**, *31*, 3012; (b) G. Sabbagh, *et al., Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*(2), 495.

細胞核に蓄積する Hoechst 修飾 DNA の合成と評価

○蒔苗宏紀・西原達哉・田邉一仁（青山学院大学大学院　理工）

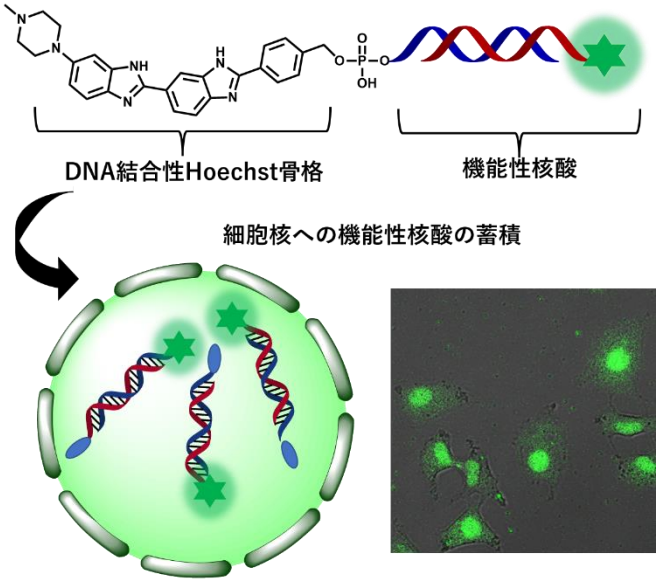
Synthesis and Evaluation of Hoechst-Tethered Oligodeoxynucleotides that Accumulate in Cell Nucleus

(Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) ○MAKANAI, Hiroki, NISHIHARA, Tatsuya, TANABE, kazuhito

人工核酸は遺伝子を標的とした核酸医薬品として機能するだけでなく、細胞内において生体内因子との結合、捕捉、機能制御など多様な特性を示す機能分子として駆動することが知られる。これまでに、細胞内の各種因子のイメージングに資する人工核酸、細胞内で駆動する DNA 型ナノマシン、薬剤を運搬する人工核酸などが開発され、人工核酸の多様性・多機能性が示されてきた。このように、細胞内で駆動する人工核酸が多数開発されているが、そのほとんどは細胞質内で駆動するものであり、細胞核に運搬されて駆動する人工核酸はほとんどない。細胞核は、細胞の中で最も大きなオルガネラであり、ゲノム DNA も格納されていることから、人工核酸を細胞核に運搬できれば、さらに人工核酸の汎用性を高めることが可能である。

我々の研究グループではこれまでに細胞核内のバイオイメージングを指向し、核染色試薬である Hoechst に着目してきた。Hoechst 分子は DNA 二重鎖の副溝に結合する小分子であり、その結合定数は 10^8 レベルと非常に強固である。最近では、この特性を活用して細胞核内へ各種分子を選択的に輸送する運搬機能分子として活用できることが示されてきた [1, 2]。そこで本研究では DNA の末端に Hoechst 分子を修飾した人工核酸を設計・合成した。すなわち、Hoechst 分子の核選択的な蓄積能を活用した人工核酸の核内集積システムの構築ができると考えた。

本研究ではベンジルアルコールを有する Hoechst 誘導体を合成し、ホスホロアミダイト法を用いて DNA オリゴマーに Hoechst 部を導入した。得られた Hoechst 修飾 DNA オリゴマー(Hoechst-DNA)に DNA を添加し、DNA に対する結合能を、蛍光分光法を用いて評価した。その結果、DNA の添加量に伴って Hoechst-DNA 由来の蛍光強度が上昇したことから、Hoechst-DNA は強く二重鎖 DNA に結合することがわかった。なお、結合定数は $7.8\times10^5\ M^{-1}$ であった。続いて Hoechst-DNA の細胞核への蓄積能を評価した。核への蓄積を追跡するために、相補的な配列をもつ FAM 修飾 DNA と二重鎖形成させた後、リポフェクタミンを用いて Hoechst-DNA を細胞内へ導入した。その結果、FAM 由来の強い蛍光が細胞核から観測され、Hoechst-DNA が細胞核内へ蓄積していることが示唆された。現在、DNA 鎖長を変えた誘導体の合成と細胞核への蓄積能を評価しており併せて報告する。



1) A. Nakamura, S. Tsukiji, *Bioorganic Med. Chem. Lett,* **27** 3127 (2017)
2) D. Hara, Y. Umerhara, A. Son, W. Asahi, S. Misu, R. Kurihara, T. Kondo, K. Tanabe, *ChemBioChem,* **18** 956 (2018)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

RNA Hacking 技術を基盤とした超選択的な Staple 核酸による遺伝子機能解明

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

Elucidation of gene function based on RNA Hacking technology by super selectivity Staple oligomer (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University[1], Faculty of Science and Technology, Hirosaki University[2], Institute for Chemical Research, Kyoto University[3]) KIDA, Tomoki[1]; KATSUDA, Yousuke[1]; KAMURA, Takuto[1]; LAVIN, Kotone[1]; KITAMURA, Yusuke[1]; HAGIHARA, Masaki[2]; SATO, Shin-ichi[3]; IHARA, Toshihiro[1])

生命活動は遺伝子の働きによって恒常性が保たれており、これら遺伝子機能に異常が生じることによって数多くの疾病は引き起こされる。したがって遺伝子機能や相互関係を解明することは、新たな創薬の可能性を見出すことができるため高い注目を集めている。近年では遺伝子発現抑制技術の一つである siRNA を用いることで標的遺伝子の機能解明が試みられている。これら技術は低分子化合物と比較して標的選択性が高い技術であるが、標的配列との相同性が高い遺伝子にも結合してタンパク質発現抑制をしてしまう狭義の Off-target 効果が生じる。したがって既存技術を利用して単一遺伝子の機能を正確に解明することは難しいと言わざるを得ない。

我々は Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を用いて標的 mRNA 上にタンパク質翻訳反応を阻害する RNA G-quadruplex（RGq）の形成を誘導する新規技術を開発している（Fig. 1a）。本技術はグアニン繰り返し配列を近接化し、RGq 構造の形成誘導が行われることでのみ遺伝子発現抑制機能が作動することから既存技術よりも標的選択性の高い技術である。

in vivo 検討における先行研究で、我々は Staple 核酸によりカルシウムチャネルの一つである Trpc6 発現を抑制することに成功している。また、狭義の Off-target 効果を評価するために Trpc6 と配列相同性が高い Trpc3 の発現量を評価したところ、予想と反して Trpc3 発現量が上昇していることを確認した。一般的に Trpc6 と Trpc3 はヘテロ四量体を形成し生体内で機能していることから、Trpc6 の発現抑制を行うことでフィードバック機構のように Trpc3 の発現が上昇したことが考えられる（Fig. 1b）。このような現象は既存の研究では報告されておらず、siRNA などでは狭義の Off-target 効果により Trpc3 の発現も共に抑制している可能性が考えられる。本結果は標的選択性が高い Staple 核酸技術を利用することによって見出されたものであり、既存技術では探し出すことが難しい遺伝子機能を解明できる新規ツールとして利用可能である。

本発表では Trpc6 および Trpc3 の発現量変化を Staple 核酸と siRNA で比較し、さらに Staple 核酸技術が標的選択性を向上させるメカニズムに関して報告する。

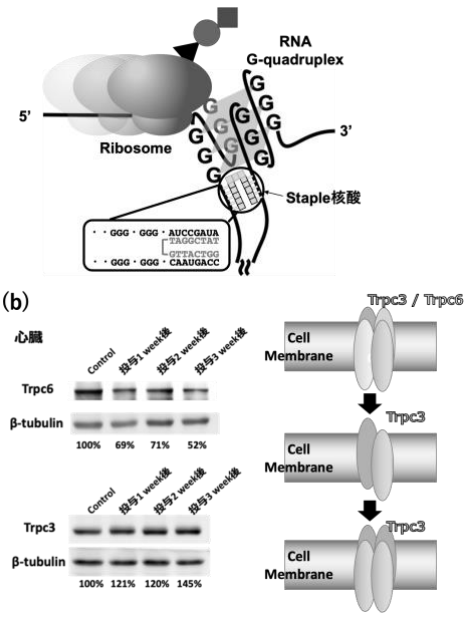


Fig. 1 (a) Staple 核酸技術の概念図。Staple 核酸の導入により RGq 構造の形成を誘導しタンパク質翻訳反応を抑制する。(b) Staple 核酸による Trpc6 の発現抑制効果並びに Trpc3 の発現量、および想定されるフィードバック機構の概念図。

グアニン四重らせん構造が形成する液滴の核酸配列特異的制御

○鶴田充生[1]・取井猛流[1]・小畠一起[1]・川内敬子[1]・建石（狩俣）寿枝[2]・杉本直己[1,2]・三好大輔[1]（[1]甲南大 FIRST、[2]甲南大 FIBER）

Sequence specific control of liquid droplets composed of RNA G-quadruplex (Graduate School of Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan University[1], FIBER (Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research), Konan University [2]) TSURUTA, Mitsuki[1]; TORII, Takeru[2]; KOHATA, kazuki; KAWAUCHI, keiko; TATEISHI-KARIMATA, Hisae; SUGIMOTO, Naoki; MIYOSHI, Daisuke

細胞内での液液相分離現象を介した生体分子の液滴（ドロプレット）形成は、様々な生体反応を制御する新たな分子機構として注目されている[1]（Figure）。これまで知られていた細胞内に存在している生体分子の foci も次々とドロップレットであることも明らかにされている。これらのドロプレット内に封入されるタンパク質の多くは、プリオン様ドメインや RGG ドメインなどの天然変性領域を含むことが知られている。

ドロプレット形成は神経変性疾患の発症にも関与していると考えられている。神経変性疾患の脆弱 X 関連振戦/失調症候群（fragile X tremor/ataxia syndrome：FXTAS）では、*FMR1* 遺伝子上の GGC の繰り返し配列が異常に拡張することで疾患発症につながると考えられている。このようなグアニンリッチな配列は、核酸の非標準構造の代表例であるグアニン四重らせん構造（G4）を形成する可能性がある。さらに興味深いことに、RNA の G4 は RGG ドメインと選択的に結合することも報告されている[3]。このように疾患関連ドロプレットの構成要素が明らかとなりつつある。しかし、ドロプレットの分解に有効な薬剤の報告例はない。

そこで本研究では、GGC 反復配列が形成する G4 を標的とし、G4 の相補鎖となるオリゴ核酸を添加することでドロプレットの抑制を試みた。そのためにまず、*FMR1* 遺伝子から転写される RNA 由来の配列（FMR1 RNA：$r(GGC)_4$）と *FMR1* 遺伝子から発現されるタンパク質である FMRP の RGG ドメイン由来のペプチド配列（RGG peptide：RRGDGRRRGGGGRGQGGRGRGGGFKGNDDHSRGGW）を用いてドロプレットのモデルシステムを構築した。次にモデルシステムを用いて、ドロプレットに対する G4 形成配列の相補鎖の効果を検討した。その結果、相補鎖配列が標的 RNA の構造を G4 から二重鎖へ遷移させることで、ドロプレットの形成を抑制することが示された。さらに、相補鎖と形成する二重鎖の熱力学的安定性が高いほど、ドロプレットの分解効率も高くなることが分かった。このように、液液相分離現象を制御可能なアンチセンス核酸は、疾患関連ドロプレットに対する新たな創薬モダリティとなると期待される。

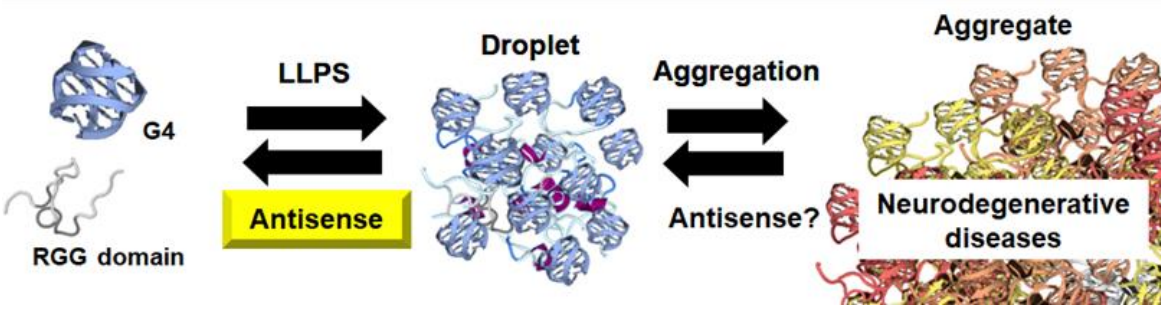


Figure. Droplets formed by RGG domain with G4 RNA and disassembled by antisense nucleotide.

1）K. Kohata *et al.*, *Biophys. Rev.*, **2020**, 12, 669.
2）A. T. Phan *et al.*, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 18, 796.

がん細胞選択的細胞毒性を示す二核銅錯体の細胞死誘導機構の解明

○畑 真知[1]・浦野 泰臣[2]・人見 穣[1]・野口 範子[2]・小寺 政人[1]（[1]同大院理工、[2]同大院医生命）

Mechanism of cancer-cell-selective cytotoxicity by dicopper complexes (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University[1], Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University[2]) HATA, Machi[1]; URANO, Yasuomi[2]; HITOMI, Yutaka[1]; NOGUCHI, Noriko[2]; KODERA, Masahito[1]

抗がん剤として臨床利用されているブレオマイシンは DNA 標的部位をもち、投与後に Fe や Cu と錯形成して DNA 切断部位を形成する。DNA 標的部位と切断部位の組み合わせは、DNA 切断による細胞毒性の発現に効果的である。しかし、ブレオマイシンは副作用として肺毒性を伴う問題がある。この原因として、これらの抗がん剤は、がん細胞だけでなく正常細胞にも作用することが挙げられる。その為、副作用の軽減に向けて、がん細胞に対して選択的に作用する抗がん剤の開発が求められる。

これまでに我々は、がん細胞の微小環境(低 pH，高い活性酸素種濃度，高い抗酸化物質濃度)を利用して、がん細胞選択的に細胞毒性を発現する二核銅錯体を開発してきた。その中で、金属結合部位に 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen)を持つ Hbcamide 配位子の二核銅錯体[Cu_2(μ-OH)(bcamide)](ClO_4)$_2$ (**1**) (Fig 1)が H_2O_2 濃度に比例して DNA 切断を促進することを見出した[1]。錯体 **1** は、がん細胞に対して正常細胞よりも約 3 倍高い細胞毒性を示した。しかし、ヒト子宮頸癌由来のがん細胞である HeLa 細胞に対する **1** の IC_{50} 値は 1,000 μM 以上で、既存の抗がん剤よりも細胞毒性が低い。そこで、DNA 切断活性と細胞毒性の向上を目指し、cyclen を NH 基が 1 つ少ない 1,4,7-triazacyclononane (tacn)に置換した Hbtamide 配位子の二核銅錯体[Cu_2(μ-OAc)(OAc)$_2$(btamide)] (**2**) (Fig 1)を合成した。錯体 **2** は、様々ながん細胞への細胞毒性が錯体 **1** より 30 倍向上した。また、がん細胞に対して正常細胞よりも約 4 倍高い細胞毒性を示し、がん細胞選択性が向上した。この細胞毒性向上の理由を解明する為、in vitro 及び in vivo の測定を行った。その結果、金属錯体はがん細胞中の抗酸化物質との反応で酸素分子を活性化して活性酸素種を生成することがわかった。また、この生成した活性酸素種によりパイロトーシスと呼ばれる細胞死を引き起こしていることが示唆された。tacn-amide-tether 配位子の二核銅錯体 **2** は、がん細胞の微小環境を利用して高い細胞毒性を発現するので、がん細胞選択的な細胞毒性の発現が可能である。今回は、これらの機構について詳細について報告する。

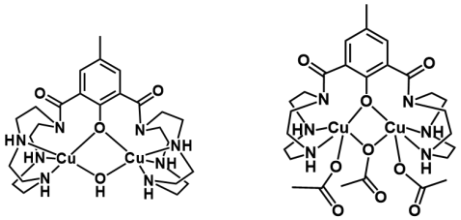


Fig 1. Chemical structures of **1** (left), **2** (right).

[1] Kadoya, Y.; Fukui, K.; Hata, M.; Miyano, R.; Hitomi, Y.; Yanagisawa, S.; Kubo, M.; Kodera, M. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 14294–14298.

RNA hacking によるフレキシブルな遺伝子発現増加技術

○五木結愛[1]・勝田陽介[1]・北村裕介[1]・萩原正規[2]・佐藤慎一[3]・井原敏博[1]（[1]熊本大学大学院先端科学研究部、[2]弘前大学大学院理工学研究部、[3]京都大学化学研究所）

Flexible gene expression increase technology by RNA hacking (Affiliation Faculty of Advance Science and Technology, Kumamoto University[1], Faculty of Advance Science and Technology, Hirosaki University[2], Institute for Chemical Research, Kyoto University[3]) ITSUKI, Yua[1]; KATSUDA, Yousuke[1]; KITAMURA, Yusuke[1]; HAGIHARA, Masaki[2]; SATO, Shin-ichi[3]; IHARA, Toshihiro[1]

感染症などの外的因子以外の疾病原因を煎じ詰めれば「遺伝子機能が適切範囲を外れる」ことにある。つまり生体機能の維持に必要不可欠な遺伝子であったとしても正常範囲以上の機能を発揮すれば疾病と判定され、小分子化合物や時には siRNA 機構に基づく核酸医薬を利用することで機能や発現量を抑制する手法で治療が試みられる。

しかし、その逆である必要遺伝子の機能不全や発現不足を補填するような疾病治療法は手薄になっていると言わざるを得ない。確かにアロステリックサイトに結合し機能活性化を可能とする小分子など臨床シーンに登場する医薬品はわずかながら存在しているものの、未だ大きな開発スペースがあることは明らかである。

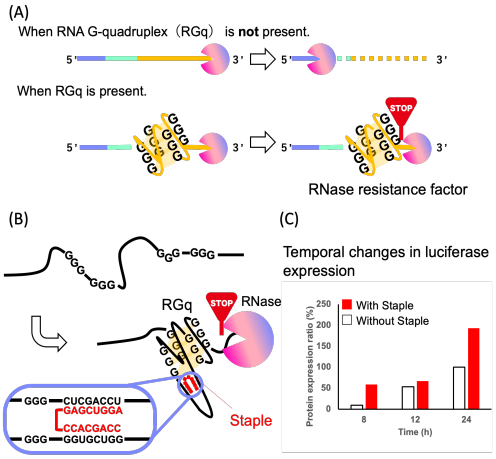


Fig.1 (A) 3 'UTR における RGq の役割。mRNA の 3'→5'RNase の耐性因子となり安定性をあげる。(B) Staple 核酸による RGq 形成は mRNA 安定化の要因となる。(C)Staple 核酸による3'UTR の RGq 形成によるルシフェラーゼ発現量の評価。Staple 核酸が存在する時タンパク質発現量が増加している。

このような状況下、遺伝子疾患に基づくたんぱく質補填技術に関しては mRNA ワクチンやスプライシング制御型アンチセンスオリゴ核酸（SSO）などの開発が進められており、東京医科歯科大学横田隆徳らのグループや名古屋大学阿部洋らのグループにおいても臨床応用が現実的になるような魅力的な研究が展開されている。

これに対し我々のグループでは Staple 核酸と名づけた短鎖核酸によって mRNA に RNA 高次構造の形成を誘導する RNA hacking（RNAh）という技術開発を試みている。その中でも、近年においては細胞内で非常に安定な高次構造である RNA G-quadruplex（RGq）の形成を誘起する研究開発に取り組んでいる。RGq は形成する位置によって様々な機能を発揮することが知られており、5'UTR や ORF では遺伝子発現抑制効果を示し 3'UTR では RNA 分解酵素の伸長を阻害するとされている（Fig.1A）。

そこで本発表において我々は Staple 核酸を利用した 3 'UTR での RGq 形成誘導、およびそれに伴うタンパク質発現の増加効果に関する検討を報告する（Fig.1B）。

本技術は全 mRNA に共通して存在する 3 'UTR に作用することでタンパク質発現の量のみを増加させるもので、技術が確立することであらゆる遺伝子を標的とした設計が可能な汎用性の高いものになる考えられ、現在の核酸医薬における新たな選択肢を提供できると期待している。

本発表において、同機序開発の現状について報告する（Fig.1C）。

鎖置換反応を利用した DNA 足場 BRET システムの動的制御

○高野史章・南出悠貴・仁木智哉・田花汐理・葛谷明紀（関西大化学生命工）

Dynamic control of DNA scaffolded BRET system using strand displacement reaction. (Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University.) TAKANO Fumiaki, MINAMIDE Yuki, NIKI Tomoya, TABANA Shiori, KUZUYA Akinori.

蛍光色素で標識を行う顕微鏡観察法では、強い励起光の照射に伴う蛍光色素の退色や細胞毒性が問題になる。発光タンパクを励起源として用いれば、これらの問題を回避することができる。しかし、発光タンパクの波長は基質に依存して固定されている。そこで、発光タンパクと蛍光タンパク質を適切なリンカーを介して融合タンパク質として波長変調することが考えられる [1]。この生体発光共鳴エネルギー移動 (BRET) システムでは、効率的なエネルギー異動が可能な反面、多大な労力を伴う遺伝子組換え実験によるリンカーの配列、長さの最適化が必要である。本研究では、DNA をリンカーとした BRET/FRET システムを活用した多色発光システムを開発した。まず DNA をハイブリダイゼーションさせることで BRET を誘導した。次いで、DNA に複数の蛍光色素を導入し、さらに長波長へ変調することができる。これにより RGB 発光が可能となり 3 つの DNA 複合体濃度を調整することでマルチカラーな発光を自在に選択できる系を実現した。また、ハイブリダイゼーション、鎖置換反応を利用することで色調の変化をリアルタイムで観察した。

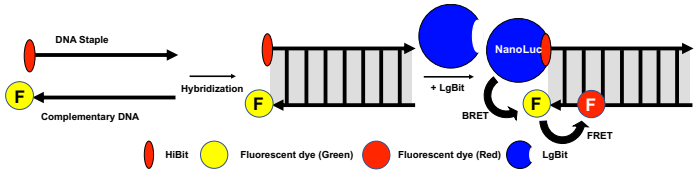


Fig 1. Multi-color bioluminescence using DNA as a linker.

NanoLuc (Nluc) 発光タンパクのスプリット体のうち、小断片側のペプチド鎖 (HiBit)を 5’末端に結合した HiBit-DNA を合成し、それと相補な FAM 修飾 DNA とハイブリダイゼーションさせた。その後、大断片側 (LgBit) 溶液を加え発光タンパクを DNA 末端で再構築した [2]。これに Furimazine を加えた結果、発光スペクトルおよび iPhone による撮影により BRET が観察された。このことは、二本鎖 DNA 末端で蛍光色素を発光タンパクの近傍に局在化させていることで BRET の誘導に成功した。また、赤色発光も Alexa594 を用いて同様に行った。より鮮明な緑色発光させるために、DNA に FAM を連続導入 (2FAM)したところ、分子同士の衝突により消光した。そこで、FAM 同士の衝突を考え、2 分子の FAM が二重螺旋の反対側に位置するように 4 塩基離して、2 分子目の FAM を鎖内に導入 (FAM Int FAM)した結果、予想通り FAM 蛍光を抑えることに成功した。結果として青色と緑色の発光強度比は FAM 1 分子の 2.9 と比較して 8.8 と大幅に向上した (Fig 2A)。より鮮明な赤色発光では 2 つのアプローチを試みた。1 つ目は FAM を一旦経由してその後、FAM と Alexa の間で FRET を起こさせる系。2 つ目は、2 分子の Alexa で直接エネルギーを受け取る系である。結果として FAM 経由で BRET と FRET を組み合わせることで、青色と赤色の発光強度比が向上し、より鮮明な赤色が得られた (Fig 2B)。RGB の 3 つの DNA 濃度を調整し、マルチカラーな発光として、白色および水色、黄色、ピンク色発光実現できたことから、3 つの DNA 濃度を調整するだけでマルチカラーな発光を自在に選択できることが確認できた。また、鎖置換反応により緑色から赤色へ変化している様子が発光スペクトルおよび動画から観察できた。

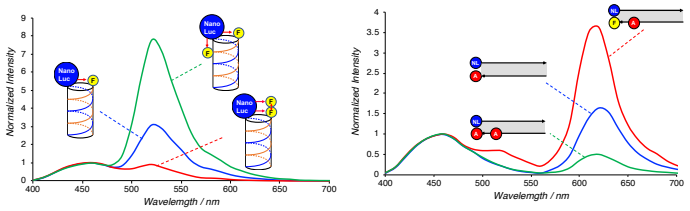


Fig 2. (A) Normalized intensity of (green) FAM Int FAM, (blue) FAM, (red) 2FAM. (B) Normalized intensity of (red) FAM Int Alexa594, (blue) Alexa594, (green) Alexa594 Int Alexa594.

1) S. Sihuai, et al., *Int. J. Mol. Sci*, **2016**, *17,* 1704.
2) A. S. Dixon, et al., *Anal. Chem*. **2016**, *11*, 400-408.

プラスチックの分解速度向上を目指した酵素複合体の構築

〇澤田美波・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Construction of enzyme complexes for fast degradation of plastics (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SAWADA, Minami; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

環境負荷の低いプラスチックの処理方法として酵素 による分解が注目されている。この方法ではプラスチックをモノマーに分解し、それを原料として再びプラスチックを生産できるため、温和なケミカルリサイクルとして循環型社会の実現への寄与が期待されている。しかし、これら酵素によるプラスチックの分解は著しく遅いという問題がある。

自然界に目を向けてみると、プラスチックと同じく固相基質であるセルロースは酵素セルラーゼによって分解されている。セルラーゼはセルロースと結合する部位を持ち、さらにはセルロソームとして複合体化することで酵素が基質の表面に局在化し高い分解能力を示すことが知られている [1]。一方、生物にとって比較的新しい基質であるプラスチックを分解できる酵素にはこのような仕組みはない。従って、何らかの方法で酵素を基質であるプラスチック表面近傍に濃縮できれば、分解速度を向上できると考えられる。そこで本研究ではプラスチックを高速分解する酵素複合体の構築を目的として、①プラスチック分解酵素の複数連結、②プラスチック表面に対して親和性を持つタンパク質との連結、について検討した。

本研究では、プラスチック分解酵素にはポリエチレンテレフタレート （PET）加水分解酵素のひとつである LCC [2] を、プラスチック表面に対して親和性を持つタンパク質には当研究室で発見された高付着性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 由来のファイバータンパク質 AtaA [3] のリコンビナントタンパク質を、酵素の連結には混合するだけで自発的に特異的な架橋反応が起こる SpyTag/SpyCatcher システム [4] を、モデルとして利用した。まず SpyCatcher が 5 個つながった（SpyCatcher）$_5$、SpyTag を融合した LCC、SpyCatcher を融合した AtaA をそれぞれ大腸菌で生産、精製した（Fig. 1）。これらをエッペン中で混合し SDS-PAGE に供したところ SpyTag/SpyCatcher 間の連結に伴う電気泳動移動度の減少が観察され、①（SpyCatcher）$_5$を足場に LCC が複数連結した複合体と②SpyCatcher を介して LCC と AtaA が連結した複合体の構築がそれぞれ確認できた。当日は、これら複合体の活性についても報告する。

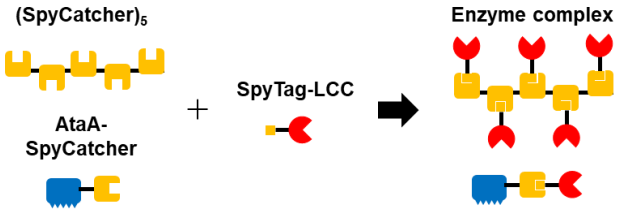


Fig. 1. Construction of enzyme complexes using SpyTag/SpyCatcher.

1) E.A. Bayer *et al.*, *Annual Review of Microbiology*, 58, 521-554 (2004)
2) V. Tournier *et al.*, *Nature*, 580, 216-219 (2020)
3) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLOS ONE*, 7, e48830 (2012)
4) A. H. Keeble *et al.*, *Angewandte Chemie. International Edition*, 56(52), 16521-16525

青色光照射により酸化される細胞内タンパク質の網羅解明

○藤浩平[1]・上杉志成[1]（[1]京都大学化学研究所）

Chemoproteomic Identification of Blue Light-Damaged Proteins (*Institute for Chemical Research, Kyoto University* [1]) Toh Kohei[1]; Uesugi Motonari[2]

光照射は一般的にヒトの細胞にとって有害である。可視光はオプトジェネティクスや超解像イメージングなどの生物科学分野に多く利用されてきたが、その照射は細胞の機能障害を引き起こす可能性がある。特に可視光領域の青色光(400-500 nm)は比較的高いエネルギーをもち、細胞の老化や加齢に伴う病態の発生と関連するため重要である。青色光を生細胞に照射すると、内因性光増感剤から活性酸素の一つである一重項酸素($^1O_2$)が発生し、核酸、脂質、タンパク質が酸化される。核酸や脂質に関しては、どのような特徴を持つものが酸化ターゲットになっているのか、これまでに集中的に解明されてきた。一方で、タンパク質に関しては、$^1O_2$ により酸化されるアミノ酸残基がチロシン、ヒスチジン、トリプトファン、メチオニン、システインと分かっているものの、どのようなタンパク質が実際に細胞内で酸化されているのかは未解明であった。$^1O_2$ によるタンパク質の酸化は細胞内シグナルに様々な変化を与えるため、その全貌を明らかにしていくことは、青色光照射による細胞影響を考察する上で重要と考えられる。

ごく最近、窒素を化学構造中に含む化学プローブが、$^1O_2$ に酸化されたタンパク質に結合すると報告されている [1,2]。我々はこの知見をもとに、適切な窒素含有化学プローブを生細胞に加えれば、青色光照射により酸化されたタンパク質を捕捉できるのではないかと考えた(図 1a)。そこで様々なプローブを検討した結果、プロパルギルアミン(PA)を用いることで、青色光照射により酸化された細胞内タンパク質を効率よく捕捉できることがわかった。PA は化学構造中にアルキン基を含むため、アジド基を有するビオチンとクリック反応を行うことで、酸化されたタンパク質をアビジンビースで濃縮精製することができる。濃縮精製したタンパク質の網羅解析を行ったところ、角膜内皮細胞を含む様々な哺乳類細胞において、細胞接着や細胞移動に関わるタンパク質である Integrin β1 が突出して酸化されていることがわかった。さらに酸化された Integrin β1 の機能を解析した結果、Integrin β1 の構造変化、それに伴う細胞接着機能低下、インテグリン下流シグナルの不活性化が確認された(図 1b)。これらの結果より、本研究で開発した方法は、青色光照射により酸化され、機能を失ったタンパク質を解明できる方法として有用であることが示唆された。ポスターセッションでは、より詳細な実験手法と今後の展開について議論する。

1) Tamura, T.; Takato, M.; Shiono, K. and Hamachi, I. *Chem. Lett.*, **2020**, *49*, 145.
2) Tsushima, M.; Sato, S.; Miura, K.; Niwa, T.; Taguchi, H. and Nakamura, H. *Chem. Commun.*, **2022**, *58*, 1926.

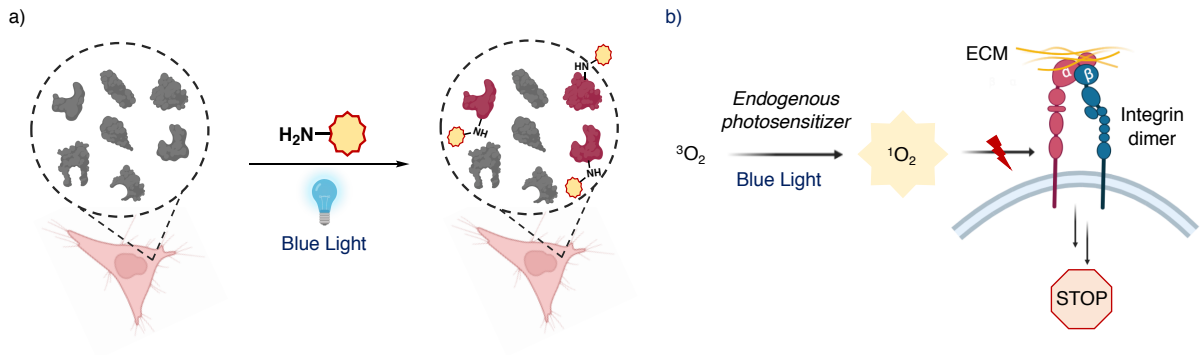


図 1 化学プローブを用いる青色光照射により酸化されるタンパク質の網羅的解析

4 量化する抗体軽鎖の会合挙動と構造解析に関する研究

○酒井 隆裕[1]・Wahyu Fitriana[1]・真島 剛史[1]・小林 直也[1]・山口 将平[1]・一二三 恵美[2]・宇田 泰三[3]・緒方 英明[4]・廣田 俊[1]（[1]奈良先端大先端科技、[2]大分大研究マネジメント機構、[3]九州先端研ナノテク、[4]兵庫県大院理）

Studies on the association character and structural analysis of tetrameric antibody light chain

(Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology[1], Institute for Research Management, Oita University[2], Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies[3], Graduate School of Science, University of Hyogo[4]) SAKAI, Takahiro[1]; FITRIANA, Wahyu[1]; MASHIMA, Tsuyoshi[1]; KOBAYASHI, Naoya[1]; YAMAGUCHI, Shohei[1]; HIFUMI, Emi[2]; UDA, Taizo[3]; OGATA, Hideaki[4]; HIROTA, Shun[1]

【序論】抗体の中には標的分子を分解する酵素活性を有する抗体酵素が存在する。また、抗体酵素には多量化により活性が向上するものがある。本研究では、酵素活性を有し多量化する抗体軽鎖#4 に着目し、重鎖とジスルフィド結合を形成する Cys 残基を Ala に置換した抗体軽鎖#4C214A を調製し、その会合挙動を調べた (Fig. 1)。さらに、#4C214A の定常領域を切除した抗体軽鎖可変領域#4V_L の X 線結晶構造解析により、抗体軽鎖の可変領域のドメインスワッピング構造を初めて明らかにした。



Figure 1. Schematic representation of equilibrium between monomeric and tetrameric forms of catalytic antibody light

【結果・考察】サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 及び SEC-多角度光散乱法（MALS）により、#4C214A は 4 量体を形成し、単量体と 4 量体の平衡状態であることが明らかとなった。平衡定数の温度依存性から、#4C214A が疎水性相互作用により 4 量化していることが示唆された。#4C214A 4 量体から単量体への解離において、解離速度の指標となる緩和時間は 0.5 時間 (45 °C) – 13.5 (4 °C) 時間と求まった。これらの緩和時間は一般的なタンパク質複合体の解離反応の緩和時間よりも著しく長かったことから、#4C214A 4 量体から単量体への変換は大きな構造変化を伴うと推測された。

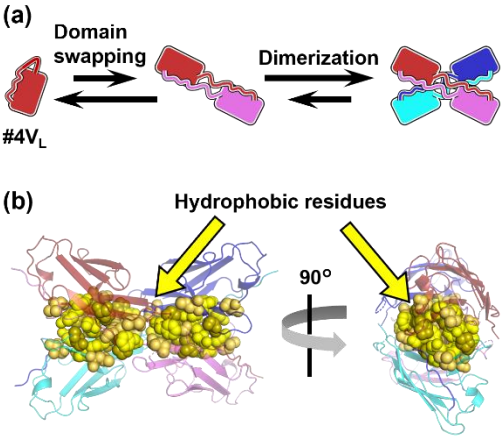


Figure 2. (a) Schematic diagram of #4V_L tetramerization. **(b)** #4V_L tetrameric structure and hydrophobic residues between #4V_L dimers.

#4C214A 4 量体構造の解明のため、X 結晶構造解析を試みたが、十分な分解能の回折像が得られなかった。そこで、ドメインスワッピングに関与していないと考えられる定常領域を切除し、結晶性の向上を目指した。#4C214A の可変領域と定常領域の間に TEV プロテアーゼ認識配列を導入した変異体を調製し、TEV プロテアーゼで切断することで、抗体軽鎖の可変領域#4V_L を単離した。SEC 及び SEC-MALS により、#4V_L も単量体と 4 量体の平衡状態であることが明らかになった。#4V_L の X 線結晶構造解析によりドメインスワッピングした立体構造が得られ、ドメインスワッピングした 2 量体はさらに 2 量化することで、#4V_L は 4 量体を形成していた (Fig. 2)。2 量体同士の相互作用界面には多くの疎水性残基が存在し (Fig. 2b)、4 量化に疎水性相互作用が大きく寄与することが結晶構造から確認された。

分子動力学シミュレーションによる細胞表層タンパク質 AtaA_Chead の力学応答解析

○笹原 純・橋本貴幸・藤本和士・吉本将悟・堀 克敏（名大院工）

Analysis of Mechanical Stability of a Cell Surface Protein AtaA_Chead by Molecular Dynamics Simulation

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) SASAHARA, Jun; HASHIMOTO, Takayuki; FUJIMOTO, Kazushi; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

微生物の細胞接着は、生存や増殖において重要な役割を担っており、その付着は細胞表層のアドヘシンを介して起こる。この際に、アドヘシンにはせん断応力や張力といった機械的負荷が生じるため、細胞接着の維持にはアドヘシン自体の強靭性が非常に重要である。*Acinetobacter* sp. Tol 5 は細胞表層に存在するアドヘシン AtaA を介して、生物表面のみならず、プラスチックやガラス、金属など様々な材料表面に対して高い付着性を示す [1]。AtaA は 250 nm の長さをもつ巨大なホモ三量体マルチドメインタンパク質である。AtaA ファイバーは Tol 5 の強固な細胞接着の維持を支えるテザー分子であり、容易に崩壊しない強靭性を有していると考えられてきた。AtaA を構成する多数のドメインのうち、C 末端に位置する AtaA_Chead は、先行研究によって結晶構造が明らかとなっており、headCap、HANS、Ylhead、HIM、Neck といった複数のドメインから構成されている [2] (Fig. 1)。しかしながら、異なるドメインが連結した AtaA がどのようにして、ファイバー全体の強靭性を発揮しているかは不明であった。本研究では AtaA_Chead の力学特性と、その分子機構の解明を目的に、全原子分子動力学計算を用いて AtaA_Chead の引っ張りに対する力学応答解析を行なった。

分子動力学計算用ソフトウェアである GROMACS を使用し、Steered Molecular Dynamics (SMD) 法により、AtaA_Chead (PDBID: 3WP8) の両端を一定の速度 (10 nm/ns) で伸長した際の Force-Extension Curve を算出した。まず初めに、三量体化を促進する目的で付加してある GCN4 タグのαヘリックスが引き伸ばされる過程で、headCap、HANS、Ylhead の順で各ドメインの構造が崩壊する様子が観察された。各構造が崩壊するのに必要な力は headCap-HANS 間が最も大きく、機械的安定性が高いことが示唆された。さらに、伸長に伴う力の伝達ネットワークを解析し AtaA_Chead 内部の力学伝播経路 [3]を可視化したところ、張力が引っ張り軸方向に伝達されるだけでなく、headCap を介して放射状に広がる様子が確認された。これより AtaA_Chead は、外力が作用した際にドメイン内及びドメイン間相互作用によって力学的負荷を分散することで構造の容易な崩壊を防いでいることが示唆された。

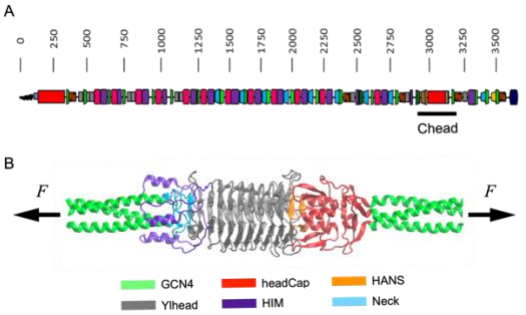


Fig. 1 (A) Schematic representation of AtaA and Chead domain. (B) Structure of AtaA_Chead.

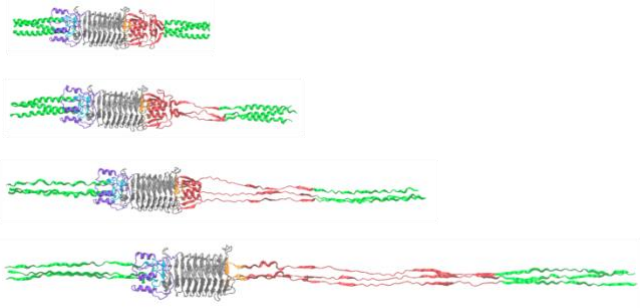


Fig. 2 Structural rupture snapshots of AtaA_Chead from steered molecular dynamics simulation.

1) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLoS One*, **7**, e48830 (2012)
2) K. Koiwai, M. D. Hartmann, D. Linke, A. N. Lupas, K. Hori, *J Biol Chem*, **291**, 3705-3724 (2016)
3) A. Sethi, J. Eargle, A. A. Black, Z. Luthey-Schulten, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 6620-6625 (2009)

人工細菌を志向した非対称なタンパク質組成を有する細菌サイズのリポソーム創出

○野場考策[1]・吉本将悟[1]・田中和義[2]・松浦友亮[3]・堀克敏[1]（[1]名大院工、[2]東北大院生命、[3]東工大 ELSI）

Creation of a bacterial-size liposome with the leaflets of asymmetric protein composition for artificial bacteria. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Department of Molecular and Chemical Life Sciences, Tohoku University[2] , Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology) NOBA, Kosaku[1]; YOSHIMOTO, Shogo[2]; TANAKA, Yoshikazu; MATSUURA, Tomoaki, HORI, Katsutoshi

人工細胞は、様々な化合物や生体システムを保持し、それによって細胞機能の一部を模倣した膜小胞である。これまで、人工細胞の作成には、直径 10 μm 以上の単一脂質膜からなる giant unilamellar vesicles が用いられてきた。このサイズの膜小胞は真核細胞を模倣できているが、極限環境を含む様々な環境や生体内、生体表面に遍在する細菌の細胞構造を再現できていない。細菌の細胞膜は、外葉と内葉で異なる脂質及びタンパク質組成を維持している。この非対称性は、シグナル伝達、タンパク質輸送、細胞の形状決定など、生体内の様々な生化学反応に不可欠である。このような非対称性の細胞膜環境を忠実に模倣したモデル系が必要であるが、タンパク質の非対称性を模倣した細菌人工細胞は限られている。これは、従来のリポソーム作製技術に起因している。

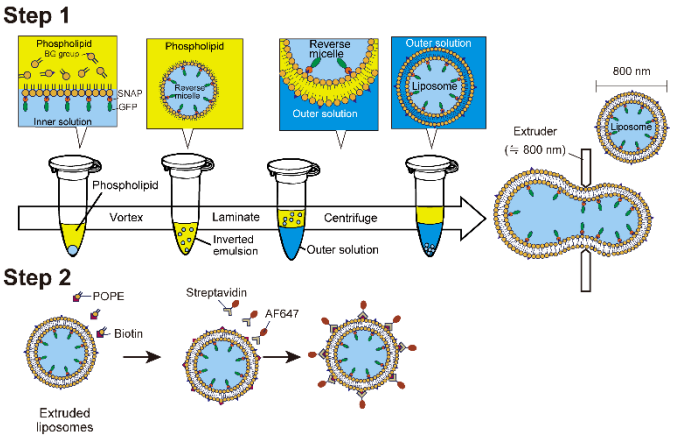


Fig. 1 本研究におけるリポソーム作成方法の概要

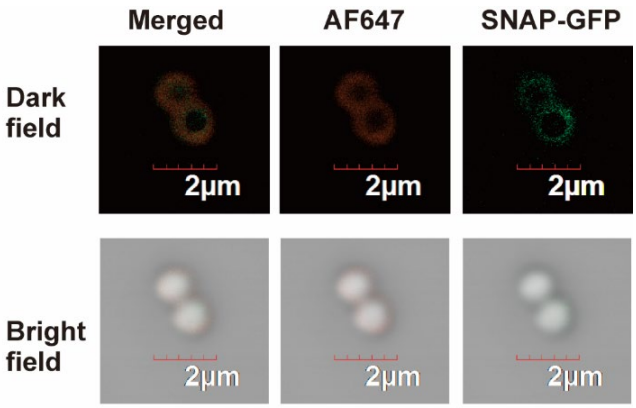


Fig. 2 創出したリポソームの CLSM 観察結果

本研究では、脂質二重層の内側と外側で異なるタンパク質を局在化した、細菌サイズの非対称リポソームの作成を目指した。目的を達成するために、従来のリポソーム作成法で汎用されている界面通過法とエクストルーダー法を組み合わせた。これらの方法を用いてベンジルグアニン誘導体を含むリン脂質を含むリポソームを調製し、SNAP-tag で融合した GFP を内葉に局在化させた。その後、ビオチン化脂質を外部に挿入し、Alexa Fluor 647 (AF647)が連結したストレプトアビジンタンパク質で修飾した（Fig. 1）。得られたリポソームは、ネイティブな細菌と同様のサイズ分布を有していることが動的光散乱法から明らかとなった。さらに、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) によって膜表面を観察することで、異なるタンパク質が連結した単一膜のリポソームが作成されていることが明らかとなった (Fig. 2)。また、調製したリポソームを Proteinase K で処理した後、フローサイトメトリーによって SNAP-GFP と AF647 の蛍光を評価した。その結果、リポソームの内側と外側に異なるタンパク質が結合していることが示された。このリポソーム作製法は、細菌の膜構造をボトムアップで再現する人工細菌の創製に貢献すると期待される。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

小分子応答型人工タンパク質クラスタリングシステムの創製

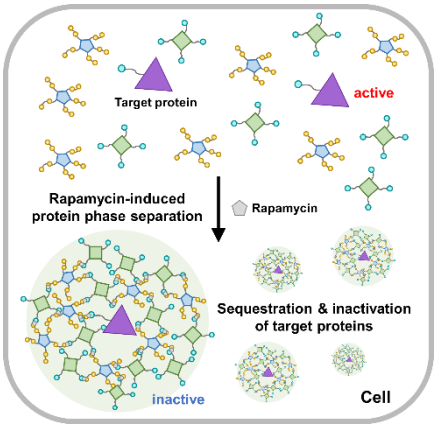
○深谷陽子[1]・吉川優[1]・鈴木祥央[1]・築地真也[1]（[1]名工大院工）

Development of small molecule-responsive synthetic protein clustering systems (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology[1]) FUKAYA, Yoko[1]; YOSHIKAWA, Masaru[1]; SUZUKI, Sachio[1]; TSUKIJI, Shinya[1]

細胞内では、異なる機能を持つさまざまなタンパク質が互いに相互作用・連携することで情報伝達を行っている。細胞内情報伝達システムは複雑でありながら精密に制御されており、情報伝達に関与するシグナルタンパク質に異常が生じると、種々の疾患の原因となる。そのため、シグナルタンパク質の活性を操作する技術は、細胞生理機能や疾患の理解・制御のための重要な基盤ツールを提供するものと期待される。近年、細胞内タンパク質の活性を操作するためのアプローチとして、遺伝子工学的な改変を加えたタンパク質を細胞内に発現させ、そのタンパク質の活性や局在を特定の小分子化合物によって制御する化学遺伝学（chemogenetics）が注目されている。例えば、標的タンパク質を小分子化合物で不活性化するシステムとして、HaloPROTACS が報告されている。このシステムでは、HaloTag によってタグ付けされた任意のタンパク質を小分子二量化剤の添加によってユビキチン化し、分解経路に導くことができる。HaloPROTACS システムは、さまざまなタンパク質を分解・不活性化できる高い汎用性を持つ一方、標的タンパク質の細胞内分解には十数時間以上の時間がかかる。そのため、タンパク質の素早い不活性化には適していない。そこで当研究室では、標的タンパク質を迅速に不活性化することのできる汎用的な新規化学遺伝学技術の開発に取り組んでいる。

最近になり我々は、細胞内で自己集合して相分離する機能性人工タンパク質を設計した。そしてこれと化学誘導二量化（chemically induced dimerization）法を組みわせることで、標的タンパク質をコンディショナルに取り込むことのできる人工非膜オルガネラを構築することに成功した[1,2]。このシステムでは、小分子ラパマイシンを添加することで任意の標的タンパク質を人工非膜オルガネラ内に隔離することができ、それにより標的タンパク質の不活性化を誘導することが可能であった。しかし、この人工非膜オルガネラは流動性が低く、標的タンパク質を内部まで隔離することが難しかった。そのため、活性を十分に隔離・阻害できるタンパク質に制限があるという問題があった。

そこで本研究では、上記の問題点を克服する新たなシステムとして、右図のような小分子応答型人工タンパク質クラスタリングシステムを考案した。このシステムは、以前のシステムとは異なり、初期状態では特に相分離構造体を形成しておらず、小分子を添加することで人工非膜オルガネラの形成（タンパク質クラスタリング）と標的タンパク質の取り込みを同時に誘導することができる。このようなシステムであれば、標的タンパク質を人工オルガネラ内部に高効率に隔離できると考えた。さまざまなコンストラクトを検討した結果、ラパマイシン添加に応答して素早く相分離し、さらに FRB でタグ付けされた標的タンパク質をその内部に効率良く取り込むことのできる人工タンパク質クラスタリングシステムを開発することに成功した。本発表では、本システムの設計とその展開について報告する。



図：本システムの概念図

1) M. Yoshikawa, T. Yoshii, M. Ikuta, S. Tsukiji, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 6434–6446.
2) M. Yoshikawa, S. Tsukiji, *Biochemistry*, **2021**, 60, 3273–3276.

リガンド指向性化学を用いた細胞内及び細胞外 AMPA 型グルタミン酸受容体の選択的可視化と動態解析

○杉原佑太朗[1]・小島憲人[1,2]・浜地格[2,3]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]京大院工、[3]JST ERATO）

Trafficking studies of intracellular and cell surface AMAP-type glutamate receptors using ligand-directed chemistry. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2], ERATO JST[3]) SUGIHARA, Yutaro[1]; OJIMA, Kento[1,2]; HAMACHI, Itaru[2,3]; KIYONAKA, Shigeki[1]

神経細胞間の情報伝達は、プレシナプスから放出された神経伝達物質をポストシナプスに存在する受容体が認識することで達成される。中枢神経系において、イオンチャネル型グルタミン酸受容体は速い興奮性の神経伝達を担い、中でも AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPAR) はポストシナプス膜上に発現し、興奮性神経伝達において重要な役割を果たす。神経細胞内において、AMPAR の発現量や動態は厳密に制御されており、その動態変化は記憶・学習や種々の神経疾患と密接に関係している。そのため記憶や疾患の分子メカニズムの解明に向けて、AMPAR の動態解析を目的とした可視化法の開発が活発に進められている。我々はこれまでに、リガンド指向性化学と生体直交反応を組み合わせたリガンド指向性 2 段階ラベル化法 [1]を開発し、神経細胞に内在する細胞表層 AMPAR の動態解析に成功していた。一方で、Trans-cyclooctene (TCO)と Tetrazine (Tz)の生体直交反応は非常に迅速かつ高選択的であるものの、夾雑環境下である細胞内の AMPAR を選択的に可視化することは困難であった。

本研究では、内在化した細胞内 AMPAR の動態解析を目的に、リガンド指向性 2 段階ラベル化法の細胞内適用に着手した。細胞内ラベルでは、2 段階目の反応で用いる tetrazine (Tz)の反応性の高さや色素の特徴が原因となり、バックグラウンド蛍光が高いことが問題であった。しかし、ある小分子化合物を用いたブロッキングを行うことでバックグラウンド蛍光が大幅に抑制され、細胞内 AMPAR の選択的なラベル化が可能となった。実際に、神経細胞においても細胞外および細胞内（内在化）した AMPAR を区別してラベル化することに成功した。また、本手法で細胞内・外 AMPAR をそれぞれ標識することにより、chemical LTP 刺激に対する AMPAR の動態変化観察に成功しており、今後 AMPAR 動態の詳細な解析において有用なツールになると期待される。

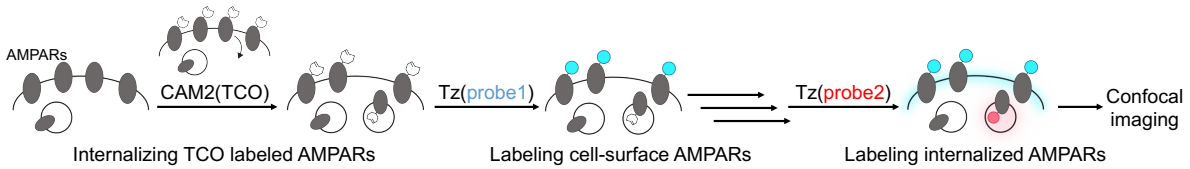


Fig. Schematic illustration of chemical labeling of intracellular and cell surface AMPARs by ligand-directed two-step labeling.

1) K. Ojima, et al., Ligand-directed two-step labeling to quantify neuronal glutamate receptor trafficking. Nat. Commun. 2021, 12, 831.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

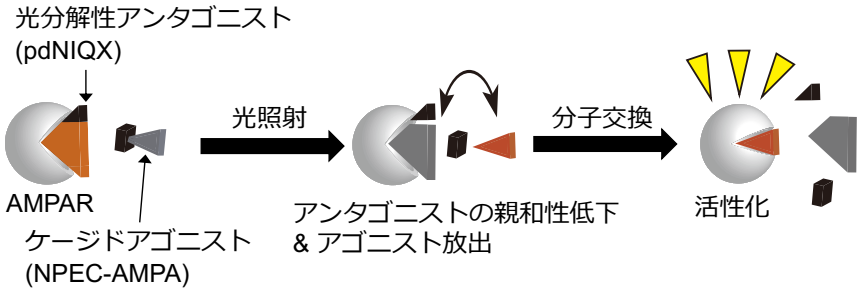
部位選択的な AMPA 型グルタミン酸受容体の活性制御を指向した新たな光制御システムの開発

○曽我恭平[1]・古田寿昭[2]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]東邦大理）

New caged compounds for site-specific activation of AMPA-type glutamate receptors (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Department of Biomolecular Science, Toho University[2]) SOGA, Kyohei[1]; FURUTA, Toshiaki[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

我々の脳内では神経細胞どうしが複雑な回路を形成することで高次脳機能を発現する。ポストシナプスに存在するグルタミン酸受容体は神経細胞間で興奮性の情報伝達を担う神経伝達物質受容体である。特に AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPAR)は記憶・学習に関与する。AMPAR の活性化は、記憶・学習の分子基盤である長期増強(LTP)に重要であることが知られており、AMPAR の活性制御は神経科学の分野において必須の技術である。その 1 つとして、ケージドグルタミン酸を用いた方法が挙げられる。ケージドグルタミン酸は、グルタミン酸の受容体との結合に重要な官能基を光分解性の保護基でマスクした化合物であり、光照射部位選択的にグルタミン酸を放出できる。ケージドグルタミン酸によって、シングルスパインレベルで AMPAR を活性化できることが報告されている[1)]。しかし、ケージド化合物の問題点として、活性種の拡散が挙げられる。中枢神経系においてスパインは数 μm 以内に複数存在しているため、ある 1 つのスパインを狙って光を照射してもそこからグルタミン酸が拡散し、隣のスパインに影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで本研究では、シングルスパインレベルで AMPAR を活性化することを指向して、光分解性化合物を用いた新たな光制御システムの開発を行った。AMPAR のアンタゴニストをベースとし、光照射前はアンタゴニストとして機能し、光照射により親和性が低下する光分解性アンタゴニスト pdNIQX(photo-decomposable *o*-nitrobenzyl quinoxaline dione)を設計・合成した。pdNIQX と同時にケージドアゴニストである NPEC-AMPA を加えておくと光照射部位においてアンタゴニストによる阻害が解除され、AMPA と入れ替わり、選択的に AMPAR を活性化できると考えた。実際に、HEK293T 細胞に発現させた AMPAR を光照射部位選択的に活性化することに成功した。本手法により、シングルスパインレベルで AMPAR の機能解析が可能になると期待される。



1) Matsuzaki, M. et al. *Nature* **429**, 761–766 (2004).

原子間力顕微鏡を用いた AtaA の C 末端パッセンジャードメインの 1 分子強靭性解析

○加藤周・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Single-molecule toughness analysis of the C-terminal passenger domain of AtaA using AFM (Graduate School of Engineering, Nagoya University) KATO, Amane; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

Acinetobacter sp. Tol 5 は細胞表層のタンパク質 AtaA を介して様々な物質表面に対して接着する [1]。AtaA は 3630 アミノ酸残基のポリペプチド鎖がホモ三量体を形成した長さ約 250 nm のファイバー状タンパク質で、数十のドメインが反復した構造を持つ (Fig. 1A)。その中でも、AtaA の C-terminal passenger domain (CPSD) はポリペプチド鎖が互いに絡み合った複雑な構造を形成することが X 線結晶構造解析により明らかになっており、AtaA ファイバーの強靭性や柔軟性に関わることが示唆されている [2]。しかしながら、CPSD に力が加わった際に実際にどのような力学応答を示すかは不明である。そこで本研究では、CPSD の強靭性解析を目的として、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた 1 分子測定を行った。

まず、N 末端に金基板への固定に用いるシステイン (Cys) を、C 末端に AFM プローブへの架橋に用いる SpyTag [3] を導入した Cys-CPSD-SpyTag を設計し、大腸菌で生産、精製した (Fig. 1A)。Cys-CPSD-SpyTag を SpyCatcher と混合し SDS-PAGE に供したところ、SpyTag-SpyCatcher 間での共有結合に伴う電気移動度の減少が検出された。よって、Cys-CPSD-SpyTag は SpyCatcher との結合能を維持していることが確認できた。

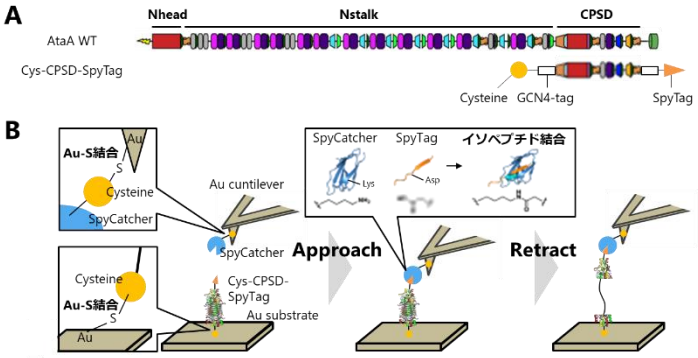


Fig. 1. (A) Schematic representation of AtaA and Cys-CPSD-SpyTag. (B) The measurement procedure for the mechanical property of Cys-CPSD-SpyTag using AFM.

続いて、Cys-CPSD-SpyTag を Au-S 結合を介して金基板に固定、SpyTag-SpyCatcher 結合を介して AFM プローブに架橋し、ファイバーの伸展に伴うフォースディスタンス (FD) カーブの取得を試みた (Fig. 1B)。その結果、Cys-CPSD-SpyTag 単分子を伸展したと考えられる FD カーブを複数取得することに成功し、約 850 pN の力が加わるまで壊れない部位が存在することが明らかになった。これは筋肉を構成するタイチンや細菌付着性ファイバータンパク質であるインチミンなど他のタンパク質と比較しても突出した強度であり、AtaA の CPSD には非常に強靭性の高い部位が存在することを示している。

1. M. Ishikawa *et al.*, PLOS ONE, 7, e48830 (2012)
2. K. Koiwai *et al.*, J. Biol. Chem., 291(8), 3705-3724 (2016)
3. B. Zakeri *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109(12), E690-E697 (2012)

抗体抗原間の相互作用により加速されるひずみ解消型 Click 反応

○西山健太郎[1]、秋葉宏樹[1,2]、永田諭志[2]、津本浩平[2]、鎌田春彦[1,2]、大野浩章[1,2]
（[1]京大院薬、[2]医薬健栄研）

Acceleration of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition induced by antibody-antigen interaction

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University[1], National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition[2]) Nishiyama, Kentaro[1]; Akiba, Hiroki[1,2]; Nagata, Satoshi[2]; Tsumoto, Kouhei[2]; Kamada, Haruhiko[1,2]; Ohno, Hiroaki[1,2]

2 分子間の化学反応速度は 2 つの物質の濃度に依存するため、低濃度では必然的に速度が低下する。一方で、例えば DNA-templated organic synthesis[1] として知られている手法 (Fig. 1a) では、反応させたい低分子化合物を DNA に連結することで、DNA の 2 本鎖形成を通じて化学反応点同士が接近し、通常の化学反応よりもはるかに低い絶対濃度で、反応を速く進行させることができる。このように、生体高分子同士の強力な相互作用に由来する近接効果を利用して化学反応を加速させる方法は、生体内のような夾雑系で迅速かつ特異的に化学反応を進行させる手段として有効であると考えられる。

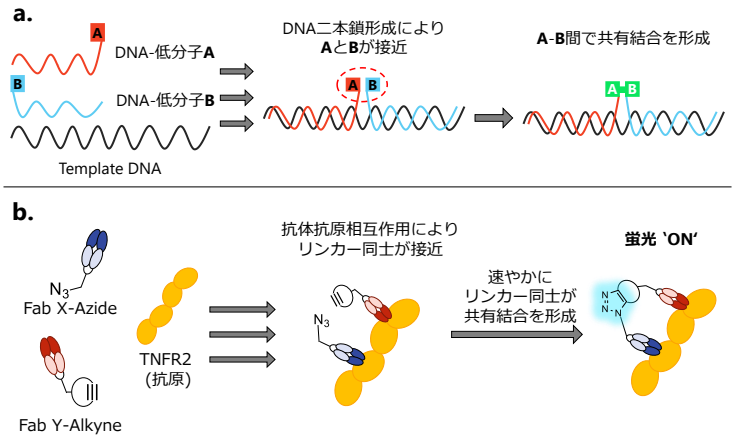


Fig. 1 (a) 近接効果による反応の加速の例 (DNA-templated organic synthesis) **(b)** 抗体抗原相互作用による反応の加速

抗体抗原相互作用は高い親和性と特異性を示すが、この相互作用を利用して、抗体にコンジュゲートした 2 つの低分子化合物間の反応の加速を試みた例は報告されていない。我々は、同一抗原の異なるエピトープに結合する 2 種類の抗体を利用することで、同様の近接効果により反応速度を上昇させられると考えた (Fig. 1b) 。抗体は容易に膜蛋白質を標的とできるため、生体内で抗原特異的に所望の化合物を合成するといった応用が視野に入る。さらに、抗体フラグメントを抗原特異的に二量体化できるため、抗体の低分子化と二価結合による高い結合能を両立できるようになる。

本研究ではモデルとして、TNFR2 抗原の異なるエピトープと相互作用する 2 種類の抗体の Fab (Fragment antigen binding) に、生体直交型反応性のリンカーをコンジュゲートして用いた。用いた 2 種類の Fab は、TNFR2 と隣接して相互作用することでリンカー同士が近接するような設計とした。また、リンカー同士の反応の進行を蛍光強度の増大によって評価するために、7-amino-3-azidocoumarin と bicyclononyne の間の click 反応により蛍光‘ON’となる設計とした (Fig. 1b)。

2 種類の Fab とリンカーのコンジュゲート体、および TNFR2 を 2 μM で混合し、サイズ排除クロマトグラフィーで分離し、蛍光強度を検出した。すると、経時的に蛍光強度が増大し、反応が進行していることを確認できた。また、TNFR2 非存在下では反応速度が著しく低下し、抗体抗原相互作用が click 反応の加速に重要であることが明らかとなった。さらに、TNFR2 と相互作用してもリンカー同士が接近しないと考えられる Fab の組み合わせを用いた場合は、click 反応の加速がみられなかった。以上より、抗体相互作用の際にリンカーが近接するような Fab の組み合わせを選択することで、化学反応の加速が実現可能であることが明らかとなった。

[1] Li., X. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 4848-4870.

分子クラウディング環境下における架橋酵素の触媒挙動の理解

○佐藤 崚[1]・南畑 孝介[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）

Understanding the catalytic behavior of cross-linking enzyme under crowded condition

(Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University[2])
Sato, Ryo[1]; Minamihata, Kosuke[1]; Wakabayashi, Rie[1]; Goto, Masahiro[1,2]; Kamiya, Noriho[1,2]

【緒言】

タンパク質の機能評価は、通常、希薄な水溶液中で実施される。しかし、生体内でタンパク質が機能を発揮する環境は、高濃度の生体高分子やオルガネラが存在する分子クラウディングの状態にある。当該環境では酵素の触媒挙動が変化することが知られ、これまでにクラウディング剤や酵素の分子量が小分子基質に対する触媒挙動に与える影響が報告されている[1]。しかし、基質の分子量が触媒挙動に与える影響を系統的に調べた例は見当たらない。そこで、本研究では異種ペプチド間を架橋する微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) に注目した。MTG はグルタミン (Q) 及びリジン (K) 残基または一級アミン間におけるイソペプチド結合形成反応を触媒する。本研究では、Dextran によって調製されたクラウディング環境中で、分子量の異なる一連の基質を MTG によって架橋し、その触媒挙動の理解を目指した (Fig. 1a, b)。

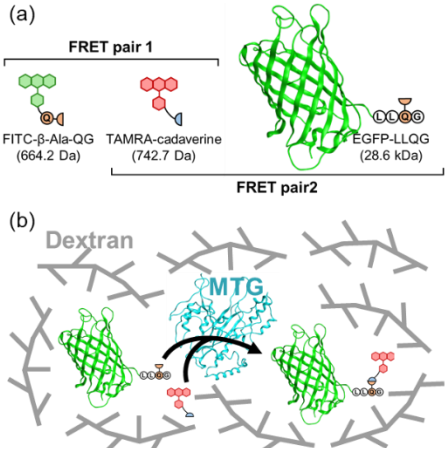


Fig. 1 (a) 本研究で用いた MTG 基質
(b) Dextran 溶液中での MTG 反応

【実験及び結果と考察】

MTG 反応性を有する蛍光色素 FITC-β-Ala-QG (FITC-Q), TAMRA-cadaverine (TAMRA-NH_2) 及び蛍光タンパク質 EGFP-LLQG (EGFP-Q) を、PBS 及び平均分子量の異なる Dextran (60, 500 kDa) を 15 wt%含む PBS 中で架橋した。各溶液中で生じた架橋産物の生成速度を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) により経時的に追跡したところ、Dextran 溶液中での FITC-Q と TAMRA-NH_2 の架橋速度は、PBS 中の 3 分の 1 程度に低下した (Fig. 2a)。これに対して、EGFP-Q と TAMRA-NH_2 間の架橋速度は、Dextran 溶液中と PBS 中ではほぼ同等であった (Fig. 2b)。MTG 架橋反応は、Q 基質との MTG-Q 複合体の形成後、一級アミン基質の求核攻撃により完了する [2]。Dextran 溶液は PBS よりも粘度が高いにも関わらず、架橋反応が同等の速度で進行したのは、Dextran の排除体積効果により MTG-Q 複合体の形成が加速したためと考えられる。本発表では、タンパク質基質同士の架橋挙動についても併せて報告する。

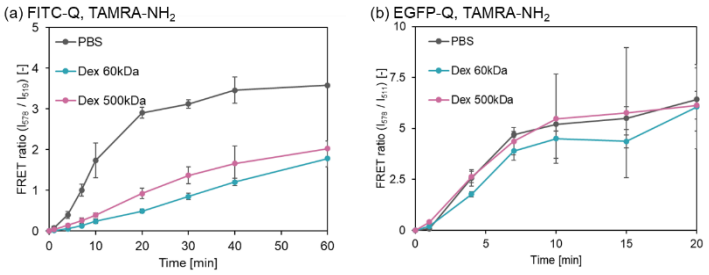


Fig. 2 クラウディング環境下での MTG による (a) FITC-Q, TAMRA-NH_2, (b) EGFP-Q, TAMRA-NH_2 の架橋挙動

【参考文献】

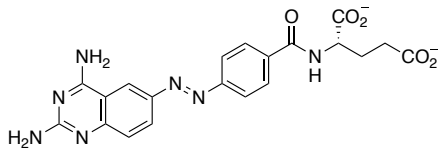
[1] I. Pastor *et al.*, *Biophys Chem.*, **185**, 8 (2014). [2] T. Kashiwagi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 44252 (2002).

光可逆的かつ定量的なタンパク質ラベル化を可能とするフォトクロミックリガンドの開発

○浜口聡志[1]・小和田俊行[1,2,3]・間下貴斗[2]・Himadri S. SARKAR[3]・松井敏高[1,2,3]・水上 進[1,2,3]（[1]東北大院生命、[2]東北大院理、[3]東北大多元研）

Development of photochromic ligands for quantitative and photo-reversible protein labeling. (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University[1], Graduate School of Science, Tohoku University[2], Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University[3]) HAMAGUCHI, Satoshi[1]; KOWADA, Toshiyuki[1,2,3]; MASHITA, Takato[2]; SARKAR, Himadri S.[3]; MATSUI Toshitaka[1,2,3]; MIZUKAMI Shin[1,2,3]

細胞内タンパク質の機能は、生体分子との相互作用や局在などによって精密に調節されている。タンパク質機能の異常は様々な疾患の原因となることから、そのような疾患における細胞内タンパク質間相互作用や局在を調べることは治療法確立のために重要である。これまで、可視化や二量化を通したタンパク質機能解析のために、タグタンパク質を特定の有機小分子によってラベル化する技術が広く用いられてきた。この技術は、蛍光タンパク質による蛍光標識に比べて、ラベルするリガンドの機能や物性の調節が容易であるという利点がある。一方で、リガンドの添加によってラベル化を行うことから、細胞局所におけるラベル化の時空間的制御は困難であった。近年、光反応性の保護基によりリガンドの活性部位を保護したケージド化合物を利用することで、細胞局所への光照射によるラベル化の時空間的制御が達成されている。しかし、ケージド化合物によるラベル化の時空間的制御はケージド基の光解離反応に基づいているため、可逆的なタンパク質のラベル化に課題を残している。この課題に取り組むため、我々は最近、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素（eDHFR）の阻害剤であるメトトレキセート（MTX）にアゾベンゼン構造を導入したフォトクロミックリガンド（**azoMTX**）を開発した（**Figure 1**）[1]。**azoMTX** は紫外光照射により生じる *Z* 体と可視光照射により生じる *E* 体の間で eDHFR に対する親和性に大きく差があるため、光異性化を利用して eDHFR との結合を可逆的に制御可能であった。一方、さらに取り組むべき課題の一つが、光照射下における異性体比である。紫外光照射下における *Z* 体の割合は最大で 75%であり、可視光照射下における *E* 体の割合は最大 92%に留まる(**Table 1**)。特に、可視光照射によって親和性の高い *Z* 体が残るため、eDHFR への結合・解離を完全に制御することは困難である。さらに、*Z* 体の熱半減期は室温で 5.5 時間と短く、時間経過とともに *Z* 体から *E* 体への熱異性化が起こり、複合体が解離する可能性がある。



azoMTX

Figure 1. Structure of **azoMTX**.

本研究では、定量的に近い光異性化特性、およびアゾベンゼン構造と比べてより高い熱安定性を示すことが報告されているフェニルアゾピラゾール構造[2]を分子内に導入した **azoPyQM** を開発した。**azoPyQM** は紫外光照射時の *Z* 体比率が最大 92%、可視光照射時の *E* 体比率が最大 98%となり、ほぼ定量的な光異性化特性を示した。また、*Z* 体の熱半減期は室温で 3.4 日と長く、長時間の生細胞イメージングへの適用が期待される。本発表では、**azoPyQM** の部分構造を有するタンパク質二量化剤の開発と生細胞イメージングの結果についても報告する。

Table 1. Comparison of **azoMTX** and **azoPyQM**.

Name	Percentages of mein isomer (%) *Z* (PSS394)	*E* (PSS560)	$t_{1/2}$ (at 25 °C)
azoMTX	75	92	5.5 h
azoPyQM	92	98	3.4 d

1) Mashita, T.; Kowada, T.; Takahashi, H.; Matsui, T.; Mizukami, S. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1382–1386.
2) Weston, C, E.; Richardson, R, D.; Haycock, P, R.; White, A, J, P.; Fuchter, M, J. *J. Am. Chem. Soc*. **2014**, *136*, 11878–11881.

循環置換とαヘリックス挿入を用いた３ユニット環状ヘムタンパク質の構築と構造解析

○藤原綱大[1]・大西遥喜[1]・真島剛史[1]・小林直也[1]・山中優[1]・米澤健人[1]・上久保裕生[1]・内橋貴之[2]・廣田俊[1]（[1]奈良先端大先端科技・[2]名大院理）

Construction and structural analysis of a three-unit cyclic heme protein with circular permutation and linker insertion (Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology[1], Graduate School of Science, Nagoya University[2]) FUJIWARA, Kodai[1]; ONISHI, Haruki[1]; MASHIMA, Tsuyoshi[1]; KOBAYASHI, Naoya[1]; YAMANAKA, Masaru[1]; YONEZAWA, Kento[1]; KAMIKUBO, Hironari[1]; UCHIHASHI, Takayuki[2]; HIROTA, Shun[1]

天然には、秩序的に集合化した超分子構造をとることで機能を発揮するタンパク質が存在する。その機能発現機構を人工的に模倣し応用するために、自在にタンパク質超分子構造を構築する手法が求められている。本研究室ではこれまでに、超好熱菌由来シトクローム c_{555} のドメインスワッピング 2 量体構造を基に、循環置換と α ヘリックスリンカー挿入を施した人工タンパク質 CPC (Circular Permutated Cyt c_{555})を作製した(Figure 1a)[1]。CPC はエタノール処理により主に環状 3 量体を形成し、4 面体構造のナノ構造体を構築したが、環状構造ではない単量体や 2 量体も同時に形成した。そこで本研究では、CPC 3 量体と同様の環状構造を安定化させ、高選択的に得るため、CPC 3 分子を融合したタンパク質(CPC_3)を作製した(Figure 1b)。

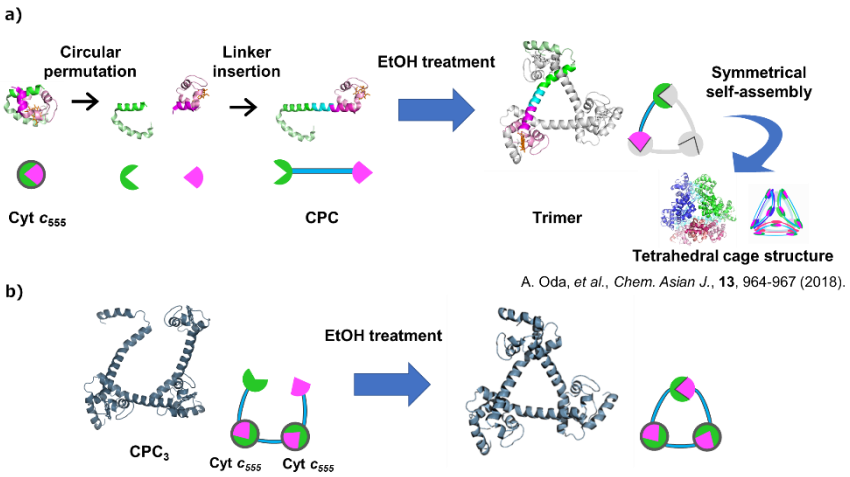


Figure 1. Design and construction of a) CPC trimer and b) cyclic CPC_3.

CPC_3 を組み換え大腸菌を用いて発現し、精製したところ、様々な構造の CPC_3 が得られた。CPC_3 を単一の構造にするため、エタノール(終濃度 60% (v/v))を添加することで CPC_3 を変性させた後、透析によりエタノールを取り除き、CPC_3 を安定構造へリフォールディングさせた。このエタノール処理により、CPC_3 のサイズ排除クロマトグラフィーの溶出時間は遅くなり、陽イオン交換クロマトグラフィーにおける CPC_3 の溶出ピークはシャープになった。これらの結果から、大腸菌から得られた CPC_3 は、エタノール処理により単一のコンパクトな構造へ変化することが示唆された。さらに、SAXS と AFM 測定により、エタノール処理前後の CPC_3 が 3 つのユニットで構成されていることを確認した。また、CPC_3 は大腸菌から得られた状態では N 末端と C 末端が開いた鎖状構造をとり、エタノール処理により N 末端と C 末端が閉じた環状構造へ変化することが示唆された(Figure 2)。

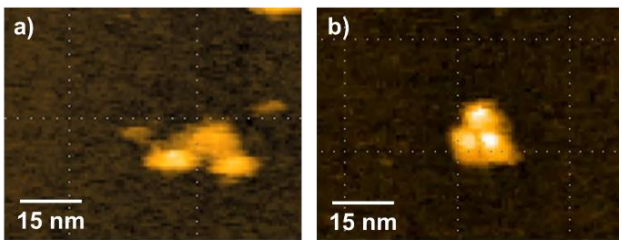


Figure 2. AFM images of CPC_3 monomer a) before and b) after ethanol treatment.

[参考文献]
[1] A. Oda, *et al.*, *Chem. Asian J.*, **13**, 964-967 (2018).

Poster Session

Mon. Sep 12, 2022 2:10 PM - 3:10 PM JST | Mon. Sep 12, 2022 5:10 AM - 6:10 AM UTC | Online Site A Online Streaming

Poster Session (P34-P66)

[P34] NMR analysis of transient unfolding/refolding protein structures by encapsulation in a self-assembled cage

*Anouk Rossen[1], Takahiro Nakama[1], Maho Yagi-Utsumi[2], Daishi Fujita[3], Koichi Kato[2], Makoto Fujita[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Molecular Science (IMS), 3. Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University)

[P35] Development of novel fluorescent biosensors for visualizing plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate

*Moeka Ajiki[1], Masaru Yoshikawa[1], Fubito Nakatsu[2], Shinya Tsukiji[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 2. Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University)

[P36] Construction of Pd(II)-containing Artificial Metalloenzymes Using Scaffolds of Steroid Metabolizing Enzymes and their Application to Intramolecular Hydroarylation

*Haruka Nishiwaki[1], Shunsuke Kato[1], Takashi Hayashi[1] (1. Osaka University)

[P37] Preparation of Hydrogel Containing a Protein Unit Modified by Two Different Fluorophores

*Hiroki Innami[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P38] Development of Artificial Antibody for Antibody-anchored Natural Killer Cell Therapy

*Chihiro Tanaka[1], Tomoshige Fujino[1], Yui Harada[2,3], Yoshikazu Yonemitsu[2,3], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Pharmaceutical Sciences Kyushu University, 3. R&D Laboratory for Innovative Biotherapeutics Science, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P39] Chemogenetic activation of adenosine A_{2A} receptors focusing on structural information.

*Midori Makino[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P40] Exploration of orthogonal activation of mGlu1 using Pd complexes having different ligands.

*Suzuka Kurakake[1], Yuta Miura[1], Akinobu Senoo[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P41] Selective Recognition of Unprotected Peptides by the Closed Cavity of a Polyaromatic Capsule

*Mayu Shuto[1] (1. Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech)

[P42] A Photoswitchable fluorescent Probe Using a Photochromic Quencher with High Photostability Assisted by Protein-Surface Modification

*Kenji Torii[1], Yuichiro Hori[2], Kazuya Kikuchi[1,3] (1. Graduate School of Engeering, Osaka University, 2. Faculty of Sciences, Kyushu University, 3. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[P43] Induction of protein–sugar weak interactions by co-encapsulation within a self-assembled spherical cage

*Miri Tadokoro[1], Takahiro Nakama[1], Makoto Fujita[1,2] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Molecular Science)

[P44] Self-assembly of Imidazolyl Zinc Porphyrins in Lipid Bilayer Membrane

*Yuto Iura[1] (1. Graduate School of Science, Tokyo University of Science)

[P45] Characterization and Reactivity Studies on a Series of Rare Cu(II)-halide Complexes Having Distorted Tetrahedral Geometries as Model Complexes of Type 1 Copper Centers

*Lan Yang[1], Yuma Morimoto[1], Hideki Sugimoto[1], Shinobu Itoh[1] (1. Osaka University)

[P46] Construction of artificial hemoprotein multimers based on metal coordination to recognize biomolecules

*Hiroaki Inaba[1], Yuma Shisaka[1], Garyo Ueda[1], Erika Sakakibara[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Hiroshi Sugimoto[2], Osami Shoji[1] (1. Graduate school of Science, Nagoya University, 2. RIKEN SPring-8)

[P47] Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing photoinduced elimination of axial ligand of metallophthalocyanines

*Kohei Nogita[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P48] Energy-independent lipid-membrane permeation of co-assemblies formed through complementary interaction

*Hiroki Obayashi[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1,2], Masahiro Goto[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P49] Analysis of *O*-glycan type oligosaccharides in prostate cancer cells under hypoxia and elucidation of their functions in cell migration using saccharide primer method

*Daiki Yamamoto[1], Takeo Kosaka[2], Mototsugu Oya[2], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University, 2. Keio University School of Medicine)

[P50] NMR analysis using H/D isotope shifts to explore the hydration behavior of carbohydrates

*Hiroaki Tatsuoka[1], Takumi Yamaguchi[1,2] (1. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University)

[P51] Profiling of glycans in animal cells by the saccharide primer method and correlation analysis with influenza virus susceptibility

*Mayu Okuda[1], Kazuma Ohgata[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P52] Organelle-selective phosphatidylinositol labeling

*Takami Kimura[1], Tomonori Tamura[1,2], Itaru Hamachi[1,2] (1. Kyoto University, Graduate school of Engineering and Faculty of Engineering, 2. JST ERATO)

[P53] Exploration of drug-resistant factors in gastric circulating tumor cells by single-cell transcriptome analysis

*Yoshiko Kano[1], Mayuko Horikawa[1], Fumiaki Koizumi[2], Tatsu Shimoyama[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital)

[P54] Heterogeneous expression of unique genes in magnetotactic bacteria toward morphological control of magnetic nanoparticles

*Chihiro Miura[1], Nanami Shinohara[1], Tadashi Matsunaga[1,2], Atsushi Arakaki[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology)

[P55] Whole-Cell Biocatalysts Harboring P450 Enzymes Triggered by Decoy Molecules for Microbial Degradation of Environmental Pollutants

*Fumiya Ito[1], Shinya Ariyasu[1], Masayuki Karasawa[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P56] Development of perfluorocarbon-encapslated elastic nanoparticles for ^{19}F MRI contrast agents

*Yuki Konishi[1], Fuminori Sugihara[2,3], Masafumi Minoshima[1], Kazuya Kikuchi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ., 3. Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

[P57] Creation of transdermal malaria vaccine and analysis of immune response

*Keisuke Tanaka[1], Kosuke Minamihata[2], Rie Wakabayashi[2], Noriho Kamiya[2,4], Masahiro Goto[2,3,4] (1. Kyushu University Graduate School of Engineering, 2. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 3. Next Generation Transdermal Absorption Center, 4. Center for Future Chemistry and Innovation)

[P58] Development of novel ionic liquid nanoparticle formulations and transdermal delivery of nucleic acid drugs

*Kiyohiro Toyofuku[1], Rie Wakabayashi[1], Noriho Kamiya[1], Masahiro Goto[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University)

[P59] Preparation of the fusion protein of VHH antibody and amphiphilic OLE-ZIP and evaluation of its capsule formation property

*Kousuke Takahashi[1], Taiki Nishiyama, Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P60] Creation of an enveloped artificial viral capsid through hydrophobic interaction

*Miu Hirahara[1], Kentarou Sakamoto[1], Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University)

[P61] Development of RaPID system-based library vs. library selection

*Yuto Ohno[1], Alexander Vinogradov[1], Hiroaki Suga[1] (1. School of Science, The University of Tokyo)

[P62] Optical control of microtubule stabilization by spiropyran-modified Tau-derived peptides

*Minamo Sakaguchi[1], Hiroshi Inaba[1], Arif Md. Rashedul Kabir[2], Akira Kakugo[2], Kazuki Sada[2], Kazunori Matuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Science, Hokkaido University)

[P63] Molecular transport from viral replica embedded with gap junction-forming membrane proteins into liposomes and cells

*Hiroto Furukawa[1], Hiroshi Inaba[1], Yoshihiro Sasaki[2], Kazunari Akiyoshi[2], Kazunori Matsuura[1] (1. Graduate School of Engineering, Tottori University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P64] Direction-Switchable One-Pot Peptide Ligation for Chemical Protein Synthesis

*Koki Nakatsu[1], Akimitsu Okamoto[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University)

[P65] Selection of GM1-mimic Peptides by Phage-display Technology Using Acoustic Levitation

*Akiko Yoshida[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P66] Synthesis and Cancer-Cell-Selective Toxicity of a Dicopper(II) Complex with NLS-Peptide Attached Phenol-2,6-bis(amide-tether-tacn) Ligand

*Ami Kodama[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

NMR analysis of transient unfolding/refolding protein structures by encapsulation in a self-assembled cage

(Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Institute for Molecular Science (IMS)[2], Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University[3]) ○ROSSEN, Anouk[1]; NAKAMA, Takahiro[1]; YAGI-UTSUMI, Maho[2]; FUJITA, Daishi[3]; KATO, Koichi[2]; FUJITA, Makoto[1,2]

Structural analysis of protein unfolding/refolding has been difficult as partially unfolded intermediates are unstable and often aggregate in solution. To elucidate these transient structures that are unobservable by standard spectroscopy techniques, development of new analysis methods for studying protein unfolding/refolding is paramount. We have previously reported the encapsulation of a single protein in a giant self-assembled $M_{12}L_{24}$ cage, which stabilized the protein under denaturing conditions by preventing its aggregation and precipitation.[1]

In this work, we analysed transient protein structures in solvent-induced unfolding and refolding by encapsulation of a protein in a self-assembled cage. (Fig 1).[2] The confined space in the cage can isolate an unstable unfolded protein, preventing formation of insoluble aggregates, and thus enabling NMR analysis of protein unfolding/refolding processes. A cutinase-like enzyme (CLE) was ligated to a bispyridine ligand (L), and subsequent self-assembly with Pd^{II} ions (M) yielded an $M_{12}L_{24}$ cage encapsulating the protein. In 90% acetonitrile/water solvent unencapsulated CLE precipitated, whereas for encapsulated CLE an unfolded, molten globule structure was observed. To investigate the unfolding process, we increased the acetonitrile-to-water ratio in steps. In ^{1}H–^{15}N HSQC NMR analysis, sudden attenuation of peak intensity indicated that the encapsulated CLE rapidly lost its native structure at 83% acetonitrile. Mapping of the peak intensity reduction revealed the structure of the unfolding CLE intermediate (Fig 1b). Since the perturbation was concentrated in certain areas, it is suspected that collapse of these regions is what initiated the unfolding. By decreasing the acetonitrile ratio we also examined the structural change upon refolding of the denatured protein (Fig 1a). The encapsulated CLE was shown to start refolding at 80% and fully restored its native structure at 70% acetonitrile ratio. The difference in transition points in the unfolding/refolding indicated hysteretic behaviour. Moreover, the difference in peak intensity recovery suggested the pathway for refolding may differ from that of unfolding.

In conclusion, we were able to observe the transient intermediate structures of protein unfolding/refolding processes by confinement in the $M_{12}L_{24}$ cage.

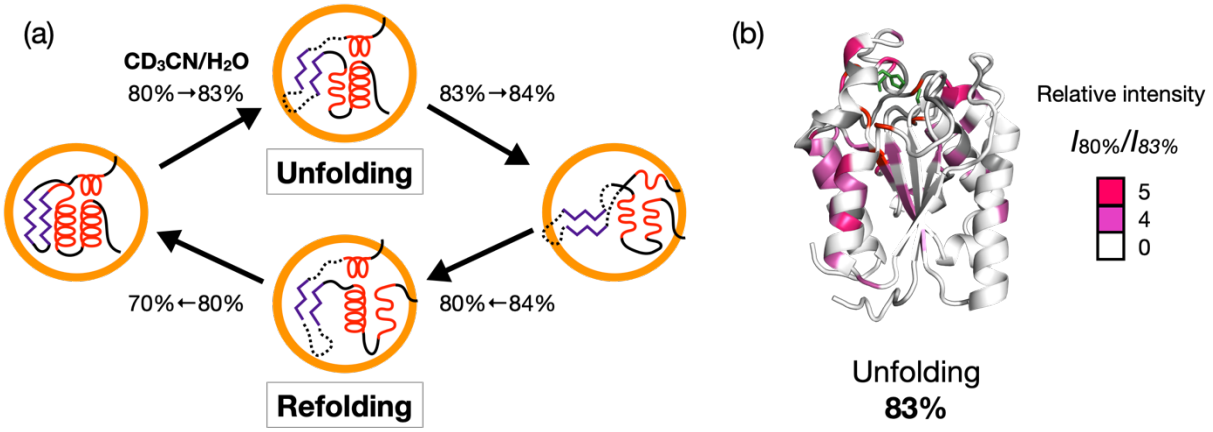


Fig 1. a) Schematic representation of the solvent-induced unfolding/refolding process for CLE. b) Relative peak intensity mapping for each residue for unfolding at 83% as compared to the intensity at 80% acetonitrile. The residues assigned to the disappeared peaks and unassigned residues are shown in red and gray, respectively.

1) Fujita, D.; et al. *Chem* **2021**, *7*, 2672–2683. 2) Nakama, T.; Rossen, A.; et al. *in preparation.*

細胞膜ホスファチジルイノシトール 4-リン酸を可視化する蛍光バイオセンサーの開発

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

Development of novel fluorescent biosensors for visualizing plasma membrane phosphatidylinositol 4-phosphate (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology[1], Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University[2]) AJIKI, Moeka[1]; YOSHIKAWA, Masaru[1]; NAKATSU, Fubito[2]; TSUKIJI, Shinya[1]

ホスファチジルイノシトール 4-リン酸（PI4P）は動物細胞の生体膜に最も多く存在するイノシトールリン脂質の一つであり、特に細胞膜とゴルジ体の膜に豊富に存在している [1)]。細胞膜上に存在する PI4P（細胞膜 PI4P）はホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸（$PI(4,5)P_2$）の前駆体になることや、さまざまなエフェクタータンパク質を細胞膜にリクルートすることで膜ダイナミクスを制御していることが知られている。さらに近年では、小胞体と細胞膜間のメンブレンコンタクト形成において、PI4P の濃度勾配がその形成と解消に関与する機構が明らかとなってきた [2)]。このように細胞膜 PI4P はさまざまな細胞生理機能に関与する重要な脂質分子であるが、細胞膜 PI4P の動態や、それが制御する細胞生理機能のメカニズムについては不明な点が多い。これらの解明のためには、細胞膜 PI4P を特異的かつ高輝度に検出可能な蛍光バイオセンサーが必要となる。PI4P に対する既存のバイオセンサーとしては、病原菌レジオネラ・ニューモフィラ由来の SidM タンパク質が持つ PI4P 結合モチーフ（P4M）[3)]や、OSBP タンパク質の PH ドメイン（PH_{OSBP}）[4)]を蛍光タンパク質に融合したものが報告されている。しかし、実際にはこれらのプローブはゴルジ体 PI4P に対する特異性の方が高く、細胞膜 PI4P の検出には不向きであった（下記参照）。

そこで本研究では、細胞膜 PI4P を高選択的に可視化できる新規蛍光バイオセンサーの開発を目指した。具体的には、オキシステロール結合タンパク質関連タンパク質（ORP）ファミリーの一種である ORP9 の PH ドメイン（PH_{ORP9}）が PI4P に結合することに着目し（中津ら、未発表データ）、PH_{ORP9} を細胞膜 PI4P 結合モチーフとして用いることを考えた。そこで、PH_{ORP9} に緑色蛍光タンパク質 AcGFP を融合したコンストラクト（AcGFP-PH_{ORP9}）を作成し、細胞内に発現させたところ、明るい蛍光が細胞膜上で観察された（図 1a）。脂質特異的枯渇実験の結果、AcGFP-PH_{ORP9} が細胞膜上の PI4P を特異的に標識していることが示され、AcGFP-PH_{ORP9} が細胞膜 PI4P 蛍光バイオセンサーとして機能することが確認された。一方、既存の P4M を PI4P 結合モチーフとして使用した場合（AcGFP-P4M）、細胞質を拡散した成分とゴルジ体に結合した成分が主に見られ、細胞膜への局在はほとんど検出できなかった（図 1b）。また、AcGFP-PH_{OSBP} は、細胞膜 PI4P よりもゴルジ体 PI4P に対して強く結合する様子が示された（図 1c）。以上の結果は、AcGFP-PH_{ORP9} の細胞膜 PI4P バイオセンサーとしての優位性を示している。本発表では、一連の実験の詳細について報告する。

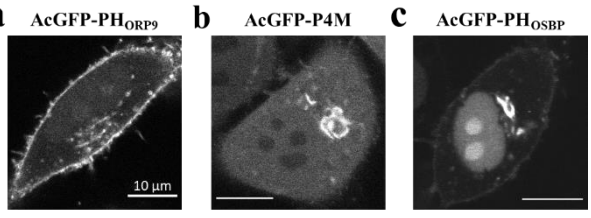


図1：各プローブによるPI4Pイメージング（HeLa細胞）

1) F. Nakatsu et al., *J. Cell Biol.* 199, 1003-1016 (2012)
2) F. Nakatsu et al., *Front Cell Dev. Biol.* 9:664788 (2021)
3) G. R.V. Hammond et al., *J. Cell Biol.* 205, 113-126 (2014)
4) A. Balla et al., *Mol. Biol. Cell.* 16, 1282-1295 (2005)

ステロイド代謝酵素を基盤とする Pd(II)含有人工金属酵素の創製と分子内ヒドロアリール化に対する触媒活性の評価

○西脇春香・加藤俊介・林　高史（阪大院工）

Construction of Pd(II)-containing Artificial Metalloenzymes Using Protein Scaffolds of Steroid Metabolizing Enzymes and their Application to Intramolecular Hydroarylation Reaction (Graduate School of Engineering, Osaka University) NISHIWAKI, Haruka; KATO, Shunsuke; HAYASHI, Takashi

非天然の合成金属錯体を補因子としてタンパク質反応場に導入した「人工金属酵素」の開発が、近年注目を集めている[1]。現在までに様々な人工金属酵素の構築手法が報告されているが、本研究では新たな研究展開として、ステロイド代謝酵素の基質認識を利用した人工金属酵素の開発に着手した。ステロイド代謝酵素は多くの生物に存在する酵素であり、基質であるステロイドを捕捉し、触媒反応を促進する精巧な反応場を具備する。本研究では、ステロイド骨格を部分構造に有する合成金属錯体を合成し、ステロイド代謝酵素の基質認識を介して酵素本来の活性中心に合成金属錯体を配置することで、酵素の精巧な反応場と金属錯体を協働させることをめざした。また、対象となりうるステロイド代謝酵素は、数多くの種類が存在するため、反応場の構造が異なる様々な候補の中から、反応に適した酵素を選ぶことができるのも本系の魅力である。これらの利点を活用し、本研究では、種々のステロイド代謝酵素について人工金属酵素の構築と触媒活性の検討を実施したので報告する。

本研究では、ステロイド代謝酵素本来の活性中心に、金属錯体を配置することをめざし、コレスタン骨格を部分構造に有する Pd-NHC 錯体（**Pd1**）を設計・合成した（図 1）。次に、**Pd1** を種々のステロイド代謝酵素と複合化することで、Pd を活性中心に有する人工金属酵素を調製した。さらに、調製した人工金属酵素を用いて分子内ヒドロアリール化反応を実施したところ、*R. erythropolis* 由来 3-Ketosteroid-Δ1-dehydrogenase（ReKSTD）に **Pd1** を複合化した人工金属酵素（ReKSTD-**Pd1**）が、優位な触媒活性を示すことが明らかとなった（図２）。ステロイド代謝酵素 ReKSTD 自身は触媒活性を示さなかったことから、ReKSTD-Pd1 の触媒活性は酵素に結合した **Pd1** によるものであると考えられる。また、ReKSTD-**Pd1** の調製時に、**Pd1** と類似のステロイド化合物を添加したところ、触媒活性が低下したことから、**Pd1** はステロイド代謝酵素の基質認識部位に結合していることが示唆された。

1) T. R. Ward *et al. Chem. Rev.* **2018**, *118*, 142–231.

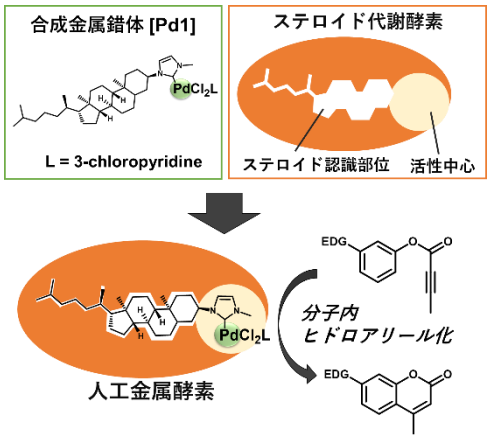


図 1 本研究で開発に取り組む人工金属酵素のデザイン

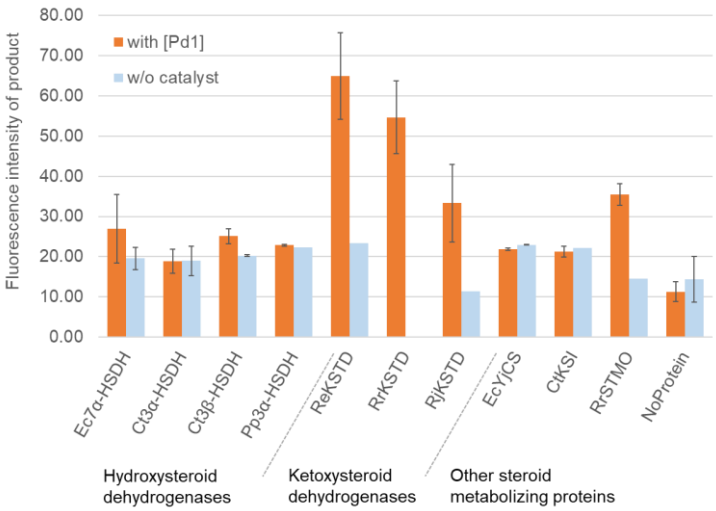


図 2 反応終了時における生成物の蛍光強度の比較
（λ_{ex} = 368.5 nm, λ_{em} = 466 nm）

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

二つの異なる蛍光色素を修飾したタンパク質を構成要素とするハイドロゲルの調製

○印南拓希・大洞光司・林　高史（阪大院工）

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

ハイドロゲルに関する研究は数多く報告されているが、その中には外部刺激に応答して形状や物性を変化させるものがある。このような刺激応答性ゲルの構築法の一つとして、特定の刺激に応答して物理化学的性質が変化する機能性分子をゲルの三次元網目構造の内部に導入する手法が挙げられる。特に、機能性分子としてタンパク質を用いると、温度や pH 等の外部刺激に応答したタンパク質のミクロな構造や物性の変化が、マクロなゲルの形状や力学的物性に変化を与えることが知られている [1]。

我々のグループでは、安定な共有結合を介してタンパク質をゲルの三次元網目構造内に導入し、前述のゲルとは逆にマクロな力学的外部刺激をタンパク質のミクロな構造変化として反映することで、新しいタイプの応力集中可視化ゲルが開発可能であると考えた。そこで本研究ではタンパク質の力学的刺激による変性と折り畳みに注目し、その構造変化を定量評価するために、ゲルの構成要素となるタンパク質に対して、フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）のドナーおよびアクセプターとして機能する二つの異なる蛍光色素の導入を試みた。FRET は距離依存性が強いため、タンパク質中に二つの蛍光色素を導入すれば、タンパク質の変性と折り畳みに伴う大きな構造変化によって蛍光スペクトルが大きく変化すると予想される。さらに、溶液中でのタンパク質の変性と折り畳みに伴うエネルギー変化とそれに伴う FRET の蛍光スペクトル変化を関連づけることで、ゲルへの応力に伴う局所的なエネルギー変化の定量的な可視化が可能と考えられ、新規メカノフォアとしての応用が期待される。ハイドロゲルの構成要素として用いるタンパク質としてはβ-lactoglobulin を用い、タンパク質に導入するドナーおよびアクセプター蛍光色素として fluorescein と tetramethylrhodamine をそれぞれ選択した。fluorescein はβ-lactoglobulin に一つだけ存在するフリーのシステイン残基へ導入し、tetramethylrhodamine はアジド化処理 [2]を行った N 末端へ dibenzocyclooctyne（DBCO）を介して導入した。また、β-lactoglobulin 表面に多数存在するリジン残基と両末端に succinimide を修飾した polyethylene glycol によるアミド結合形成により架橋し、目的のハイドロゲルを調製した。

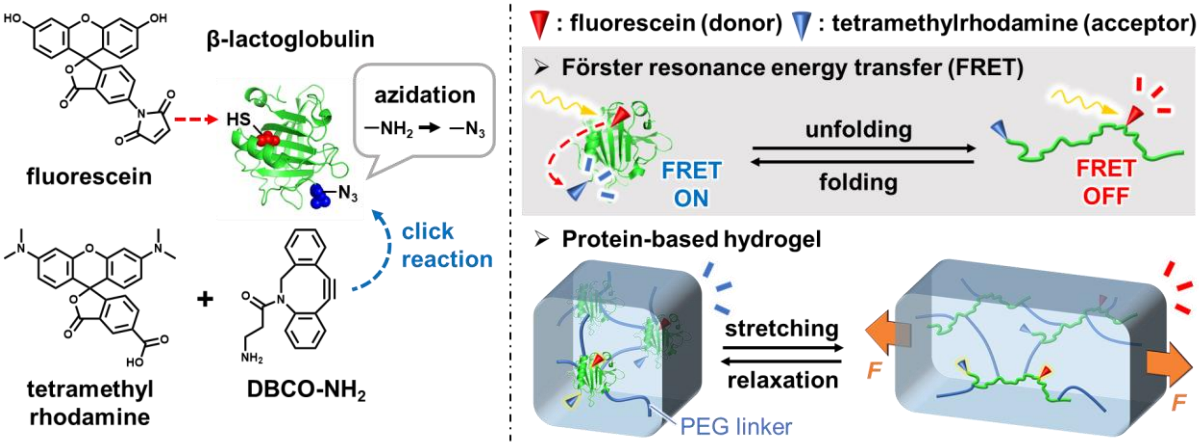


Fig 1. Schematic representation of β-lactoglobulin-based mechanofluorescent gel

1) W. L. Murphy *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 3066-3069.
2) S. Schoffelen *et al*., *Chem. Sci*., **2011**, *2*, 701-705.

抗体担持ナチュラルキラー細胞療法を可能にする人工抗体の創製

○田中千尋[1]・藤野公茂[1]・原田結[2,3]・米満吉和[2,3]・林剛介[1]・村上裕[1,4]（[1]名大院工、[2]九大院薬、[3]革新的バイオ医薬創成学、[4]名大ナノライフ）

Development of Artificial Antibody for Antibody-anchored Natural Killer Cell Therapy (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Pharmaceutical Sciences Kyushu University[2], R&D Laboratory for Innovative Biotherapeutics Science[3], Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University [4]) TANAKA, Chihiro[1]; FUJINO, Tomoshige[1] ; HARADA, Yui[2,3] ; YONEMITSU, Yoshikazu[2,3] ; HAYASHI, Gosuke[1] ; MURAKAMI, Hiroshi[1,4]

がんは世界的にメジャーな病気の一つであり、日本でも二人に一人が何らかのがんにかかると言われているほど非常に身近な病気である。一般的に行われるがんの治療法として、手術療法、放射線療法、薬物（化学）療法を含めた三大療法があるが、近年、三大療法よりも副作用が低い第四の療法として免疫療法が注目されている。

特に、ナチュラルキラー（NK）細胞療法では、NK 細胞の複数のセンサーによって正常細胞と腫瘍細胞を見分けることができ、副作用が少ないと考えられている。NK 細胞は、抗体の Fc 領域に Fcγ レセプターによって結合することで ADCC（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity）活性を発揮し腫瘍細胞を傷害するため、NK 細胞療法は腫瘍細胞上の抗原を標的化した抗体医薬品との併用で高い相乗効果が期待できる。しかし、NK 細胞の Fcγ レセプターには親和性が低い（K_D=0.1～1 μM）という問題があるため、NK 細胞から解離した抗体医薬品が正常細胞に結合すると、好中球や単球などの他の特異性の低い免疫細胞が正常細胞を攻撃するという問題を引き起こす。治療の障害となるこの副作用を抑制するためには、NK 細胞のみが Fcγ レセプターを介して抗体医薬品の Fc 領域に結合しなければならない。この課題を解決するために、NK 細胞と、抗体医薬品をつなぐ架橋構造体を作製し、あらかじめ細胞と抗体を結合させておく方法が提案された（特願 :2020-113083）。しかし、開発したプロトタイプでは、NK 結合ドメインに scFv を、IgG 結合ドメインに Protein G を用いており、scFv の親和性が低い（K_D = 10 nM）ことや、架橋構造体自体が凝集しやすいといった課題がある。

本研究では、これらの問題を解決するために、scFv に代わる NK 結合ドメインの人工抗体を取得することを目的とした（図 1A）。scFv の代わりに、人工抗体としてモノボディを用い、進化分子工学的手法の一種である TRAP 提示法（transcription-translation coupled with association of puromycin linker display）[1,2] を用いて NK 細胞上のタンパク質である 2B4 に結合するモノボディを選択した（図 1B）。その結果、K_D が数 nM で、かつ k_{off} が遅く外れにくい複数のモノボディを創製することに成功した。

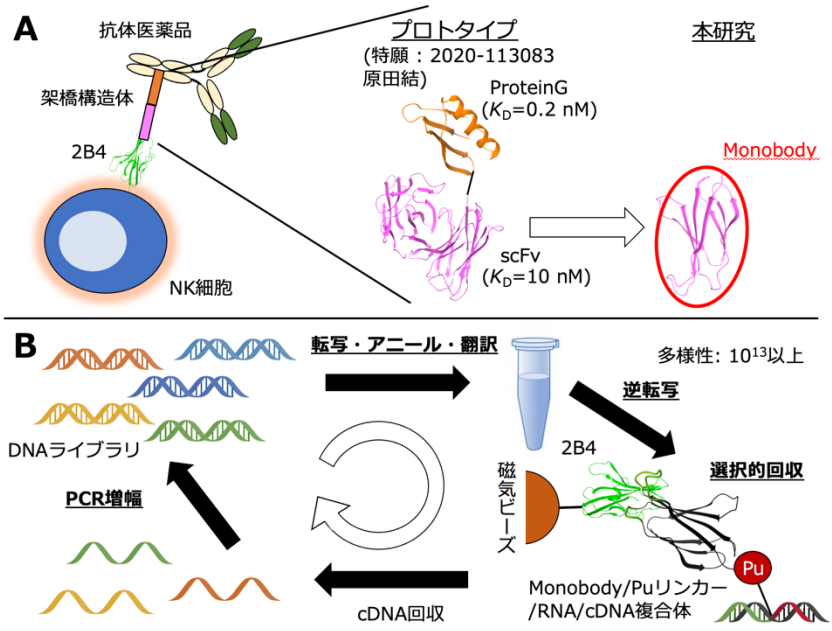


図 1 (A) 架橋構造体の構造 (B)TRAP 提示法の概略図

1. Ishizawa, T.; Kawakami, T.; Reid, P. C.; Murakami, H., *J Am Chem Soc.* 2013, 135 (14), 5433-40.
2. Kondo, T. et al., *Sci Adv.* 2020, 6 (42), eabd3916

構造情報に基づくアデノシン A_{2A} 受容体の化学遺伝学的活性化

○牧野碧・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

Chemogenetic activation of adenosine A_{2A} receptors focusing on structural information. (Graduate School of Engineering, Nagoya University) MAKINO, Midori; DOURA, Tomohiro, KIYONAKA, Shigeki

G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、細胞外シグナルの伝達を介して広範な生理的プロセスに関与し、創薬標的として注目される。GPCR は発現する細胞種によって働きが異なることが知られるため、細胞種ごとでの機能解明が求められる。しかし従来の薬理学的な手法では細胞種選択的な GPCR の活性制御が難しく、個々の GPCR の詳細な機能は十分に解明されていない。このような背景から、個々の GPCR の機能解明に向けて、その発現位置や機能を変化させずに活性制御する手法が求められる。

そこで我々は特定の細胞で GPCR の活性制御を可能とする化学遺伝学的手法として Extracellular Loop-Engineered Chemogenetics (eLEC)を提唱している。本手法では内在性リガンドの結合位置から遠い細胞外ループ(ECL)に変異導入を行うことで、内在機能を保った変異体に対し人工リガンドによる変異体選択的な活性制御を可能とする手法である。これまでに class A や class C に属する GPCR において拮抗薬(アンタゴニスト)を用いた変異体選択的な活性制御系の構築を進めてきた。

本研究では、活性化剤(アゴニスト)を基盤とした $A_{2A}R$ の活性制御を検討した。アゴニストの結合過程での立体障害を軽減することを狙い、Adenosine と $A_{2A}R$ の結晶構造を基に $A_{2A}R$ の ECL2 や ECL3 に Ala を変異導入した変異型 $A_{2A}R$ を作製した。これらの変異型 $A_{2A}R$ について内在リガンドである adenosine による活性応答を測定した結果、変異型 $A_{2A}R$ は野生型と同等の活性応答を示した。これらの変異体の中で、リガンド結合ポケット上部で塩橋を形成する E169 や H264 に変異導入した変異型 $A_{2A}R$ に対して、既報の $A_{2A}R$ 選択的アゴニスト CGS21680 の 50%効果濃度(EC_{50})を測定したところ、野生型 $A_{2A}R$ よりも EC_{50} が数倍低濃度シフトした。E169 や H264 の側鎖の立体障害の軽減により CGS21680 との活性化能が向上したと考えられたため、E169 や H264 に近接する adenosine 6 位に置換基をもつ adenosine 誘導体を作製し、変異型 $A_{2A}R$ に対する EC_{50} を測定した結果、野生型 $A_{2A}R$ よりも EC_{50} が数十倍低濃度シフトした誘導体を見出した。

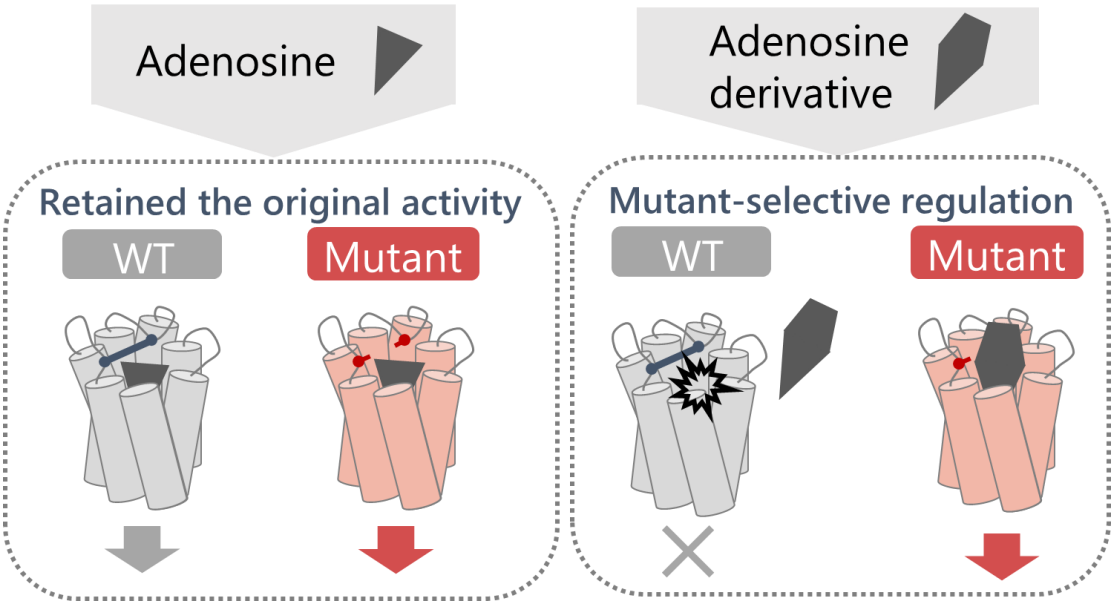


Fig. 1 Schematic of mutant-selective activation by eLEC

様々な配位子構造を持つ Pd 錯体を用いた mGlu1 の直交的活性制御法の模索

○倉掛涼香[1]・三浦裕太[1]・妹尾暁暢[1]・小島憲人[1,2]・浜地格[2]・清中茂樹[1]
（[1]名大院工、[2]京大院工）

Exploration of orthogonal activation of mGlu1 using Pd complexes having different ligands. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University [2]) KURAKAKE, Suzuka[1]; MIURA, Yuta[1]; SENOO, Akinobu[1], OJIMA, Kento[1,2]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

ヒトの脳にはおよそ 1000 億のニューロンと、その 10 倍以上におよぶグリア細胞が存在しており、記憶や学習を始めとした脳機能を調節している。ニューロンやグリア細胞に発現しているタンパク質の機能不全は、統合失調症やアルツハイマー病などの精神・神経疾患を引き起こす。そうした疾患の治療を目指して、神経細胞に発現しているタンパク質の機能解明が進められている。

目的の受容体の生理的機能を調べるためには、本来の機能を維持した状態で、目的の受容体のみを特異的に制御する手法が求められる。我々が開発を進めている配位ケモジェネティクス法は、受容体の特徴的な構造変化に着目した化学遺伝学的なアロステリック活性制御法であり、これまでに AMPA 型グルタミン酸受容体を始めとするいくつかの受容体に対し、人為的活性化及び人為的阻害法の開発に成功している(1)(2)。さらに、我々の最近の研究では、代謝型グルタミン酸受容体 I （mGlu1）において Histidine や Cysteine といった配位性アミノ酸を導入した三種の変異体と、Pd(bpy)、Cu^{2+}、Zn^{2+}の金属種間での直交的活性制御を達成した(3)。これは複数の脳領域に発現している mGlu1 を、細胞種特異的に解析できる点において有効な手法である。しかし生体内への適応を考慮した際には、生体内に多く存在する Cu^{2+}や Zn^{2+}に変わる金属種による選択性が求められる。

以上を踏まえ、本研究では Pd を用いて、配位子構造の違いによる配位ケモジェネティック直交的活性制御法の開発を目指した。Ligand binding domain の様々な位置に配位性アミノ酸を導入した mGlu1 変異体と、多様な Pd 錯体を用いて変異アミノ酸の側鎖の配向や周囲のアミノ酸との相互作用から選択性を生み出すことを狙う。本手法は、生体内に存在しない Pd 錯体を用いることで、生体内直交的活性化を実現できると期待される。

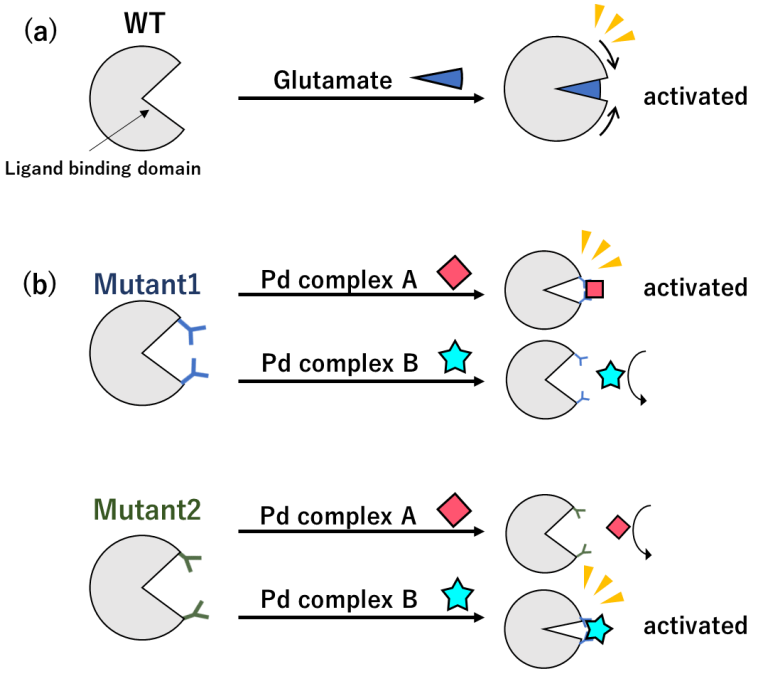


Fig. 1 (a) Glutamate-induced activation mechanism of mGlu1. (b)Orthogonal regulation of mGlu1 using Pd complexes.

1) S. Kiyonaka et al., *Nature Chem.* (2016)
2) K Ojima et al., *Nat. Commun.* (2022)
3) A. Senoo et al., *Front Chem.* (2021)

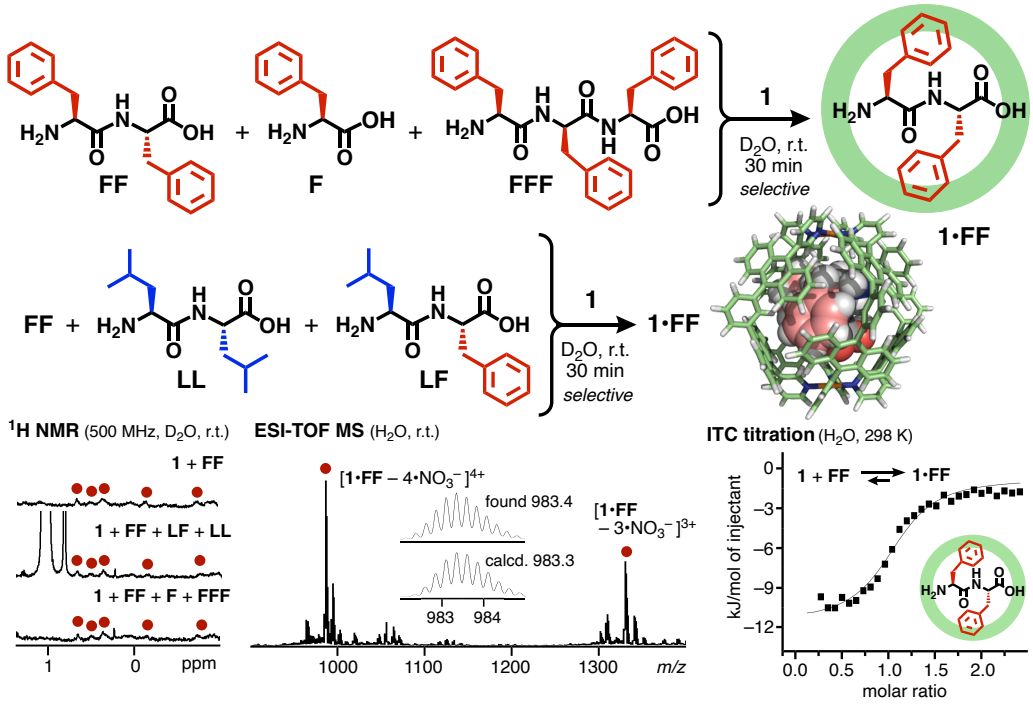
芳香環カプセルの閉鎖空間を活用した非保護ペプチドの選択的識別

○首藤真優・湯浅茉奈・角田瑠輝・吉沢道人（東工大・化生研）

Selective Recognition of Unprotected Peptides by the Closed Cavity of a Polyaromatic Capsule (Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech) SHUTO, Mayu; YUASA, Mana; SUMIDA, Ryuki; YOSHIZAWA, Michito.

アミノ酸およびペプチドは必須の生体分子である。人工レセプターによるそれらの識別は盛んに研究されているが、そのオリゴマーは複雑な非対称構造を持ち、高度に水和するために、正確に認識することは非常に困難である。これまで、チューブやケージ状の人工レセプターが開発されているが、開放空間のためにペプチドの長さの識別は、ほとんど達成されていない[1)]。本研究では、複数のアントラセンパネルに囲まれた球状の閉鎖空間を有する芳香環カプセル **1**[2-4)]を利用することで、非保護ジペプチドの長さと残基のわずかな違いの識別を達成したので報告する。

まず、カプセル **1** の重水溶液に、フェニルアラニン（**F**）と二量体 **FF** と三量体 **FFF** を等量ずつ加えて室温で 30 分攪拌した。その ^{1}H NMR スペクトルでは、内包された **FF** の脂肪族シグナルが –1 ~ 1 ppm に観測された。ESI-TOF MS スペクトルで、二量体の 1 分子内包体 **1•FF** に由来する分子イオンピーク m/z = 983.4 [**1•FF** – 4NO_3^-]$^{4+}$ が観測され、**FF** の選択的内包を達成した。同条件でカプセル **1** と **FF**、ロイシン-フェニルアラニン（**LP**）、ロイシン二量体（**LL**）を混合した場合、内包体 **1•FF** が選択的に生成した。また、25 ºC における ITC 測定により熱力学的パラメータを求めた結果、**1•FF** の形成によるエンタルピー変化 ΔH = –9.9 kJ/mol、エントロピー変化 TΔS = 18.7 kJ/mol、ΔG = –28.6 kJ/mol が見積もられた。すなわち、内包挙動はエントロピーおよびエンタルピー駆動であることが示された。さらに、結合定数（K_a）は 1.03×10^5 M^{-1} であり、アスパルテーム（$K_a = 1.3 \times 10^4$ M^{-1}）とテストステロン（$K_a = 4.5 \times 10^7$ M^{-1}）の間の結合力であることが判明した。一方、**1** と **F** の相互作用は ITC 測定で観測されなかった。



1) J. N. Martins, J. C. Lima, N. Basílio, *Molecules* **2021**, *26*, 106; 2) N. Kishi, Z. Li, K. Yoza, M. Akita, M. Yoshizawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11441; 3) M. Yamashina, M. Akita, T. Hasegawa, S. Hayashi, M. Yoshizawa, *Science Adv.* **2017**, *3*, e1701126; 4) M. Yamashina, T. Tsutsui, Y. Sei, M. Akita, M. Yoshizawa, *Science Adv.* **2019**, *5*, eaav3179.

タンパク質表面修飾を利用した光スイッチング蛍光分子の光安定性の向上

○鳥井健司[1]・堀雄一郎[2]・菊地和也[1,3]（[1]阪大院工、[2]九大院理、[3]阪大免フロ）

A Photoswitchable fluorescent Probe Using a Photochromic Quencher with High Photostability Assisted by Protein-Surface Modification (Graduate School of Engineering, Osaka University[1], Faculty of Sciences, Kyushu University [2], Immunology Frontier Research Center, Osaka University) TORII, Kenji[1]; HORI, Yuichiro[2]; KIKUCHI, Kazuya[1,3]

光照射により蛍光特性が可逆的に変化する光スイッチング蛍光分子は、タンパク質の動態を局所的に追跡することや RESOLFT や MINFLUX などの超解像蛍光イメージングにおいて、非常に有用なツールである。しかしながら、合成された光スイッチング蛍光分子の多くは親水性の低さから、生体環境中で分子間(内)凝集を引き起こし、光安定性を低下させる大きな要因となっている。そのため、未だ半永久的な可逆応答を示す光スイッチング蛍光分子の開発は難しい課題である。近年、多数のカルボン酸を導入することで、水溶性を向上させた蛍光性ジアリールエテンが開発されたが、細胞膜の透過性が乏しいために生細胞への応用はなされていない[1]。また、スピロピランを用いた光スイッチング蛍光分子も開発されているが、熱異性化により厳密な光制御ができないことが問題となっている[2]。そこで、本研究では水溶液中でも高い光安定性を保つことが可能な「タンパク質表面修飾支援型光スイッチング戦略(Protein-surface-assisted photoswitching strategy)」を確立した(Fig 1)。まず初めに、熱異性化しないフォトクロミック分子としてフリルフルギミド(以降 FF)[3] を蛍光消光基として導入した、光スイッチング蛍光分子 FF-TMR を開発した。FF は開環体と閉環体の 2 つの状態に可逆的に光異性化し、閉環体では可視領域に吸収帯を持つ。FF-TMR は光照射により閉環体に異性化すると、蛍光色素と FF 間の FRET により、蛍光消光を引き起こす (Fig 2)。FF-TMR をタンパク質表面に修飾させたところ、水溶液中でも可逆的な蛍光スイッチングを示し、顕著な光安定性の向上が認められた。本学会では、FF-TMR の詳細な光学物性と、タンパク質表面修飾戦略が光スイッチング蛍光分子にもたらす物性の変化について議論する。

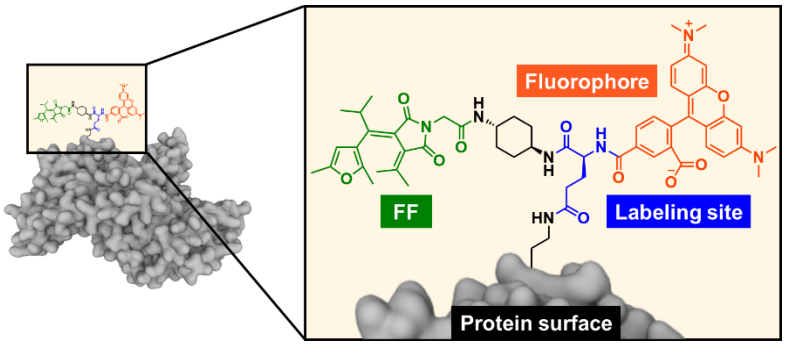


Fig 1. Graphical image of “Protein-surface-assisted photoswitching strategy” and chemical structure of photoswitchable fluorescent probe, FF-TMR.

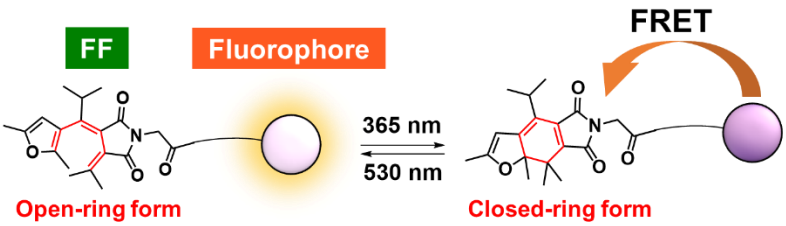


Fig 2. Photoswitching mechanism using furylfulgimide (FF).

1. (a) B. Roubinet, et al, *Angw. Chem. Int. Ed.* **55**, 15429 (2016). **(b):** K. Uno, et al, *J. Am. Chem. Soc*. **141**, 16471 (2019).
2. (a): X. Chai, et al, *J. Am. Chem. Soc*. **142**, 18005 (2020). **(b):** A. T. Frawley, et al, *Chem. Sci*. **11**, 8955 (2020).
3. (a): Y. Yokoyama, *Chem. Rev.* **100**, 1717 (2020). **(b):** D. Lachmann, et al, *Eur. J. Org. Chem*. **31-32**, 5018 (2019).

自己集合球状錯体への共包接によるタンパク質－糖鎖の弱い相互作用の誘起

○田所美璃[1]・中間貴寛[1]・藤田誠[1,2]（[1]東大院工、[2]分子科学研究所）

Induction of protein–sugar weak interactions by co-encapsulation within a self-assembled spherical cage

(Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Institute for Molecular Science[2]) Miri Tadokoro[1]; Takahiro Nakama[1]; Makoto Fujita[1,2]

タンパク質と糖鎖の間にはたらく弱い相互作用は、免疫作用や細胞同士の情報伝達をはじめ生体内の重要な役割を担っている。しかし、その過渡的・動的な相互作用に基づくタンパク質－糖鎖複合体は、従来の構造解析手法では観測が困難であり、その構造的な解明が強く求められている。

当研究室では、配位子(L)と Pd(II)イオン(M)の自己集合で形成する $M_{12}L_{24}$ 球状錯体へのタンパク質の包接を報告してきた[1,2]。包接タンパク質は $M_{12}L_{24}$ 錯体内に隔離されることで安定化し、その凝集前の変性構造を観測することができた。我々は、この錯体の直径 5 nm の一義内部空間が、近接効果により包接したタンパク質と糖鎖の間の弱い相互作用を誘発し、その複合体を観測するのに適した場になると考えた。そこで本研究では、タンパク質－糖鎖複合体の構造解析を目指し、$M_{12}L_{24}$ 自己集合球状錯体にタンパク質と糖鎖を共包接することで、その弱い相互作用を誘起できることを実証した(図 1)。タンパク質と糖鎖を共に錯体へ包接し、糖鎖の結合による酵素活性の阻害を観測することで相互作用の誘起を評価した。

はじめに、タンパク質と糖鎖を球状錯体に共包接する手法を検討した(図 1a)。タンパク質と糖鎖をそれぞれ配位子に縮合し、Pd(II)イオンと自己組織化させることで錯体へ包接することを考えた。そこで、タンパク縮合用の配位子に加え[1]、還元的アミノ化で糖鎖を接合した配位子を 4 種類合成した(図 1b)。^{1}H DOSY NMR で自己拡散係数を測定し、錯形成前後のタンパク質と糖鎖の見かけの大きさを評価することで共包接を確かめた。この手法でリゾチームや小麦胚芽レクチンと糖鎖の共包接を達成した。

次に、糖と包接したリゾチームの酵素活性を測定し、錯体への閉じ込めによる弱い相互作用の誘起を検証した(図 1a)。共包接し近接した単糖または二糖が活性部位へ結合することで、糖鎖を加水分解するリゾチームの酵素能が阻害されると期待した。*N*-アセチル-D-グルコサミン(K_d = 27 mM)、*N,N'*-ジアセチルキトビオース(K_d = 0.27 mM)をリゾチームと共に錯体へ包接し、その酵素活性を蛍光標識された基質の加水分解反応により測定した。その結果、糖との包接体の活性は、遊離のリゾチームまたはリゾチームのみの包接体よりも著しく低下した。一方、遊離の糖の存在下では、酵素反応の阻害はほとんど見られなかった。このように、包接した場合にのみ短い糖鎖が活性部位への基質の結合を阻害したことから、共包接によるタンパク質と糖鎖の間の弱い相互作用の誘起が確かめられた。

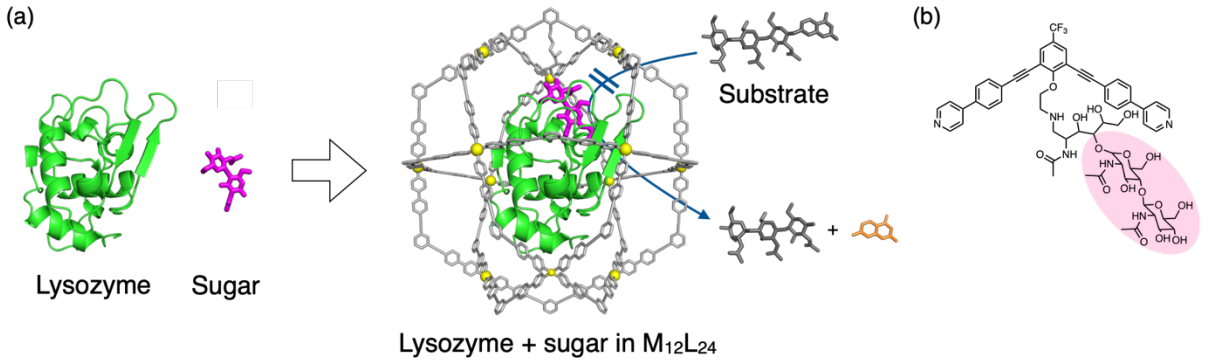


Figure 1 (a) Induction of lysozyme–sugar weak interactions that inhibit the enzymatic activity through co-encapsulation within a self-assembled $M_{12}L_{24}$ cage. (b) Chemical structure of a sugar-conjugated ligand.

1) D. Fujita *et al., Chem* **2021**, *7*, 2672–2683. 2) D. Fujita *et al., Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1093.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

リポソーム二重膜内で自己組織化するイミダゾリル亜鉛ポルフィリン

○井浦悠斗[1]・安原主馬[2]・佐竹彰治[1]（[1]東京理科大院理、[2]奈良先端大物質）

Self-assembly of Imidazolyl Zinc Porphyrins in Lipid Bilayer Membrane (Graduate School of Science, Tokyo University of Science[1], Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology[2]) IURA, Yuto[1]; YASUHARA, Kazuma[2]; SATAKE, Akiharu[1]

細胞膜の機能化はバイオ関連化学分野で注目されている。我々は置換基の導入方向制御が容易なポルフィリン分子の自己組織化を用いて新奇な二分子膜修飾法を検討した。イミダゾリル亜鉛ポルフィリン (ImZnP) は非配位性有機溶媒中でイミダゾールと亜鉛の相補的な配位による頭-頭型二量体を形成することが知られている。一方でポルフィリン類は水中や疎水的な環境では表面積を減らすように集積しやすい性質がある。そこで ImZnP の親水性と疎水性のバランスを調整することができれば、水中で部分的な配位と集積が共存する頭-尾型配位ポリマーを形成する可能性があると考えた。本研究では、頭と尾部に任意の置換基を導入するためにアルキニル基とマレイミド (MI) 誘導体を導入した両親媒性のイミダゾリル亜鉛ポルフィリンを合成し、二分子膜中で頭-尾型配位ポリマー (J-会合ポリマー) を形成することを目的とした。（図１）

頭部のイミダゾール部にプロパルギル基、尾部にマレイミド基、横に伸びる置換基としてトリエチレングリコール鎖を有する ImZnP 合成し、頭部、尾部にいくつかの親水性基および疎水性基を導入した。これらを PC リポソームへ添加し、紫外可視光吸収スペクトルで解析することによってポルフィリンの会合形態を調査した。

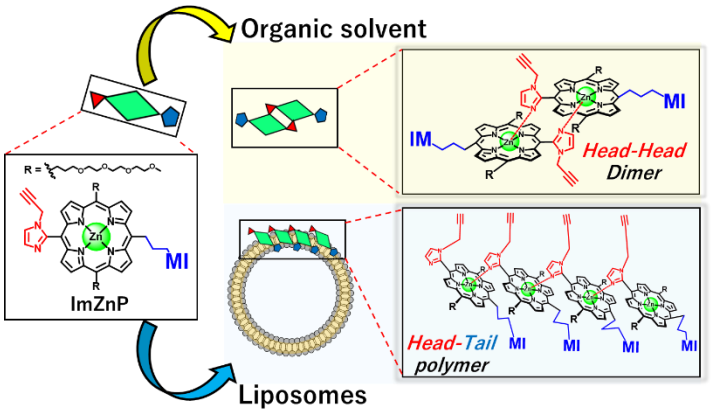


Fig 1. Head-Head Dimer and Head-Tail Polymer Composition.

頭部にポリエチレングリコール (PEG) 鎖を導入した場合、水溶性が高く二分子膜への導入は起こらなかった。一方、尾部に疎水性置換基を導入した場合、頭-尾型配位ポリマーが伸長しなかった。結果、頭部がプロパルギル置換、尾部がフラン保護されたマレイミド基の ImZnPFu を用いた場合にリポソームとの相互作用が起こり、ポリマーの伸長が観測された。

自己組織化の時間変化を調査するために、直径 100 nm の POPC (相転移温度−3℃) リポソーム (500 μM) に 25℃で ImZnPFu の DMSO 溶液を 12 μM になるように添加し、30 分間連続的に UV - vis スペクトルを測定した。添加直後、頭-頭型二量体ではない会合体が観測され、その後 3 分程度頭-尾型配位ポリマーの伸長が観測された。これ以降のスペクトル変化は添加 30 分後までは起こらなかった。一方、リポソーム無しの緩衝溶液中では添加 3 分以降も頭-尾型配位ポリマーの伸長が止まらず徐々に沈殿を生じた。これらの結果から ImZnPFu はリポソームと相互作用することで限定的な伸長を起こし、沈殿が抑えられることが分かった。このリポソーム／ImZnPFu 複合体にトリトン X-100 を添加し、リポソームを破壊したところ、全ての自己組織化体が頭-頭型二量体のスペクトルに変換されたことから、ImZnPFu はリポソームと化学変化等を起こしておらず、異なる自己組織化形態をとっていたことが確認された。

次に、DPPC (相転移温度 41℃) リポソームに対して 25℃で ImZnPFu を添加したところ、POPC リポソームの時よりも、頭-尾型配位ポリマーの伸長速度が 30 倍程度低くなった。膜の流動性がポリマーの伸長速度に影響を与えたことから、ImZnPFu はリポソーム二分子膜において自己組織化していることが明らかとなった。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

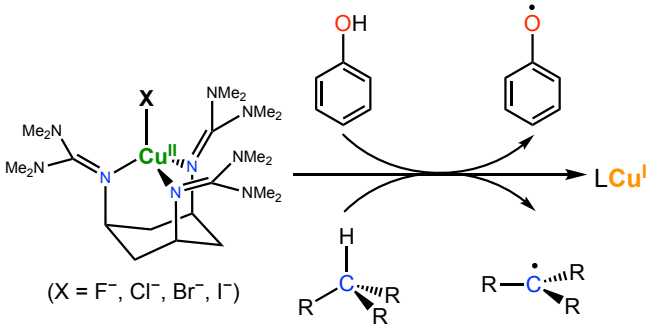
酵素活性中心を模倣した歪んだ四面体構造を有する銅(II)-ハロゲン錯体の特性と反応性の評価

○楊 瀾・森本祐麻・杉本秀樹・伊東忍（阪大院工）

Characterization and Reactivity Studies on a Series of Cu(II)-halide Complexes Having Distorted Tetrahedral Geometry as Model Complexes of Biological Reaction Centers (Graduate School of Engineering, Osaka University[1]) YANG, Lan; MORIMOT, Yuma; SUGIMOTO, Hideki; ITOH, Shinobu.

Owing to generally accessible I/II redox couple and bioavailability, copper containing enzymes play a wide variety of roles in biological systems. To get insights into the chemical properties of mononuclear copper reaction centers with a tetrahedral geometry in dopamine β-monooxygenases (DβM), peptidylglycine α-hydroxylating monooxygenase (PHM), and blue copper proteins,[1] model complexes having tetrahedral geometry need to be developed. However, such Cu(II) complexes having tetrahedral structure are very rare. In this study, we prepared Cu(II) complexes with the series of halide ion as external ligand $[Cu^{II}(TMG_3tach)(X)]^+$ ($X = F^-$, Cl^-, Br^-,I^-) by using a tridentate ligand TMG_3tach, consisting with strongly electron donating substituents TMG (tetramethylguanidine) and a rigid *cis*, *cis*-1, 3, 5-triaminocyclohexane (tach) framework.[2] In contrast to the biomimetic mononuclear tetrahedral Cu(II) complexes supported by well-known Tp (hydrotrispyrazolylborate) ligands which easily changed the geometry from tetrahedral geometry to square-pyramidal geometry upon addition of a slight amount of a coordinating solvent such as DMSO and DMF,[3] our Cu(II) complexes supported by TMG_3tach can undergo ligand exchange reactions with maintaining the tetrahedral geometry. Thus, the present system will provide an ideal platform for the reactivity study of the Cu(II) complexes having tetrahedral geometry.

In this study, we explored the physicochemical properties and reactivity of the Cu(II) complexes in order to evaluate the effects of halide ligands. Mechanistic studies on the reactions with 1,4-cyclohexadiene and phenol derivatives are conducted to show that hydrogen atom transfer mechanism is involved in the oxidation of former substrate whereas proton transfer/electron transfer (PT/ET) mechanism is involved in the oxidation of latter substrate. In addition, DFT calculations on all four Cu(II)-halide complexes have been executed to get further insights into the effect of halide ligands on the Cu(II) complexes having a distorted tetrahedral geometry.



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

生体分子の認識を目指した金属配位に基づく人工ヘムタンパク質多量体の構築

○稲葉大晃[1]・四坂勇磨[1]・上田我竜[1]・榊原えりか[1]・有安真也[1]・愛場雄一郎[1]・杉本宏[2]・荘司長三[1]（[1]名大院理、[2]理研 SPring-8）

Construction of artificial hemoprotein multimers based on metal coordination to recognize biomolecules

(Graduate School of Science, Nagoya University[1], RIKEN SPring-8 [2]) INABA, Hiroaki[1]; SHISAKA, Yuma[1], UEDA, Garyo[1], SAKAKIBARA, Erika[1], ARIYASU, Shinya[1], AIBA, Yuichiro[1], SUGIMOTO, Hiroshi[2], SHOJI, Osami[1]

生体内で様々な機能を担うヘムタンパク質のヘムを人工金属錯体に置換する手法は、ヘムタンパク質の機能改変において強力な手法である。しかし、一般的にヘムタンパク質のヘム結合部位は、ヘムに最適化されているため、ヘムと大きく構造の異なる金属錯体とヘムタンパク質の複合化は困難である。そこで当研究室では、緑膿菌などの一部のグラム陰性菌が分泌するヘム獲得タンパク質 HasA に着目した。HasA は、溶媒に露出した特殊なヘム結合部位を有するため、鉄テトラフェニルポルフィリン（Fe-TPP）のようなヘムと比較して疎水性が高く、嵩高い合成金属錯体を複合化可能である[1] [2]。一方で、TPP 誘導体のような meso 位置換ポルフィリンは、対称性の高い分子構造を活かし、ピンセット型やカプセル型の分子の骨格に利用されており、分子認識などの機能発現を達成している。そこで本研究では、ポルフィリン誘導体を骨格として HasA を多量化することで HasA を分子認識ユニットとして機能させ、タンパク質で覆われた空間を利用した生体分子の認識を目指した（**図 1**）。

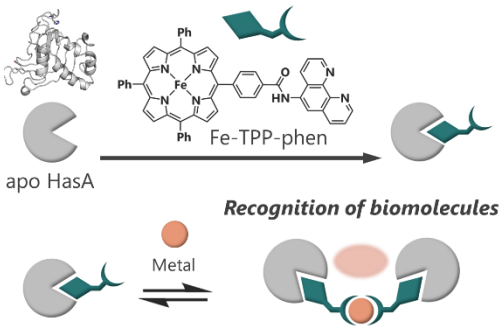


図 1　金属配位による HasA の多量化と分子認識の概念図

Fe-TPP HasA の結晶構造から Fe-TPP のフェニル基が溶媒に露出していることに着目し、配位子であるフェナントロリン（phen）を連結した Fe-TPP-phen（**図 1**）を HasA と複合化することで、金属配位による HasA の多量化が可能であると予想した。大腸菌発現後、ヘムを取り除いた HasA（apo HasA）に対して、合成した Fe-TPP-phen を滴下することで複合化を行った。Cu キレートカラムとサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって精製を行い、UV/Vis スペクトルと ESI-TOF-MS から目的の Fe-TPP-phen HasA 複合体の形成を確認した（**図 2**）。得られた人工 HasA の phen に配位させる金属イオンとして Ni^{2+}を選択し、$NiCl_2$ を添加した溶液を SEC によって分析した。その結果、HasA 2 量体と考えられる溶出位置に新たなピークが出現したため、Ni^{2+}と phen の錯形成によって HasA 2 量体の形成が示唆された（**図 3**）。現在は、その他の金属イオンによる多量化と、得られた HasA 多量体の構造解析について検討中である。

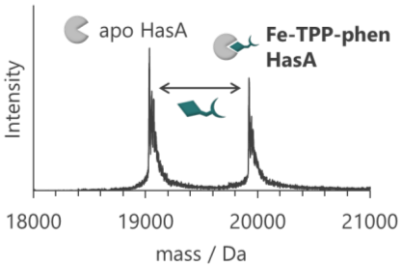


図 2　Fe-TPP-phen HasA の ESI-TOF-MS

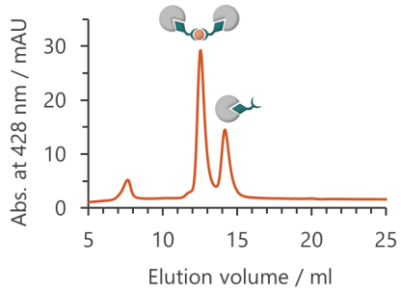


図 3　Fe-TPP-phen HasA に $NiCl_2$ 添加後の SEC

[1] C. Shirataki *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2862-2866. [2] Y. Shisaka *et al.*, *ChemBioChem.* **2022**, e202200095.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

近赤外光による金属フタロシアニンの軸配位子脱離を利用するアクティベータブル光音響造影剤の開発

○野北康平・三木康嗣・大江浩一（京大院工）

Development of activatable photoacoustic contrast agents utilizing photoinduced elimination of axial ligand of metallophthalocyanines (Graduate School of Engineering, Kyoto University) NOGITA, Kohei; MIKI, Koji; Ohe, Kouichi

光音響イメージング（PAI）は、生体内深部組織を高い分解能で可視化できる低侵襲的なイメージング法として近年注目されている。金属フタロシアニン（MPc）類は吸収した近赤外光エネルギーを熱として放出しやすく、効率的に PA 信号を発することができるため、PAI 用造影剤への応用が期待されている。当研究室ではこれまでに、ベシクルを形成した両親媒性 MPc（**MPcPEG**、Figure 1a）に近赤外光（λ＝730 nm）を照射すると、MPc の中心金属が持つ水溶性軸配位子が脱離し、軸配位子として水酸基を持つ水溶性の低い MPc（**MPcOH**）が生成し、凝集が進むことで光音響信号が増大することを明らかにした。一方、無秩序に凝集した **MPcPEG** の自己集合体に近赤外光を照射しても軸配位子の切断はほとんど観測されず、光音響信号の増大も起きなかった。本研究では、ベシクルを形成した **MPcPEG** の軸配位子が光照射に応答して切断される機構を明らかにするため、実験的、理論的なデータを基に考察を行った。

ベシクルを形成した **MPcPEG** に対し近赤外光を照射すると、**MPcOH** が生成すると共に軸配位子が脱離することを質量分析により確認した。このことから、光により誘起された **MPcPEG** の軸配位子の脱離反応には M-O-Si 部位の加水分解が関与していると予想した。そこで、軸配位子脱離の反応機構を明らかにするために DFT 計算を実施した。軸配位子を持つ MPc が水中で基底状態、励起状態、ラジカルアニオン、ラジカルカチオンのそれぞれの状態を取る場合に対して構造を最適化し、振動数解析を行った。基底状態と励起状態の MPc 二分子の Gibbs 自由エネルギーの和に対し、ラジカルアニオンとラジカルカチオンの MPc 二分子の Gibbs 自由エネルギーの和を比較すると、後者の方が小さいことが明らかになった。この結果から、励起した MPc に対し近接した MPc から一電子移動が起こり、ラジカルアニオンが生成する方が熱力学的に有利であることがわかった。ベシクルを形成した **MPcPEG** のように MPc 同士が十分近接している場合には、MPc 分子間で電子の授受が起こることで MPc ラジカルアニオンが発生し、周囲の水分子と反応して軸配位子の脱離が起こると考えられる（Figure 1b）。なお、**MPcPEG** は脱酸素条件下と通常濃度の酸素を含む空気下のどちらにおいても、光照射に応じた光音響信号の増大は同程度であった。このことは、軸配位子の脱離機構には一重項酸素の生成がほとんど影響しないことを示唆する。**MPcPEG** は生体内の酸素濃度や還元剤の有無に関わらず、外的要因である光照射に応答して信号を出すことから、実用的な近赤外光応答性 PAI 用造影剤として期待される。

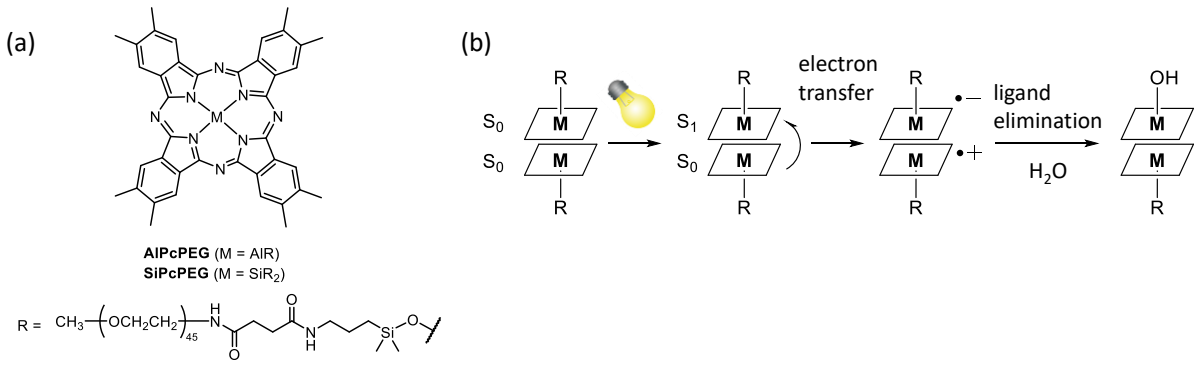


Figure 1. (a) Structure of **MPcPEG**. (b) Plausible mechanism of photoinduced cleavage of axial ligands.

相補的な相互作用を介して形成された共集合体のエネルギー非依存的な脂質膜透過

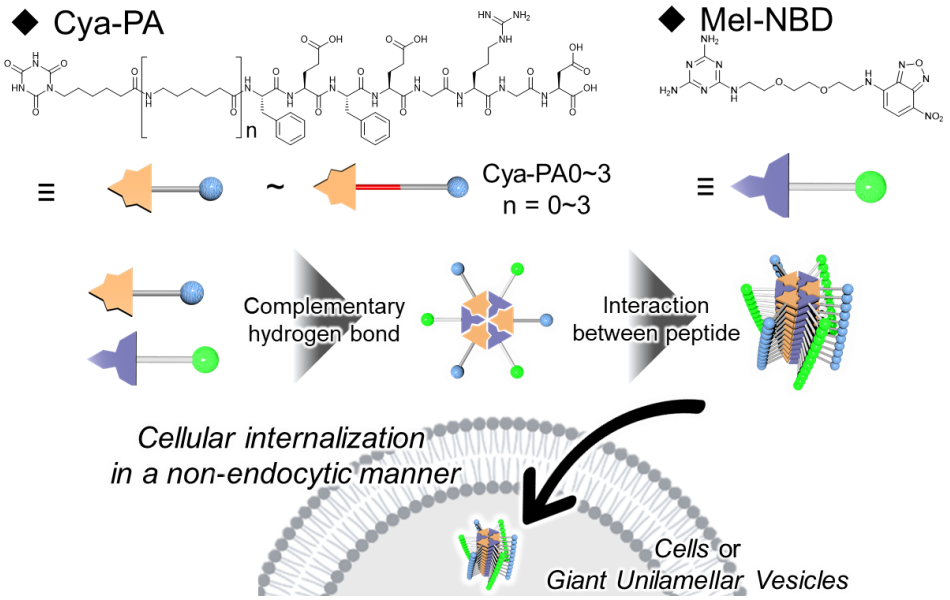
○大林洋貴[1]・若林里衣[1]・神谷典穂[1,2]・後藤雅宏[1,2]（[1]九大院工、[2]九大未来化セ）

Energy-independent lipid-membrane permeation of co-assemblies formed through complementary interaction (Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University[2]) OBAYASHI, Hiroki[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; KAMIYA, Noriho [1,2]; GOTO, Masahiro [1,2]

細胞外物質の細胞内移行経路は細胞内への移行効率を左右する。薬物・プローブ分子等の送達効率の最適化を目指す技術体系である DDS (Drug Delivery System) の観点から考えても、細胞内移行経路の制御は重要である。DDS キャリアの多くが経るエネルギー依存的なエンドサイトーシス経路は、内在化過程で酸性小胞への局在と分解が起こってしまう。一方、近年では、エネルギー非依存的に、細胞膜を直接透過し細胞質へと移行する (非エンドサイトーシス経路) 材料が報告されており、高効率な細胞内デリバリー法への適用が期待されている。しかしながら、本経路を取ると報告されている材料種は少なく、本経路に必要な物理化学的性質への理解や DDS キャリアへの応用は不十分な現状がある[1, 2]。

我々は最近、両親媒性ペプチド (PA) と蛍光プローブ分子 (NBD) からなる階層的な共集合系を報告した。本システムでは、シアヌル酸（Cya）とメラミン（Mel）という相補的な水素結合ペアをそれぞれ PA と NBD に導入した Cya-PA と Mel-NBD とを用いる。Cya-PA と Mel-NBD を混合すると、相補的な相互作用により共集合し、PA の設計に応じた形状に共集合し、形状に応じた細胞内移行を示すことが確かめられている[3]。本発表では、この共集合体の形状に応じた細胞内移行が共集合体と脂質膜との相互作用を起点とした非エンドサイトーシス経路によるものであることを報告する。まず、共集合体の迅速かつ直接的な細胞内有膜小器官（小胞体、ミトコンドリア）への移行を共焦点レーザー顕微鏡によるリアルタイム観察によって確かめた。さらに、人工脂質膜構造体を用いた実験においても、共集合体の形状に応じた膜透過が生じることを確かめた。ユニークな脂質膜透過能を有する本共集合体は将来的に、機能性材料を効率的に有膜細胞内小器官にデリバリーする手段としての応用が期待される。

1) W. He, S. Mitrangotri, et al., *Adv. Funct. Mater*., **30**, 1910566 (2020), 2) H. Nakamura and S. Watano, *KONA*., **35**, 49-65 (2018), 3) R. Wakabayashi et al., *Chem. Commun*, **55**, 6997–7000 (2019).



Molecular design and schematic illustration.

糖鎖プライマー法を用いた低酸素環境における前立腺がん細胞での O-グリカン型糖鎖の解析と細胞遊走性での機能解明

○山本大樹[1]・小坂威雄[2]・大家基嗣[2]・佐藤智典[1]（[1]慶應大理工、[2]慶應大医）

Analysis of *O*-glycan type oligosaccharides in prostate cancer cells under hypoxia and elucidation of their functions in cell migration using saccharide primer method (Faculty of Science and Technology, Keio University[1], Keio University School of Medicine[2]) YAMAMOTO, Daiki[1]; KOSAKA, Takeo[2]; OYA, Mototsugu[2]; SATO, Toshinori[1]

【背景】腫瘍組織内には低酸素の領域が存在する。血管から 100nm 以上離れた領域には酸素が拡散できず、周囲のがん細胞は低酸素状態に陥るが、低酸素誘導因子 (HIF-1α) が発現し低酸素環境に適応する。このようながん細胞は、高い悪性度を示す。前立腺がんは患者数が急増中のがんであり、前立腺がん組織内にも低酸素の領域が多く存在する。低酸素環境における前立腺がん細胞も高い悪性度を示す。そのため、低酸素環境における前立腺がんの悪性化の分子メカニズムの解明が必要である。糖鎖は、細胞のがん化や悪性化によって構造や発現量が変化する。中でも糖タンパク質である *O*-グリカンは、がんの転移や浸潤に関与する。しかし、低酸素環境における前立腺がん細胞に発現する *O*-グリカンの構造と機能は十分に理解されていない。そこで、本研究では低酸素環境における前立腺がん細胞に発現する *O*-グリカンの発現解析を行い、特徴的に発現する *O*-グリカンの機能を解析した。

【方法】 前立腺がん細胞を低酸素環境下で長期間継代培養し、Transwell migration assay および MTT assay を用いて細胞の悪性度を評価した。樹立した前立腺がん細胞の糖鎖解析を、糖鎖プライマー法を用いて LC-MS で行った。糖鎖プライマー法とは、細胞の発現糖鎖を簡便に獲得・解析可能な手法である。次に、低酸素環境が前立腺がん細胞において特徴的に発現増加した糖鎖の糖転移遺伝子を realtime RT-PCR 法を用いて解析した。最後に、低酸素環境において特徴的に発現増加した *O*-グリカンの糖転移遺伝子を、siRNA を用いてノックダウンすることで、低酸素環境における前立腺がん細胞の *O*-グリカンの機能を解析した。

【結果】低酸素環境下で樹立された前立腺がん細胞株は、HIF-1α を高発現し、低酸素環境下での細胞増殖能、高い遊走能を有していた。糖鎖プライマー法を用いた糖鎖の発現解析の結果、低酸素環境における前立腺がん細胞で特徴的に発現増加した *O*-グリカン型糖鎖が見出され、その糖鎖合成遺伝子が細胞遊走性の制御に関わっていることが示された。本研究で見出した *O*-グリカンおよび糖転移遺伝子は新規診断マーカーおよび創薬ターゲットの創出に寄与する。

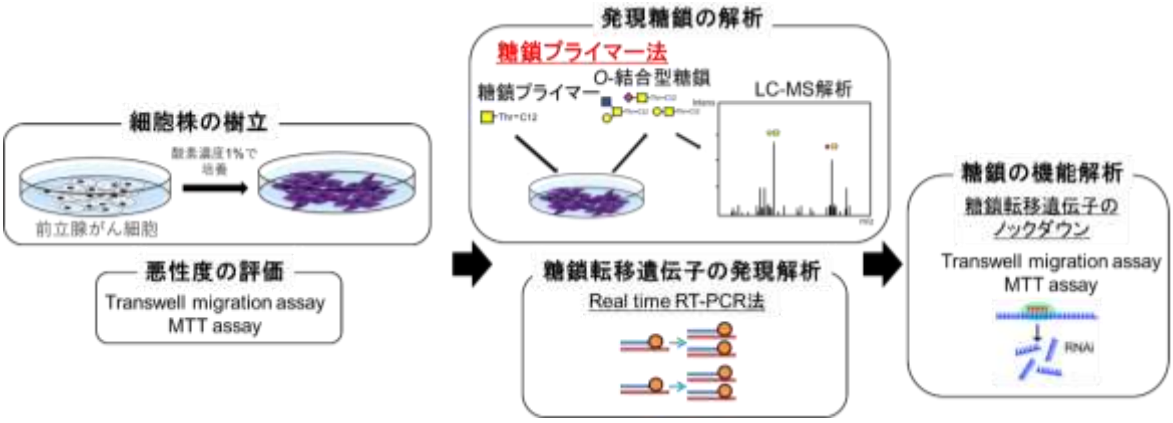


Fig. 研究の概要

H/D 同位体シフトを用いた糖の水和挙動の NMR 解析

○龍岡博亮[1]、山口拓実[1,2]([1]北陸先端大マテリアル、[2]名市大院薬)

NMR analysis using H/D isotope shifts to explore the hydration behavior of carbohydrates (School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology[1], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University[2]) TATSUOKA, Hiroaki[1]; YAMAGUCHI, Takumi[1,2]

生体内の糖鎖は、糖鎖同士やタンパク質との相互作用を通して、免疫応答など多くの生命現象に関与している。また、抗体をはじめバイオ医薬品の多くは糖タンパク質であり、糖鎖が特性の重要な因子となっている。そのため、糖鎖の分子認識機構の詳細を知ることは、生体機能のメカニズム解明に通じるとともに、糖鎖を応用した医薬品開発に向けた新たな分子設計指針を与えるものと期待される。私たちは、糖鎖の構造–機能相関の解明を目指した動的立体構造解析に取り組む中で、糖鎖の構造と溶媒和の関連に着目してきた。糖鎖が関与する分子認識における親和性や選択性には、糖鎖の配列や立体構造に加え、水和構造も密接に影響していると考えられる。しかし、糖鎖の水和に関しての解析法は限られており、未だ知見は少ない。本研究では、核磁気共鳴(NMR)法を用いて水との相互作用解析を行い、糖の水和挙動の探査に取り組んだ。

糖鎖の溶媒和には、糖分子内の水酸基の配向が重要であると考えられる。しかし、水溶液中の水酸基のプロトンは交換が速く、^{1}H NMR 計測のみでは水酸基の詳細な情報を得ることは困難である。そこで、H /D 同位体シフトを利用した ^{13}C NMR 計測に着目した。一般に、^{13}C-OH と ^{13}C-OD では NMR シグナルのケミカルシフトが異なる(Fig 1)。このケミカルシフト差は、水酸基の H/D 交換速度に応じて観測されるため、この性質を利用して、糖と水との間の相互作用を解析できると考えた。そこで水酸基の配向が異なる各種単糖を対象に、NMR 解析を行った。

還元末端をメチル化した、α-グルコース(Glc)、α-マンノース(Man)、α-ガラクトース(Gal)を再結晶により精製し、実験に用いた(Fig 2)。H/D 交換速度を調整するために、有機溶媒を一定の割合で加えた DMSO/H_2O/D_2O の混合溶媒中で各単糖の NMR スペクトルを比較したところ、同位体シフトによる信号の分裂を観測することができた。さらに ^{13}C NMR スペクトルを温度を変えながら測定することにより、^{13}C-OH/OD シグナルが平均化される様子を観測した。その結果、マンノースの水酸基の H/D 交換速度がグルコースやガラクトースと比べて遅いことが分かった。一方、マンノース分子内の各水酸基の間には有意な差が見られなかったことから、水酸基の化学交換速度の違いは、糖が周囲の水のネットワークへ及ぼした影響を反映したものと考えられる。そこで、^{1}H NMR 計測を通して溶液中の水分子の挙動を調べると、マンノース溶液では他の単糖に比べて水－水間の相互作用が強く働くことが分かった。これらの結果から、マンノースがより広い水和圏を形成することが示唆された。また同位体シフトを利用した NMR 計測法が、糖鎖の水和挙動解析に有益な手法であることを示すことができた。

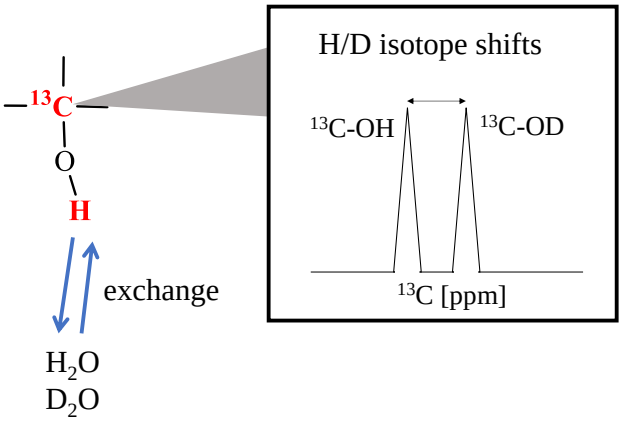


Fig 1. ^{13}C-NMR isotope shift for analyzing proton exchange of hydroxyl groups

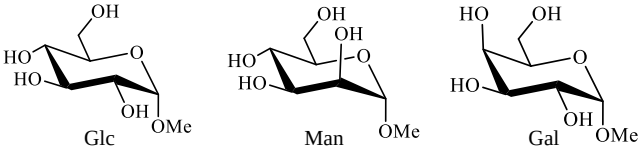


Fig 2. Chemical structures of the monosaccharides methyl α-glucose, methyl α-mannose and methyl α-galactose

糖鎖プライマー法を用いた動物細胞の糖鎖発現解析と インフルエンザウイルス感受性との相関解析

○奥田真由[1]・大形一真[1]・松原輝彦[1]・佐藤智典[1]（[1]慶大理工）

Profiling of glycans in animal cells by the saccharide primer method and correlation analysis with influenza virus susceptibility (Faculty of Science and Technology, Keio University[1]) OKUDA, Mayu[1]; OHGATA, Kazuma[1], MATSUBARA, Teruhiko[1], SATO, Toshinori[1]

インフルエンザウイルス（IFV）は、ウイルス表面のヘマグルチニン（HA）が宿主細胞の表面にある糖鎖を認識することで感染を開始する。IFV の受容体糖鎖として、*N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）含有糖鎖がよく知られているが、シアル酸以外の糖鎖も IFV 感染に影響を及ぼすことが近年報告されており[1]、IFV 感染に関わる新規糖鎖の発見は、感染予防や治療薬開発への意義がある。本研究では、動物細胞に発現する糖鎖を糖鎖プライマー法で獲得し、各細胞の IFV 感染の感受性の違いを realtime RT-PCR 法により測定した。次に、IFV 感受性と各糖鎖の発現量の相関解析を行うことで、IFV 感染に関与する糖鎖の探索を行った。

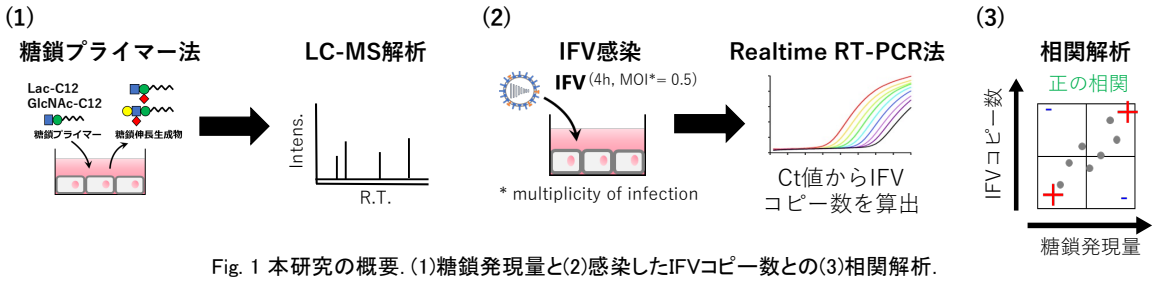


Fig. 1 本研究の概要. (1)糖鎖発現量と(2)感染したIFVコピー数との(3)相関解析.

8 種の動物細胞から得られた Lac-C12 プライマー由来糖鎖伸長生成物の構造を LC-MS で解析し、21 種類の酸性糖鎖と 16 種類の中性糖鎖が検出された。酸性糖では、主にガングリオシド系糖鎖、中性糖では、グロボ系糖鎖が多く発現していることを確認した。

次に、8 種類の動物細胞に H1N1 亜型 IFV などを感染させ、realtime RT-PCR 法により 4 時間後の IFV のコピー数を測定することで、細胞間の IFV 感染効率を比較した。その結果、H1N1 亜型 IFV では MDCK, A549, HEK293, hCK, Caco-2 細胞は感受性が高く、Vero, HeLa, CHO 細胞は感受性が低いことが示された（Fig. 2）。

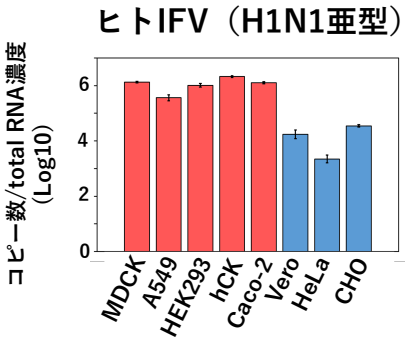


Fig. 2 realtime RT-PCR法により得られた各細胞に感染したIFVコピー数

最後に、各細胞の糖鎖発現量と IFV コピー数についてピアソンの積率相関分析を行い、IFV 感受性と有意に相関性がある糖鎖を探索した。その結果、IFV の受容体として知られている Neu5Ac を末端に含む複数の糖鎖に加えて、硫酸基を有する糖鎖で高い相関性が示された（Table 1）。また、これら以外にも受容体として注目されていなかった糖鎖でも高い相関性が見出された。これらの糖鎖が IFV の感染促進に関与することが示唆された。

Table 1 Lac-C12由来糖鎖発現量とIFVコピー数の相関解析

名称	構造（P：Lac-C12）	ピアソンの相関係数
A17	HSO_3 + P	0.85
A9	NeuAc-Hex-HexNAc-P	0.58
A13	NeuAc + Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-P	0.55
A2	NeuAcα2-6P	0.52
A1	NeuAcα2-3P	0.51
A15	3NeuAc + Hex-HexNAc-P	0.50
A18	HSO_3 + Hex-P	0.49
A6	NeuAc-NeuAc-P	0.25

[1] T. Takahashi, *et al., Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 809-816 (2015).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

オルガネラ選択的ホスファチジルイノシトールラベリング

○木村天海[1]・田村朋則[1,2]・浜地格[1,2]（[1]京大院工、[2]JST ERATO）

Organelle-selective phosphatidylinositol labeling (Graduate School of Engineering and Faculty of Engeinering, Kyoto University[1], JST ERATO[2]) KIMURA, Takami[1]; TAMURA, Tomonori,[1,2], HAMACHI, Itaru[1,2]

ホスファチジルイノシトール（PI）は生体膜を構成するリン脂質の 1 種であり、細胞内シグナル伝達において重要な役割を担っている。例えばイノシトール環上の 4,5 位がリン酸化された PI(4,5)P_2 はセカンドメッセンジャーであるイノシトール-1,4,5-トリスリン酸（IP_3）産生の前駆体になるほか、特定のタンパク質を細胞膜上にリクルートすることが知られている。一方で、PI の代謝や動態については不明な点が多く、生細胞中で選択的に可視化解析する手法の開発が望まれている。

そこで、本研究では当研究室にて近年開発されたオルガネラ選択的脂質ラベリング法を基に、オルガネラ分解能での PI イメージングを可能にする新規蛍光標識法の開発を行っている。具体的には、(1)アジド基を導入したイノシトール（N_3-Ins）の代謝導入後、(2)狙ったオルガネラに局在するよう設計した歪みアルキン試薬（OCR）を用いてアジド化 PI を蛍光修飾する(Fig 1)[1,2]。この戦略により特定のオルガネラ膜内の PI を選択的に標識し、PI のオルガネラ間移行の可視化やオルガネラごとの脂肪酸組成の解析、各オルガネラの PI 代謝の追跡を実現したい。

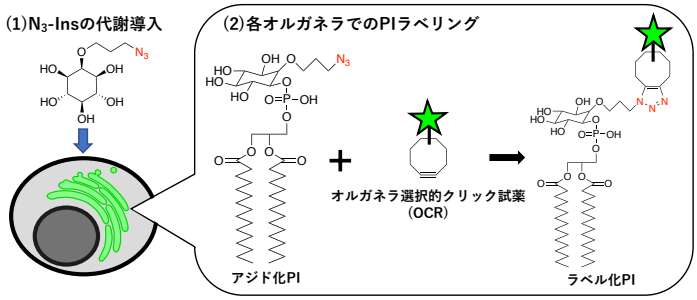


Fig 1. Strategy of this study

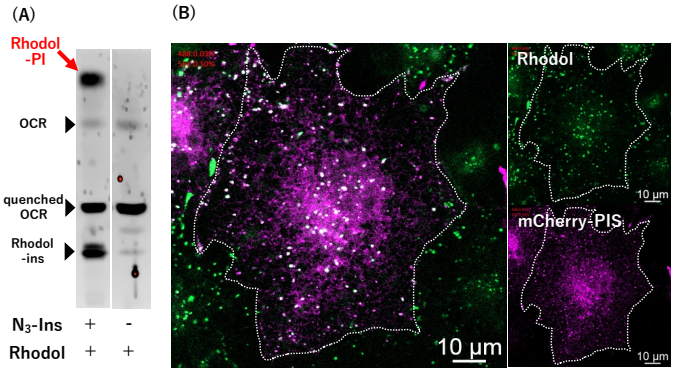


Fig 2. (A)TLC analysis and (B)CLSM images of fluorescence from COS7 cells metabolites treated following procedure. COS7 cells were incubated with 1 mM N_3-Ins for 24 h, and labeled with 100 nM Rhodol-DBCO, ER/Golgi-selective OCR, for 15 min. metabolites were extracted with Bligh & Dyer method and subjected to TLC.

小胞体(ER)/Golgi 選択的 OCR（Rhodol-DBCO）を用いて PI ラベリングを施した COS7 細胞の脂質抽出物を TLC で評価したところ、N_3-Ins 未導入サンプルにはない蛍光スポットが確認された(Fig 2(A))。さらに該当スポットを MS 解析したところ、Rhodol 修飾 PI に帰属できるピークが確認された。また、PI 合成酵素である PIS を強制発現させた COS7 細胞に対し ER/Golgi 選択的 PI ラベリングを施したところ、PIS と Rhodol 由来の蛍光の局在が一致する輝点が多く見られた(Fig 2(B))。本発表ではこれらの詳細の結果に加えて、薬剤刺激に伴う PI 合成量変化の蛍光検出について報告する。

1 T. Tamura *et al*, *Nature Chemical Biology* **2020**, 16, 1361-1367
2 T. J. Ricks *et al*, *ChemBioChem* **2019**, 20, 172-180

単一細胞トランスクリプトーム解析による胃がん CTC の薬剤耐性因子の探索

○叶与詩子[1]・堀川万優子[1]・小泉 史明[2]・下山 達[2]・田中 剛[1]・吉野 知子[1]（[1]東京農工大院工、[2]がん・感染症センター都立駒込病院）

Exploration of drug-resistant factors in gastric circulating tumor cells by single-cell transcriptome analysis

([1]Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Disease Center Komagome Hospital) Kano, Yoshiko[1]; Horikawa, Mayuko[1]; Koizumi, Fumiaki[2]; Shimoyama, Tatsu[2]; Tanaka, Tsuyoshi[1]; Yoshino, Tomoko[1]

胃がんは世界で死亡率第 3 位のがん種であり、診断時 50%以上が進行性胃がんである。進行性胃がんの治療は化学療法が主流であるが、多くの患者が薬剤耐性を獲得し、薬剤の奏効率が低下することが問題である。薬剤耐性の原因となる機構は、細胞増殖能、極性や接着性を失う上皮間葉転換 (EMT) などが研究されているが、その全貌は明らかになっていない。そこで、薬剤耐性獲得のメカニズム解明に向け、がん組織の特徴を反映し、低侵襲に採取可能な血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell : CTC) に着目した。当研究室では、転移性胃がん患者由来 CTC のトランスクリプトーム解析を実施し、EMT 誘導が進んだ CTC が多く存在することを確認している [1)]。そこで、本研究では、薬剤耐性を示す転移性胃がん患者由来 CTC において、EMT に関連する遺伝子群のトランスクリプトームと薬剤耐性との関連を解析し、薬剤耐性に関わる遺伝子の探索を行った。さらに、絞り込んだ遺伝子の過剰発現により、胃がん細胞株における影響を評価した。

胃がん患者から分離した単一 CTC を用いて、EMT 関連因子及び関連経路 (NOTCH 経路)遺伝子を対象としたトランスクリプトーム解析を実施した。また、各患者の治療変更回数で CTC を分類し、薬剤耐性との関連を評価した。その結果、3 つのクラスター (Cluster A : 株化細胞、Cluster B、C : CTCs)に分類された (Fig. 1)。Cluster B は、治療変更回数の多い患者由来の CTC が多く、薬剤耐性を獲得した CTC の存在が示唆された。Cluster B で特に発現がみられた *NOTCH2NL* (*N2NL*)は、脳において NOTCH2 へ作用し NOTCH シグナルを増強することが報告されているヒト特異的な遺伝子であるが、知見は極めて乏しい。そこで、胃がん細胞株 MKN45 に *N2NL* を強発現させ、増殖能及び 5-フルオロウラシル （5-FU）への耐性を評価することで *N2NL* の機能解析を行った。その結果、野生型の MKN45 (MKN45-WT)、及びコントロールベクターを導入した形質転換体 (MKN45-EV)と比較して、*N2NL* 遺伝子を導入した形質転換体株 (MKN45-N2NL)での増殖能の上昇が示された (Fig. 2)。また、MKN45-WT 及び MKN45-EV と比較して MKN45-N2NL の 5-FU 耐性の向上が示された。以上の結果から、胃がん細胞株における N2NL の高発現は、NOTCH シグナルを増強し、薬剤耐性獲得につながることが示唆された。

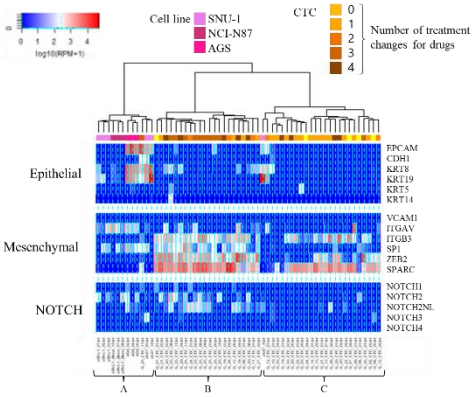


Fig. 1 Heatmap of gene expression associated with EMT in single gastric cancer cells.

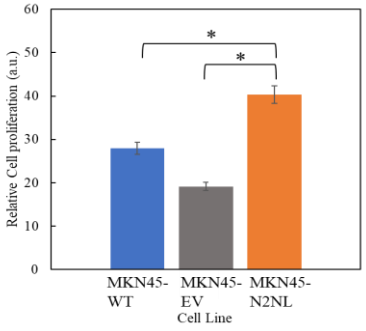


Fig. 2 Proliferation rate of MKN45-WT, MKN45-EV, and MKN45-N2NL for 120 h.

1) Negishi et al., *Commun Biol.* Jan 11;5(1):20. (2022)

磁気微粒子の形態制御に向けた磁性細菌固有の遺伝子群の異種発現

○三浦知優[1]・篠原奈々美[1]・松永是[1,2]・新垣篤史[1]（[1]東農工大院工、[2]JAMSTEC）

Heterogeneous expression of unique genes in magnetotactic bacteria toward morphological control of magnetic nanoparticles (Tokyo University of Agriculture and Technology[1], JAMSTEC[2]) MIURA, Chihiro[1]; SHINOHARA, Nanami[1]; MATSUNAGA, Tadashi[1,2]; ARAKAKI, Atsushi[1]

磁性細菌は、環境中の鉄イオンを取り込み、細胞内に直径約 40 nm のマグネタイト (FeO_3)から成る磁気微粒子を合成する水圏微生物である。穏和な条件下でサイズや形態の制御された磁気微粒子を合成することから、産業利用に向けた応用が期待されている。特にロッド状の磁気微粒子は形状磁気異方性により高保磁力であり、有用な磁性材料として注目されている。磁性細菌 *Desulfovibrio magneticus* RS-1 株は、ロッド状の磁気微粒子を合成することから、その磁気微粒子合成機構に関心が集まっている。しかし、RS-1 株における遺伝子組換え技術は未確立であり、ロッド状磁気微粒子の形態制御機構は未解明である。この解明に向けて、これまでに RS-1 株において、磁気微粒子合成に関連する磁性細菌に共通の遺伝子群の発現用ベクター (26.5 kb)の構築を行った。

本研究では、同ベクターをモデル磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 株に同ベクターを導入し、RS-1 株由来の磁気微粒子合成に関連する遺伝子群を異種発現させることで、これらが磁気微粒子の形態に与える影響を評価することを目的とした (Fig.)。獲得した形質転換株において、RS-1 株由来の磁気微粒子合成に関連する遺伝子群の異種発現を確認した。磁気微粒子合成能を完全に失った AMB-1 遺伝子欠損株に同遺伝子群を異種発現させた形質転換株において、磁気微粒子合成能の回復は認められなかった。しかし、この株の培養液中に鉄を含む細胞外沈殿の形成が確認された。これは、導入遺伝子上に存在する推定鉄酸化酵素及び鉄トランスポーターをコードする遺伝子の機能によるものと考えられた。一方、AMB-1 野生株に同遺伝子群を導入した形質転換株では、野生株と比較して磁気微粒子数は約 1.7 倍、粒径は約 1.4 倍に増加していることが確認された。この結果より、AMB-1 株が有する磁気微粒子合成関連タンパク質に加え、導入遺伝子群に存在する結晶形成関連タンパク質が発現することで、粒子数及び粒径に影響したことが考えられた。本結果は、異種磁性細菌由来の磁気微粒子合成に関与する遺伝子群を導入し、その発現が表現型に影響を与えることを示した初の例である。

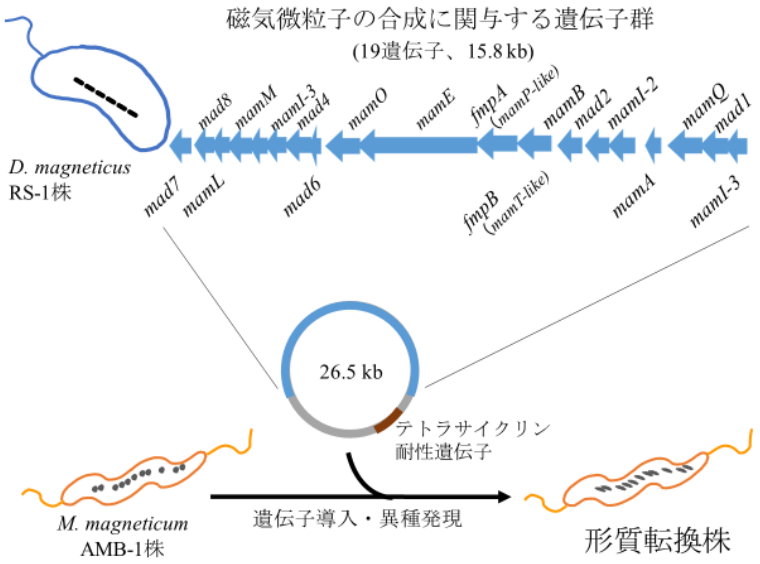


Fig. *D. magneticus* RS-1 株に由来する磁気微粒子合成関連遺伝子群の異種発現のストラテジー

環境汚染物質分解を目指した擬似基質添加 P450 発現細菌による菌体内反応

○伊藤史哉・有安真也・唐澤昌之・愛場雄一郎・荘司長三（名大院理）

Whole-Cell Biocatalysts Harboring P450 Enzymes Triggered by Decoy Molecules for Microbial Degradation of Environmental Pollutants (Graduate School of Science, Nagoya University) ITO, Fumiya; ARIYASU, Shinya; KARASAWA, Masayuki; AIBA, Yuichiro; SHOJI, Osami

環境汚染、特に土壌汚染の浄化手法には主に汚染土壌を取り除き清浄な土壌を埋め戻す掘削除去といった物理的手法が用いられている。一方で近年、低コストかつ省エネルギーな手法として微生物の浄化能を利用するバイオレメディエーションが注目を集めており、中でも汚染環境外で培養した有用微生物を投入し汚染物質を分解するバイオオーグメンテーション（Fig. 1）は、多環芳香族炭化水素やダイオキシンといった難分解性物質を迅速に浄化できる可能性が期待されている。しかしながら、生態系への影響評価が困難なため、現状では直ちに利用可能な菌株が限られている。

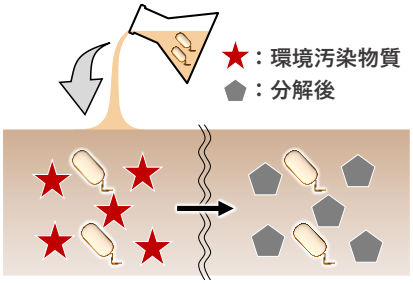


Fig. 1 バイオオーグメンテーション.

当研究室では生物界に広く分布するシトクロム P450 を対象とした研究を行ってきた。*Priestia megaterium* (*Bacillus megaterium*)由来の長鎖脂肪酸水酸化酵素 P450BM3 (CYP102A1)に対し、鎖長が短く反応しない偽物の基質を用いて酵素内に小さな反応空間を構築することで小分子の反応が可能となるという発想に基づき、擬似基質（デコイ分子）による「基質誤認識システム」を開発した[1]。酵素を誤作動させる本システムによりベンゼンなどの非天然基質水酸化が可能となった。また、*P. megaterium* そのものにデコイ分子を添加した場合においてもベンゼン等の水酸化が可能となることを明らかとしたことで[2]、デコイ分子を用いた環境汚染物質の微生物分解手法への道が拓かれた。ただし、上記の菌体内反応を達成した菌株は *P. megaterium* と遺伝子操作された大腸菌のみであり、バイオオーグメンテーション手法として幅広い環境へ適用するためには菌株の拡充が必要である。そこで本研究では P450 酵素を天然にて発現する多様な菌種へ本菌体内反応を展開することを目指した。

P450BM3 の近縁酵素を保有する 11 種の細菌をデコイ分子存在下におけるベンゼン水酸化反応の可否でスクリーニングしたところ、4 種の細菌が陽性を示し、中でも *Bacillus subtilis* ATCC 6051 が最高活性を示した（Fig. 2）。この菌種は P450BM3 近縁酵素を 2 つ有しており、各酵素をノックアウトした菌株の反応性を検証することで、CYP102A3 が水酸化反応を担っていることが示唆された。土壌に遍在し、モデル生物として広く研究されてきた *B. subtilis* による汚染物質変換が達成されたことで、生態系への影響を最小限に抑えた浄化手法につながることが期待される。

Screened species	CYP102
Bacillus subtilis	**A2, A3**
Bacillus cereus	A5
Bacillus licheniformis	A7
Bacillus thuringiensis	A8
Rhodopseudomonas palustris	A12, A13
Bacillus pumilus	A15
Rhodococcus erythropolis	C2
Azorhizobium caulinodans	K1
Streptomyces avermitilis	B2, D1
Actinosynnema pretiosum	F1
Saccharopolyspora erythraea	G2

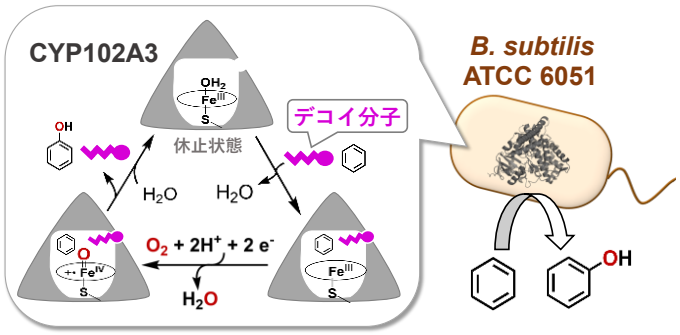


Fig. 2 用いた菌種および発現酵素（左）と *B. subtilis* ATCC 6051 によるベンゼン水酸化反応（右）.

1) O. Shoji *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6606–6610.　2) JP2020-092674A

パーフルオロカーボンを内包した弾性ナノ粒子型 ^{19}F MRI 造影剤の開発

○小西祐輝[1)]、杉原文徳[2、3)]、蓑島維文[1)]、菊地和也[1、2、5)]（[1)] 阪大院工、[2)] 阪大 IFReC、[3)] 阪大微研）

Development of perfluorocarbon-encapslated elastic nanoparticles for ^{19}F MRI contrast agents (Graduate School of Engineering[1], Immunology Frontier Research Center[2], Research Institute for Microbial Diseases[3], Osaka University) KONISHI Yuki[1]; SUGIHARA Fuminori[2, 3]; MINOSHIMA Masafumi[1]; KIKUCHI Kazuya[1, 2, 5]

MRI は核磁気共鳴現象を利用した画像化法で生体深部を非侵襲的に画像化することができる。中でも ^{19}F MRI は高感度の NMR 測定が可能で、生体内にほとんど存在しない ^{19}F を観測核種としている。そのため、水や脂肪などの生体分子由来のシグナルの影響を受けず、^{19}F MRI 造影剤の局在をイメージングすることができる。我々はこれまでに ^{19}F MRI 造影剤としてパーフルオロカーボン内包シリカナノ粒子を開発してきた[1]。このシリカナノ粒子は生体内でも高い感度を示し、その局在を ^{19}F MRI によって検出することが可能である。しかし、シリカナノ粒子をマウスに投与すると、目的組織ではない肝臓や脾臓から ^{19}F MRI シグナルが 2 週間以上にわたって観察され、ナノ粒子が体内に蓄積していると考えられた。長期間の蓄積は慢性的な炎症や発がんなどの副作用を引き起こす危険性がある。近年、ポリマーソームやナノゲルなどソフトなナノ粒子はがん組織での透過性が高いことが報告されており[2]、他の組織においても組織透過性が高いことが期待される。そこで本研究では、長期間の蓄積を抑制するため、シリカではなくソフトな材料であるポリマーで表面を被覆したナノ粒子（ポリマーナノ粒子）型 ^{19}F MRI 造影剤の開発を行った。

パーフルオロカーボンである PFCE を内包したミセルを作製し、その表面をポリアクリル酸で被覆した。作製した粒子のサイズは 160 nm 程度だった。^{19}F NMR を用い、溶液状態の PFCE と粒子に内包された PFCE の横緩和時間（T_2）を比較した。その結果、粒子内の PFCE は流動性を保持していることが分かった。また、高速 AFM（Atomic Force Microscopy）を用いた測定の結果、ポリマーナノ粒子は柔らかく、弾性を有していることが分かった。

今回開発したポリマーナノ粒子と従来のシリカナノ粒子の肝臓への蓄積量を同一個体のマウスで比較するためにマルチカラー^{19}F MRI[3]を行った。ポリマーナノ粒子由来のシグナルを赤色、シリカナノ粒子由来のシグナルを青色でそれぞれ示した（左図）。肝臓におけるシリカナノ粒子の蓄積量は投与後 2 週間でもほとんど変化が見られなかった。一方、ポリマーナノ粒子では投与後 2 週間で、肝臓からのシグナル強度が 8%程度まで減少した（右図）。これにより、ナノ粒子型造影剤における体内への長期間にわたる蓄積を抑制することができた。

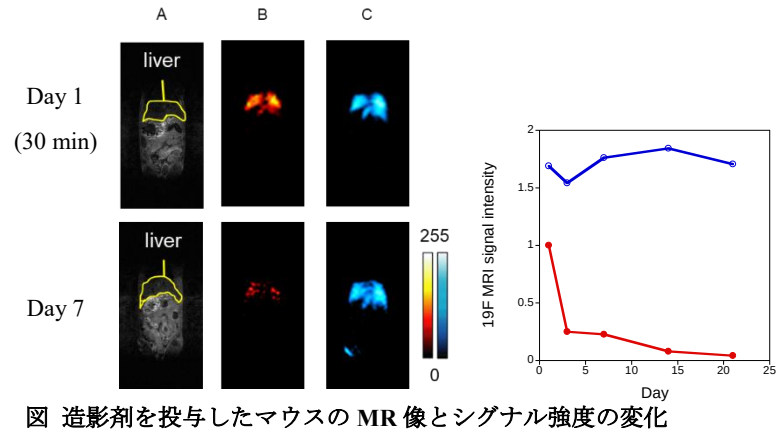


図 造影剤を投与したマウスの MR 像とシグナル強度の変化
A: ^{1}H MRI, B: ^{19}F MRI (ポリマーナノ粒子), C: ^{19}F MRI (シリカナノ粒子)
赤: ポリマーナノ粒子、青: シリカナノ粒子

【参考文献】[1] H. Matsushita *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed*. **2014**, *53*, 1008. [2] Y. Hui *et al*, *ACS Nano.*, **2018**, *12*, 2846. [3] K. Akazawa *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 16742.

経皮マラリアワクチンの創製及び免疫応答能の解析

○田中 敬佑[1]・南畑 孝介[2]・若林 里衣[2]・神谷 典穂[2,4]・後藤 雅宏[2,3,4]（[1]九大院工、[2]九大院工学研究院、[3] 次世代経皮吸収研究センター、[4]未来化学創造センター）

Creation of transdermal malaria vaccine and analysis of immune response (Kyushu University Graduate School of Engineering[1] , Graduate School of Engineering, Kyushu University[2], Next Generation Transdermal Absorption Research Center[3] , Center for Future Chemistry and Innovation[4]) Keisuke, Tanaka[1]; Kosuke , Minamihata[2] ; Rie , Wakabayashi[2,3] ; Noriho , Kamiya[2,4] ; Masahiro , Goto[2,3,4]

1. 緒言

マラリアは、マラリア原虫がハマダラカによって媒介され、吸血時にヒト体内へ侵入し、肝細胞および赤血球を破壊しながら増殖することで、貧血や、腎不全などを引き起こす感染症である。マラリアワクチンが必要とされる地域の多くでは医療体制が不十分であり、注射を行う医療従事者の不足や、注射によって生じる皮膚の損傷が新たな感染症の原因になるといった問題点が存在する。

本研究では、非侵襲的かつ簡便な、「塗るマラリアワクチン」の開発を目的とした。皮膚を介して抗原を体内に送達する戦略として Solid-in-oil (S/O) 化技術を選択した 。この技術は親水性分子を疎水性界面活性剤で被覆することで油中分散させる技術であり、皮膚に馴染みやすい油中へ分散させることで良好な皮膚浸透性が期待できる。本発表では、マラリア抗原である Pvs25 を内包した S/O 製剤の抗体産生能及びその免疫応答解析について報告する。

2. 実験

Pvs25 水溶液を L-195/cyclohexane 溶液へ加え、ホモジナイザーで高速撹拌することで W/O エマルションを形成させ、凍結乾燥を行った。凍結乾燥後の Pvs25/L-195 複合体を Isopropyl myristate 中に分散させ、Pvs25 を内包した S/O 製剤を調製した。BALB/c マウスの背部を除毛し、調製した S/O 製剤を添加したパッチを 24 h 貼付し、経皮投与を行った。投与から経時的に採血を行い、ELISA 法によって血清中に含まれる Pvs25 に対する IgG の定量を行った。また、別途経皮投与及び皮下注射をした群の皮膚を採取し、皮膚内の免疫細胞の挙動をフローサイトメトリーによって解析した。

3. 結果および考察

Fig.1 へ免疫化後のマウス血清中における抗体価 (Total IgG) 測定結果を、**Fig.2** へ皮膚中の免疫細胞の解析結果を示す。Injection 群では共に 18 日目以降の抗体価の減衰が確認された一方で、S/O 製剤では 46 日目まで抗体価が上昇するという現象が見られた。さらに両群とも、抗体価が維持された。この事から、S/O 製剤はアジュバントを使用した注射製剤と同等の免疫応答を誘導することが示唆された。

Fig.2 に皮膚組織中の活性化した樹状細胞 (DC) に対するフローサイトメトリーの結果を示す。ここでは免疫細胞の中で、CD80 という活性化マーカー分子を多く発現している DC の割合を表している。注射製剤と比較して、S/O 製剤を投与した群では優位に活性化状態にある DC の増加が確認された。 この結果より、S/O 化したマラリアワクチンは、皮膚内へ送達され、DC を強く活性化可能な製剤であることが示唆される。これらの結果から、Pvs25 を S/O 化することで、経皮マラリアワクチンとして利用できる可能性が示唆された。

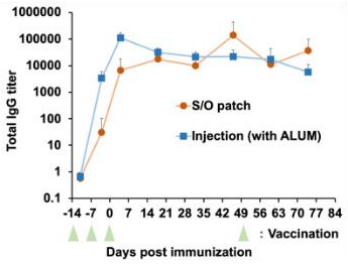


Fig.1 IgG 抗体価の測定結果

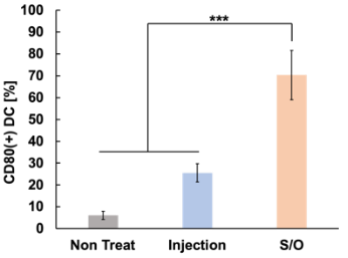


Fig.2 CD80 陽性免疫細胞の割合

新規イオン液体ナノ粒子製剤の開発と核酸医薬の経皮デリバリー

○豊福淳大[1]・若林里衣[1]・神谷典穂[1]・後藤雅宏[1]（[1]九大院工）

Development of novel ionic liquid nanoparticle formulations and transdermal delivery of nucleic acid drugs

(Graduate School of Engineering, Kyushu University[1]) TOYOFUKU, Kiyohiro[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; KAMIYA, Noriho[1]; GOTO, Masahiro[1]

核酸医薬はヌクレオチドから構成される医薬品であり、副作用を低減し得る新たな分子標的薬である。各投与経路の中でも、皮膚は最大面積を有し低侵襲的に薬物を適用するために有用な器官である。しかし、表皮最外層に位置する角層が高い疎水性とバリア機能を有しているため、親水性かつ高分子量の核酸分子の皮内移行性は極めて低い。さらに核酸は生体内の酵素で分解を受けやすく、また負に帯電した細胞膜を透過し難いため、作用部位である細胞質まで核酸を経皮送達するには DDS キャリアが不可欠である。近年、脂質ナノ粒子 (LNP) による核酸デリバリーが盛んに行われている[1)]。LNP は、脂質のエタノール溶液を水で希釈し溶解度を下げる「エタノール希釈法」により形成され、細胞内送達には有利なものの、水溶液中に分散しているため経皮送達のキャリアとしては適さない。そこで本研究では、経皮浸透促進効果を有するイオン液体 (IL)[2)]を用い LNP を形成した後、凍結乾燥により溶媒を除去してから油中分散させるという手法により、経皮核酸製剤「IL ナノ粒子」の開発を行った。

カチオン性リン脂質とアニオン性脂肪酸を反応させ、イオン交換により IL を合成した。この IL をエタノールに溶解させたものに、アンチセンス医薬 Trabedersen (ssDNA) の水溶液を加え素早く撹拌することで自発的に IL-核酸複合体を形成させた。この複合体を凍結乾燥し油状基剤 (Isopropyl myristate, IPM) に分散させたところ、透明な溶液が得られ、動的光散乱 (DLS) 及び TEM 観察により約 160nm の球状集合体の形成が確認された (**Fig. 2**)。

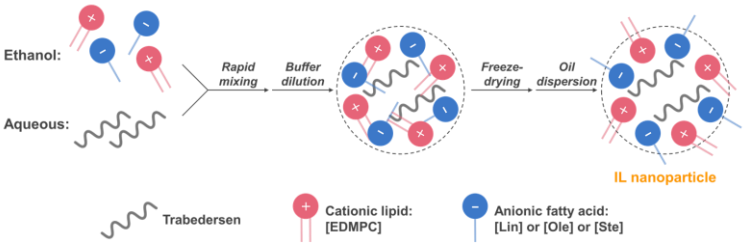


Fig. 1 Schematic illustration of IL nanoparticle preparation

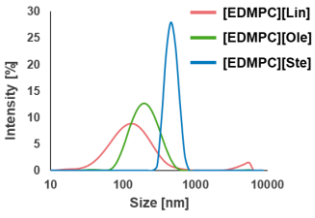


Fig. 2 Diameter of IL nanoparticle

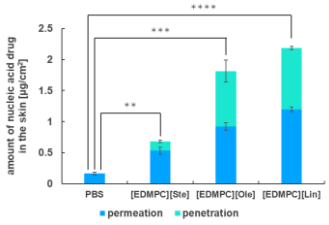


Fig. 3 Skin permeation of nucleic acid n = 3, mean ± SD, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

次に、フランツセルを用いて IL ナノ粒子のマウス皮膚への皮膚浸透性を定量評価したところ、水溶液と比較して有意に浸透量が向上したことが示唆された (**Fig. 3**)。これは、IPM や IL により角層脂質構造が擾乱されたためであると考えられる[3)]。また、TAMRA 標識核酸と NBD 標識リン脂質を用いて IL ナノ粒子を調製し、浸透後のマウス皮膚断面を CLSM で観察したところ、IL と核酸が複合体を形成した状態で角層を透過していることが示唆された。さらに、蛍光標識核酸を封入した IL ナノ粒子を B16 melanoma 細胞に添加し、Flow cytometry により核酸の細胞内送達性を定量評価したところ、核酸の細胞内送達試薬として汎用されている Oligofectamine を上回る細胞内取り込みが確認された。これは、カチオン性リン脂質と細胞膜表面との静電相互作用に起因すると考えられる。

1) X. Hou, T. Zaks, R. Langer *et al.*, *Nat. Rev. Mater.*, **6**, 1078–1094 (2021)
2) S. Uddin *et al.*, *Chem. Commun.*, **56**, 13756-13759 (2020)
3) A. Akinshina *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18**, 17446-17460 (2016)

VHH 抗体融合両親媒性蛋白質 OLE-ZIP の蛋白質調製と蛋白質カプセルの形成評価

○高橋孝介・西山泰貴・水野稔久*（名工大院工）

Preparation of the fusion protein of VHH antibody and amphiphilic OLE-ZIP and evaluation of its capsule formation property (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) TAKAHASHI, Kousuke ; NISHIYAMA, Taiki ; MIZUNO, Toshihisa

[緒言] ヒマワリの種子に存在する両親媒性蛋白質「オレオシン」は、疎水部ペプチド内部で折れ曲がり、両端にある親水部ペプチドが近づくことで、両親媒性が発揮されると推定されている。これまでの我々の検討から、この親水部をヘテロ二量体型コイルドコイルに置き換え、更に疎水部配列と長さを最適化した変異体「OLE-ZIP」へと redesign することで、リポソーム様の「蛋白質のみからなる二分子膜カプセル」が安定に形成できることを明らかとし、そのカプセル内孔へのゲスト蛋白質の高効率な内包化にも成功している(Fig. 1)[1]。さらに、OLE-ZIP の N 末端側に、IgG 抗体との親和性を持つ抗体結合蛋白質「Protein G」を融合した「ProG-OLE-ZIP」をカプセル作製のモノマー蛋白質として混合し、さらにカプセル表面を抗体修飾したところ、抗体と親和性の高い受容体を持った細胞内への取り込み誘導が可能となることも明らかとしている。しかし、実際に血中投与して利用する場面を想定した時に、蛋白質カプセル表面と抗体分子との結合が可逆的であるがために、血液中に多量に存在する別の抗体分子と入れ替わり、細胞標的能を失ってしまうことが危惧された。そこで本報告では、OLE-ZIP の N 末端側に、1 本鎖抗体として知られているラクダ抗体 VHH を融合した「VHH-OLE-ZIP」を設計し(Fig. 2)、こちらの発現精製と、エマルジョン法によってカプセル形成が可能か評価を行った。

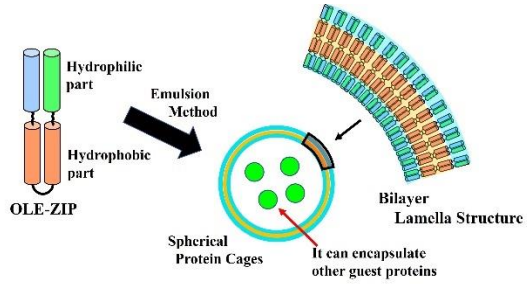


Fig. 1 Schematic illustrations of the amphiphilic bundled protein, OLE-ZIP, and the protein cages prepared from it. The OLE-ZIP protein cages can stably encapsulate guest proteins at the inside thereof.

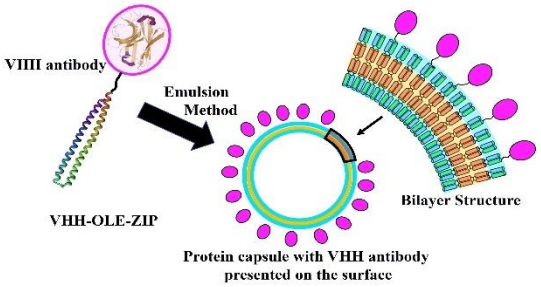


Fig. 2 Schematic diagram of an amphiphilic protein consisting of a single-chain antibody, VHH, fused to the N-terminal side of OLE-ZIP, and protein capsules from it.

[結果・考察] VHH-OLE-ZIP の発現プラスミドは、pET-21d(+)ベクターのマルチクローニングサイトへの遺伝子導入により構築し、大腸菌発現系にて生産した。そちらを精製したものを内水相前駆体溶液に溶解し、エマルジョン法にて作製を行った。DLS 測定からは、50~200 nm 程度の粒径のピークが観測され、さらに TEM による形態評価からは、100 nm 程度の二分子膜のシェルをもったカプセル形態も観察された(Fig. 3)。以上のことから、1 本鎖抗体である VHH を N-末端側に導入したとしても、OLE-ZIP はカプセル形成能を維持できることが明らかとなった。現在は蛋白質カプセルの熱安定性について評価を行っている。

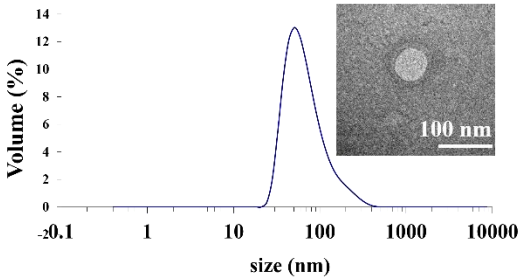


Fig. 3 DLS and TEM observations of the VHH-OLE-ZIP capsules prepared by emulsion method.

1) *Colloid and Interf. Sci. Commun.* **40**, 100352 (2021).

疎水性相互作用を介したエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの創製

○平原未海・坂本健太郎・古川寛人・稲葉央・松浦和則（鳥取大院工）

Creation of an enveloped artificial viral capsid through hydrophobic interaction (Graduate School of Engineering, Tottori University) HIRAHARA, Miu; SAKAMOTO, Kentarou; FURUKAWA, Hiroto; INABA, Hiroshi; MATSUURA, Kazunori

ウイルスは、宿主細胞内で自己増殖することができる感染性のある超分子集合体であり、自身のゲノム核酸の周りをキャプシドタンパク質に被覆されたヌクレオキャプシド構造を有する。また、インフルエンザウイルスのようなエンベロープ型ウイルスは、ヌクレオキャプシド構造が脂質二分子膜で覆われた構造を有している。近年、自己集合性タンパク質・ペプチドを人工的に設計することで、ウイルス類似ナノカプセル構造を構築することが可能となってきている。これまで当研究室では、トマトブッシースタントウイルス由来の 24 残基β-Annulus ペプチドが水中で自己集合することにより、直径 30~50 nm の人工ウイルスキャプシドを創製してきた[1]。また、表面がアニオン性の人工ウイルスキャプシドをカチオン性脂質二分子膜と複合化することにより、静電相互作用によるエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの構築に成功している[2]。本研究では、キャプシド外部表面に配向するβ-Annulus ペプチドの C 末端側にジスルフィド結合を介して長鎖アルキル基を導入し、疎水性相互作用を介して脂質と複合化することで、エンベロープ型人工ウイルスキャプシドを創製した(Fig.1)。

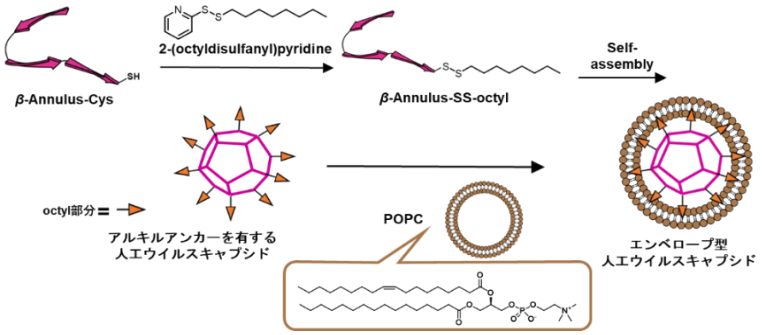


Fig.1 疎水性相互作用によるエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの創製

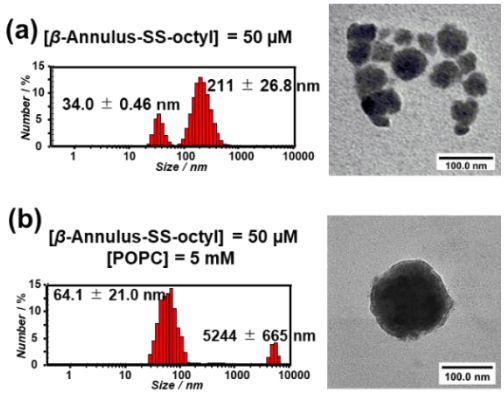


Fig.2 (a) β-Annulus-SS-octyl からなる人工ウイルスキャプシド及び(b) POPC 複合化人工ウイルスキャプシドの DLS 粒径分布及び TEM 像

10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 5%DMSO)中でのβ-Annulus-SS-octyl ペプチドの自己集合により、60~80 nm 程度の球状集合体が凝集した構造が確認された(Fig.2a)。これは、外側に配向したアルキル鎖同士の疎水性相互作用のために凝集したと考えられる。次に、octyl 鎖を表面に有するキャプシドと両性イオン脂質 POPC を水和法により複合化(peptide : POPC = 1 : 100)したところ、凝集成分がほぼ消失し、50~100 nm 程度の球状集合体が DLS 測定と TEM 観察において確認された (Fig.2b)。また、蛍光脂質を含む脂質二分子膜と蛍光標識したペプチドを用いた FRET 測定からも複合化に成功したことが示唆された。現在、β-Annulus-SS-octyl ペプチドの膜へのアンカリングを利用して、リポソームから「出芽」するエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの構築を検討している。

1) K. Matsuura, *Chem. Commun*. (Feature Article), **54**, 8944 (2018)
2) H. Furukawa, H. Inaba, F. Inoue, Y. Sasaki, K. Akiyoshi and K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **56**, 7092 (2020)

RaPID システムを用いたライブラリ vs.ライブラリセレクション系の構築

○大野湧仁[1]・Alexander Vinogradov[1]・菅裕明[1]（[1]東大院理）

Development of RaPID system-based library vs. library selection (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1]) OHNO, Yuto[1]; VINOGRADOV, Alexander[1]; SUGA, Hiroaki[1]

非天然アミノ酸の導入が可能で 10^{12} の多様性を示すペプチド探索プラットフォーム RaPID システムは、タンパク質に対するリガンドの創出[1]や、自己修飾ペプチドの創出[2]を可能としてきた。RaPID システムは活性のあるペプチドを取得することに成功しているものの、活性のあるペプチドの組み合わせを取得することはできない。しかし、ペプチドの組み合わせを最適化することは重要である。例えば、相互作用するタンパク質同士の接触面[3]や、酵素活性部位と基質ペプチド配列間[4]で共進化がみられ、相互的にアミノ酸配列が最適化している。非天然アミノ酸の導入が可能で、高い多様性を示すRaPIDシステムを用いることで、幅広い機能性ペプチドの組み合わせを確実に取得することができるのではないかと考えた。そこで本研究では、RaPID システムを用いたライブラリ vs.ライブラリセレクション系を構築した。

系の検証として、ペプチド間相互作用を起こす E3, K3 ペプチド[5]にそれぞれシステイン、クロロアセトアミドを導入してチオエーテルを形成させ、ペプチド共役体の選択的回収を試みた。E3, K3 ペプチドをコードする DNA を別々に転写、翻訳、逆転写した後に(Fig.1 ①–③)、それらを混合しペプチド間でチオエーテルを形成させた(Fig.1 ④)。その後、E3, K3 それぞれに持たせた HA タグ、 ビオチンの二段階で精製することで反応生成物を回収した(Fig.1 ⑤)。最後にそれぞれのライブラリに固有なプライマーを用いて PCR することでそれぞれの DNA を分離、定量した(Fig.1 ⑥)。その結果、近接効果でチオエーテル形成が加速する E3, K3 ペプチドを用いたときに、それらのスクランブル配列を用いたときと比べ顕著に高い DNA 回収率を示した。これによりペプチド共役体の選択的回収を達成した。

本研究で構築した RaPID システムを用いたライブラリ vs.ライブラリセレクション系は新規の相互作用するペプチドペアや、ペプチドタグ・プローブペアの開発に応用できると期待される。

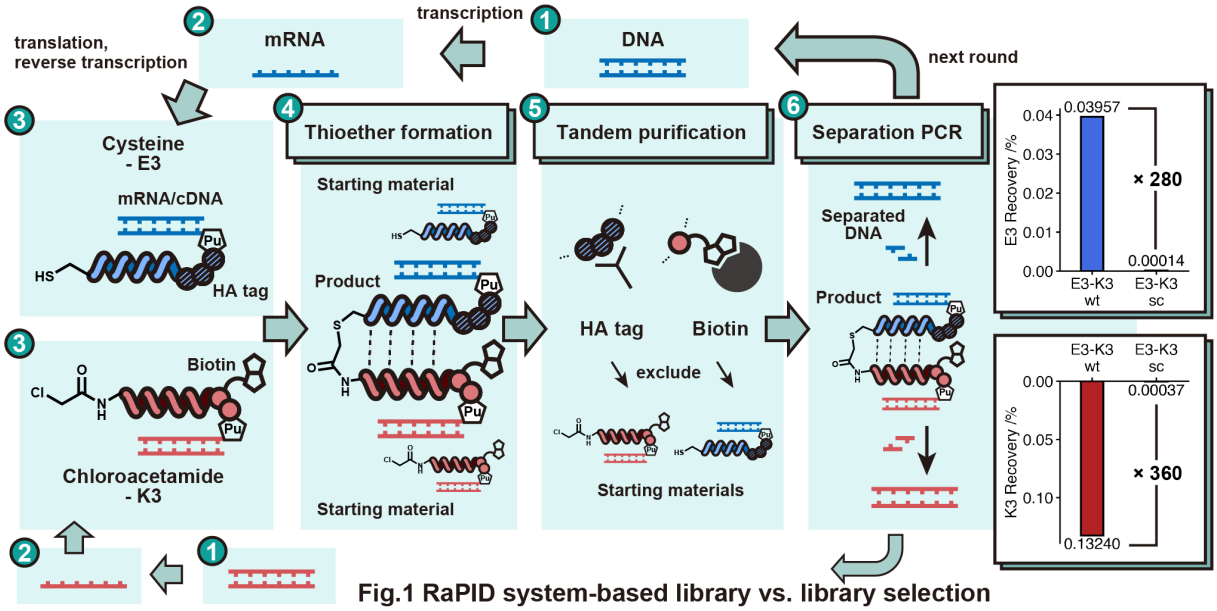


Fig.1 RaPID system-based library vs. library selection

[1] *Chem.Commun.* **53**, 1931 (2017); [2] *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 4741 (2021); [3] *Science* **365**, 185 (2019); [4] *BMC Evol. Biol.* **13**, 231 (2013); [5] *J. Biol. Chem.* **277**, 37272 (2002).

スピロピラン修飾 Tau 由来ペプチドによる微小管安定化の光制御

○阪口みなも[1]・稲葉央[1]・Arif Md. Rashedul Kabir[2]・角五彰[2]・佐田和己[2]・松浦和則[1]（[1]鳥取大院工、[2]北大院理）

Optical control of microtubule stabilization by spiropyran-modified Tau-derived peptides (Graduate School of Engineering, Tottori University[1], Graduate School of Science, Hokkaido University[2]) SAKAGUCHI, Minamo[1]; INABA, Hiroshi[1]; KABIR, Arif Md. Rashedul[2]; KAKUGO, Akira[2]; SADA, Kazuki[2]; MATSUURA, Kazunori[1]

細胞骨格の一種である微小管はチューブリンからなる中空構造体であり、細胞分化や形態、極性などの細胞機能に重要な役割を果たしている。抗がん剤の一種である Taxol は微小管内部のポケットに結合することで微小管を安定化し、がん細胞の分裂を抑制する。しかし、Taxol は構造が複雑であり化学合成による供給が難しいことや、水溶性が低いという問題点がある。当研究室では、微小管関連タンパク質 Tau を基に、微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド TP を開発した[1)]。さらに、より強く微小管に結合する環状 TP を開発し、その結合により微小管を安定化することに成功している[2)]。このことから、TP のチューブリンへの結合を外部刺激により可逆的に変化できれば、微小管の安定性や構造を制御できると考えられる。光異性化分子であるスピロピラン (SP)は UV 光照射によりメロシアニン (MC)に異性化し、可視光照射により SP に戻る。この 2 つは分子構造と極性が大きく異なることから、ペプチドやタンパク質に組み込むことでその構造を光制御することができる[3)]。したがって、SP を TP に組み込むことで、微小管への結合や構造を可逆的に光制御する新たな手法になると期待できる。本研究では、SP を異なる位置に修飾した TP を構築し、光異性化により微小管構造を光制御することを目指した(Fig. 1)。

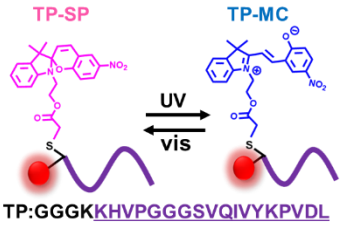


Fig. 1. TP-SP, TP-MC の光異性化

まず、TP の異なる位置に Cys を導入した C-TP (N 末端に Cys), V13C-TP, V16C-TP, Y17C-TP を Fmoc 固相法により合成し、N 末端に赤色蛍光色素を導入した。次に各ペプチドの Cys に SP を修飾した TP-SP を合成し、逆相 HPLC による精製、MALDI-TOF-MS による同定を行った。UV 光照射による TP-SP の MC 体 (TP-MC)への異性化および可視光照射による TP-SP への異性化を UV-vis 測定により確認した。共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM)により、これらペプチドの微小管への結合を確認した。次に、一般的に不安定な微小管を形成する GTP を用いた微小管への影響を評価したところ、C-TP-SP, V16C-MC, Y17C-MC を複合化させた場合は Taxol と同様に長く安定な微小管を形成し、それ以外のペプチドを複合化させた場合は、凝集または短く不安定な微小管を形成することが明らかとなった (Fig. 2)。したがって、SP-TP/SP-MC の光異性化により微小管の安定性を制御することに成功した。

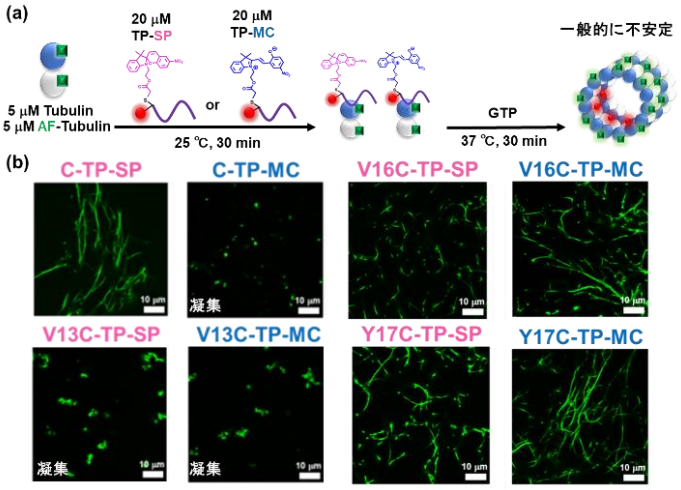


Fig. 2. (a) TP-SP および TP-MC を複合化した GTP 結合型微小管の構築スキームおよび (b) CLSM 像

1) H. Inaba, T. Yamamoto, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Chem. Eur. J.*, **24**, 14958 (2018)
2) H. Inaba, M. Nagata, K. J. Miyake, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Polm. J.*, **52**, 1143 (2020)
3) R. Klajn, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 148 (2014)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

ギャップジャンクション形成膜タンパク質を搭載したウイルスレプリカを用いたリポソーム・細胞への分子輸送

○古川寛人[1]・稲葉央[1]・佐々木善浩[2]・秋吉一成[2]・松浦和則[1]（[1]鳥取大院工、[2]京大院工）

Molecular transport from viral replica embedded with gap junction-forming membrane proteins into liposomes and cells (Graduate School of Engineering, Tottori University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2]) FURUKAWA, Hiroto[1]; INABA, Hiroshi[1]; SASAKI, Yoshihiro[2]; AKIYOSHI, Kazunari[2]; MATSUURA, Kazunori[1]

コロナウイルスやインフルエンザウイルスなどのエンベロープ型ウイルスは、ゲノム核酸がタンパク質集合体であるキャプシドに内包された構造（ヌクレオキャプシド）を脂質二分子膜のエンベロープが覆ったナノ複合体であり、その表面に宿主細胞への感染及び出芽に関与する機能性膜タンパク質を搭載している。最近我々は、キャプシドの外側に配向するC末端側にGluを付与したβ-Annulusペプチドの自己集合からなるアニオン性人工ウイルスキャプシドとカチオン性脂質二分子膜との複合化により、エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの構築に成功している[1]。本研究では、無細胞タンパク質発現により膜タンパク質コネキシン(Cx43)を搭載させたエンベロープ型ウイルスレプリカを構築し、Cx43 間のギャップジャンクション構造を介した Cx43 発現ジャイアントリポソーム(GUV)や細胞内への物質輸送を検討した(Fig. 1)[2]。

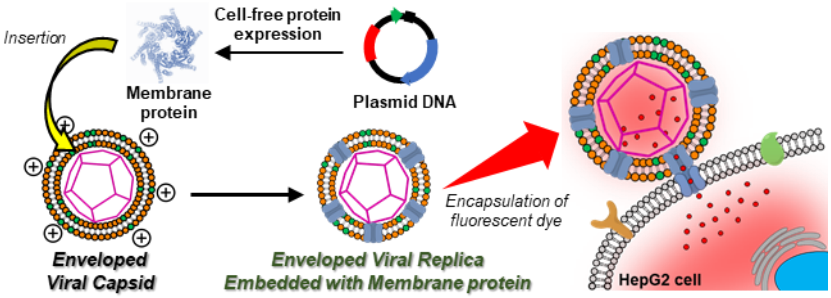


Figure 1. Schematic illustration of construction of enveloped viral replica embedded with Connexin-43 and transport of fluorescent dye into HepG2 cell.

エンベロープ型キャプシド存在下で、Cx43-pDNA を用いた無細胞タンパク質発現により、Cx43 搭載ウイルスレプリカを構築した。次に、蛍光色素 TMR を内包した Cx43 搭載ウイルスレプリカを作製し、Cx43 発現 GUV 及び HepG2 細胞への分子輸送を CLSM 観察により評価した。その結果、Cx43 搭載ウイルスレプリカを用いた場合は GUV 及び細胞内部で強い蛍光像が観察された(Fig. 2A)。画像解析により内部の蛍光強度分布を比較すると、Cx43 搭載ウイルスレプリカは未搭載のものと比べ、有意に高い蛍光強度分布を示した(Fig. 2B)。以上の結果より、機能を保持した状態でウイルスレプリカ上に Cx43 が搭載され、ギャップジャンクションを介して GUV・細胞内へ分子輸送されたことが示唆された。

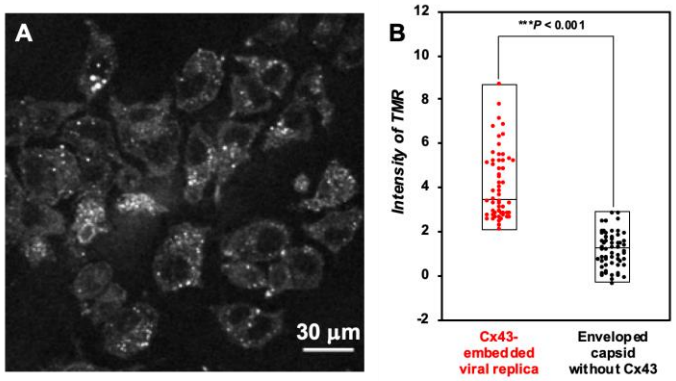


Fig 2. (A) CLSM image of transport of TMR from Cx43-embedded viral replica into HepG2 cells. (B) Box plot of the fluorescence intensity distribution of TMR in HepG2 cells.

1) H. Furukawa, H. Inaba, F. Inoue, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **56**, 7092 (2020)
2) H. Furukawa, H. Inaba, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, *RSC Chem. Biol.*, **3**, 231 (2022)

連結方向切り替え可能な One-Pot ペプチド連結法によるタンパク質化学合成

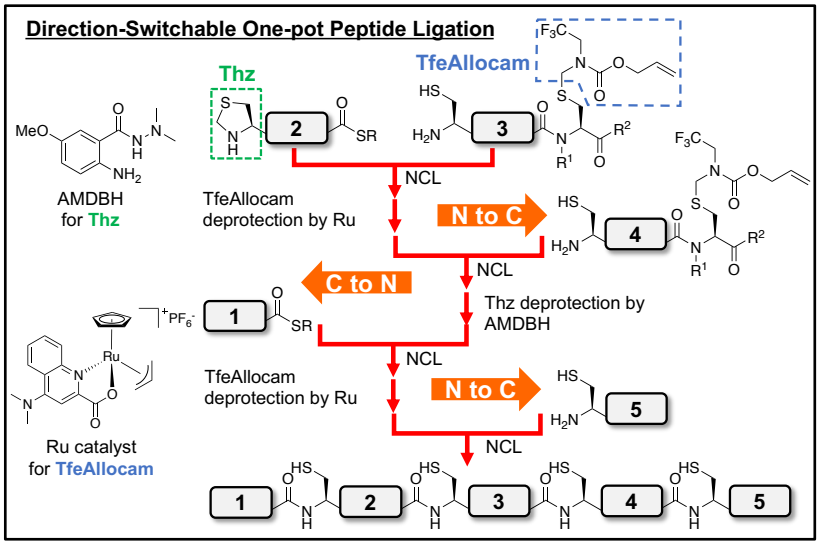
○中津幸輝[1]・岡本晃充[2]・林剛介[1]・村上裕[1,3]（[1]名大院工・[2]東大院工・[3]名大ナノライフ）

Direction-Switchable One-Pot Peptide Ligation for Chemical Protein Synthesis (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[2], Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya University[3]) NAKATSU, Koki[1]; OKAMOTO, Akimitsu[2]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1,3]

「タンパク質化学合成法」は、一般的な遺伝子工学的手法では導入困難な非タンパク質性アミノ酸を、部位特異的かつ多重に組み込んだ特殊タンパク質の合成を可能にする。タンパク質化学合成においては、固相合成したペプチド断片同士の連結反応が合成上重要なステップとなっており、中性の水溶液という温和な条件で N 末端システインペプチドと C 末端チオエステルペプチドが連結される Native Chemical Ligation (NCL)[1]がよく使用される。

多数のペプチド断片を効率的に連結するため、精製を介さず複数断片を連結する「one-pot ペプチド連結法」が複数の研究グループのので開発されており、我々のグループを含め種々の one-pot 連結法が報告されている。しかし、これまでの手法は、C 末端チオエステル活性制御による N-to-C 方向(N 末端側から C 末端へ)連結、もしくは N 末端システイン活性制御による C-to-N 方向連結の 2 種類のうち片方向の連結に限定されている。これら連結方向を切り替えながらの one-pot ペプチド連結法も理論上は考えられるが、N-to-C と C-to-N の 2 種類の直交的な one-pot 連結法の組み合わせが必要となるため開発は困難であり、報告例は全くない。タンパク質化学合成においては、ペプチドの連結方向により合成の成否が左右される場合が多く、この未達成の one-pot 連結法である「連結方向切り替え可能な(Direction-Switchable) one-pot 連結法」開発の意義は大きい。

本発表では、新規 allyl 系システイン保護基である TfeAllocam [*N*-(2,2,2-trifluoroethyl) allyloxycarbonylaminomethyl] 基と金属錯体(Pd 錯体[2], Ru 錯体[3])を用いた新たな N-to-C one-pot 連結法を報告し、この新手法に我々が開発した Thz (thiazolidine) 基と 2-aminobenzamide 型脱保護剤を用いた C-to-N one-pot 連結法[4]と組み合わせることで達成した、連結方向切り替え可能な one-pot ペプチド連結法(図参照)の詳細を報告する。さらに本手法による、ジユビキチン化ヒストン H3 の化学合成についても報告する。



(1) Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. *Science* **1994**, *266*, 776.
(2) Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 16533.
(3) Kamo, N.; Kujirai, T.; Kurumizaka, H.; Murakami, H.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 5926.
(4) Nakatsu, K.; Okamoto, A.; Hayashi, G.; Murakami, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* in press.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

音響浮揚を用いたファージ提示法による GM1 模倣ペプチドの獲得

○吉田顕子・松原輝彦・佐藤智典（慶應大理工）

Selection of GM1-mimic Peptides by Phage-display Technology Using Acoustic Levitation (Faculty of Science and Technology, Keio University) YOSHIDA, Akiko; MATSUBARA, Teruhiko; SATO, Toshinori

【緒言】

ファージ提示法は、標的分子に結合するペプチドをライブラリー群から効率よく選別する手法である。しかし、この手法で使用するファージ粒子が反応容器に対し非特異的に吸着してしまい、選別効率が低下するという課題がある。我々は以前に、全方位非接触の界面を実現可能な音響浮揚技術に着目し、浮揚した液滴内で酵素反応やクリック反応が効率的に進行することを見出した[1]。この音響浮揚技術をファージ提示法に応用すれば、反応容器を使用しない親和性選択が可能となり、選別効率のさらなる向上が期待される。そこで本研究では 96 穴プレートを使用する従来法と、音響浮揚を使用する浮揚法の 2 通りでファージ提示法を行い、両手法から得られたペプチドの機能を比較した。標的分子はガングリオシド GM1 を受容体として認識するコレラトキシン B サブユニット（CTB）を用い、2 つの手法で得られた GM1 構造を模倣するペプチドの配列が異なることを期待した。

【方法および結果】

本研究では 7 残基のペプチドを提示するファージライブラリーを使用し、GM1 ミセル溶液で溶出を行う親和性選択を 4 ラウンド実施した。浮揚法では①ファージと CTB の相互作用、②CTB に結合したファージの溶出の 2 段階を浮揚液滴内で行った（Fig. 1）。ラウンドの進行により、従来法、浮揚法ともに回収率の上昇が見られたため、4 ラウンド目からファージのクローニングを行った。ファージ ELISA により、従来法と浮揚法からそれぞれ CTB 結合性ファージクローンを同定した。これらのファージが提示するペプチドを化学合成し、ABC（avidin-biotin peroxidase complex）法により CTB 結合親和性を評価した。従来法から得たペプチドでは CTB に結合しなかったのに対し、浮揚法から得たペプチドは CTB 結合親和性を示した。さらに、このペプチドは CTB と GM1 の結合を阻害する活性を有しており、GM1 の機能を模倣する可能性が示された。

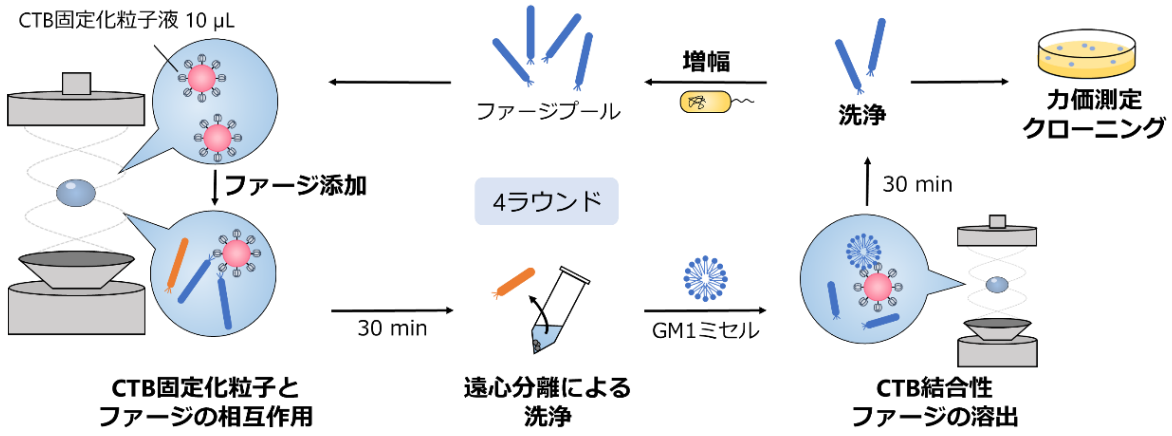


Fig. 1　浮揚した液滴内における親和性選択（浮揚法）.

Reference
1) T. Matsubara, *et al.*, *Adv. Sci.*, **8**, 2002780 (2020).

核導入ペプチドを持つ二核銅(II)錯体の合成及びその抗がん活性評価

○児玉愛実・畑真知・人見穣・小寺政人（同志社大院）

Synthesis and Cancer-Cell-Selective Toxicity of a Dicopper(II) Complex with NLS-Peptide Attached Phenol-2,6-bis(amide-tether-tacn) Ligand (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) KODAMA, Ami; HATA, Machi; HITOMI, Yutaka; KODERA, Masahito

現在、細胞障害性抗がん剤であるシスプラチンなどの白金製剤が広く臨床利用されている。これらは、DNA の guanine や adenine 塩基に結合して DNA を屈曲させ、複製・転写を抑制して抗がん活性を示す。しかし、これらは、正常細胞の guanine や adenine 塩基にも同様に作用するため、がん細胞選択性を示さず、深刻な副作用を生じることが問題である。この副作用の軽減に向け、正常細胞には作用せず、選択的にがん細胞を死滅させる抗がん剤の開発が求められている。

これまでに我々は、がん細胞選択的な抗がん剤開発のため、がん細胞の特異的な微小環境(弱酸性 pH、高い抗酸化剤濃度)に着目した。その中で、*p*-cresol の 2,6 位に 1,4,7-triazacyclononane (tacn)を amide-tether で結合させた二核化配位子 Hbtamide の二核銅(II)錯体[Cu_2(μ-OAc)(OAc)$_2$(btamide)] (**1**)を開発し、抗がん活性を評価してきた。**1** は正常細胞よりもがん細胞に 3 倍以上高い細胞毒性を示し、がん細胞選択的に高い細胞毒性を示すことを見出した[1]。しかし、がん細胞である HeLa 細胞株に対する IC_{50} 値は 47 μM であり、シスプラチンの IC_{50} 値 2.33 μM と比較して毒性が低い。そこで今回は、**1** の更なる細胞毒性向上を目指し、核標的能を有する核移行性シグナル(NLS)ペプチドの導入を検討した。NLS ペプチドとして、核への局在化が報告されている SV40T 抗原のアミノ酸配列(VKRKKKP)を持つものを選択した[2]。さらにクリック反応による Hbtamide への NLS ペプチドの導入を可能にするため、NLS ペプチドの N 末端に Cys を導入した。これを開発すれば、核へ局在化・細胞への集積量の増加を実現し、より効率的に **1** のがん細胞選択的な細胞毒性の発現が期待できる。

本研究では、Fig. 1 に示す Hbtamide-P2-NLS とその二核銅(II)錯体 [Cu_2(μ-OAc)(OAc)$_2$(btamide-P2-NLS)] (**2**)を設計・合成したので報告する.

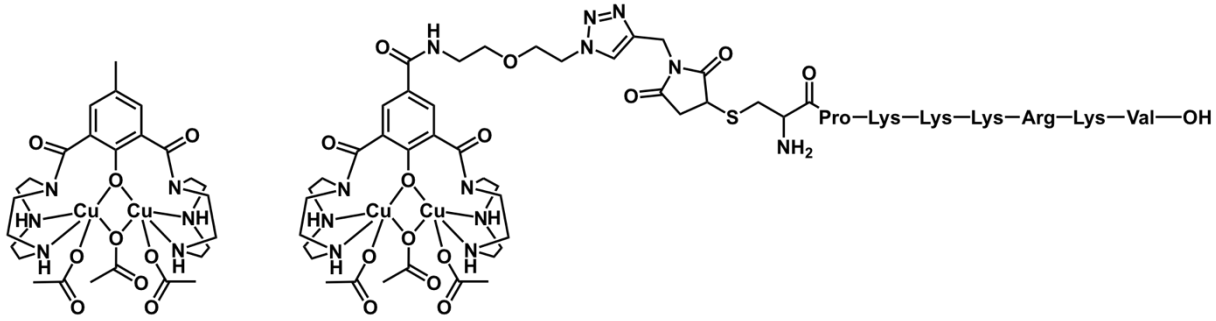


Figure 1. Chemical structures of **1** (left) and **2** (right)

[1] 畑 真知氏, 2020 年度 同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻修士論文
[2] F. Noor, A. Wstholz, R. Kinscherf, N. Metzler-Nolte, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2481–2485

Poster Session

Mon. Sep 12, 2022 3:20 PM - 4:20 PM JST | Mon. Sep 12, 2022 6:20 AM - 7:20 AM UTC | Online Site A Online Streaming

Poster Session (P67-P100)

[P67] Design of peptide interface to expose the cytoplasmic side of the cell membrane on graphene

*Shogo Saito[1], Soichiro Tatematsu[1], Masayoshi Tanaka[1], Mina Okochi[1] (1. Tokyo Institute of Technology)

[P68] Selection of Peptides That Bind to MDM2 Protein Using an Engineered Split Intein

*Yutaro Watanabe[1], Tsuyoshi Takahashi[1] (1. Graduate School of Science and Technology, Gunma University)

[P69] Development of an efficient chemical synthesis route for dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism

*Yuya Takahashi[1], Satomi Kori[2], Kyohei Arita[2], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. The university of nagoya, 2. Yokohama City University)

[P70] WYP-rich macrocyclic peptide library as a high quality library for *in vitro* selection

*Taiga Sumi[1], Tomoshige Fujino[1], Hiroshi Murakami[1,2] (1. Guraduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P71] Development of the cyclic peptide which inhibit amyloid β aggregation induced by GM1 cluster on lipid raft

*Erika Miyamoto[1], Teruhiko Matsubara[1], Toshinori Sato[1] (1. Faculty of Science and Technology, Keio University)

[P72] Creation of antigen-modified peptide assemblies for activation of immune cells

*Yamaguchi Kyohei[1] (1. Graduate School of Engineering, KyushunUniversity)

[P73] Fabrication of emulsion vaccines based on enzyme reactive self-assembling peptides

*Ayato Higuchi[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1,2], Noriho Kamiya[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[P74] Construction of a stimuli-responsive hemoprotein-based hydrogel driven by folding and unfolding behaviors

*Kazuki Kageyama[1], Takahiro Urayama[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka university)

[P75] Development of Cysteine-selective Covalent Drugs Utilizing β-Fluorovinylsulfonamides

*Shunsuke Watanabe[1], Keisuke Tokunaga[1], Yuya Hirose[1], Yudai Tanaka[1], Naoya Shindo[1], Akio Ojida[1] (1. Graduate school of Pharmaceutical Sciences, Kyushu university)

[P76] *De novo* chemogenetic approach for subtype selective regulation of dopamine receptor activity

*Shuntaro Kashiwa[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Nagoya University)

[P77] Biosynthesis of prostaglandin by the marine microalga with cyclooxygenase

*Miho Kikuchi[1], Nana Matsumoto[1], Yuki Tsuru[1], Yoshiaki Maeda[2], Tomoko Yoshino[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Faculty of engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Faculty of Life and

environmental Sciences, Tsukuba University)

[P78] Dichlorotriazine as a new electrophilic protein label for gold-nanoparticle affinity labeling probes

*Ayaka Tsuruno[1], Shione Kamoshita[1], Kaori Sakurai[1] (1. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P79] AMPA-type glutamate receptor covalent inhibitor for light control at the synaptic level

*Akihiro Shibata[1], Kyohei Soga[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P80] Coordination Chemogenetics for Selective Inhibition of class A GPCR

*Takuto Sugawara[1], Muneo Tsujikawa[2], Yuta Miura[1], Akinobu Senoo[1], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate school of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate school of Engineering, Kyoto University)

[P81] Artificial palmitoylation of protein controls the raft localization and intracellular delivery

*Kazuki Uchida[1], Hiroki Obayashi[1], Kosuke Minamihata[1], Rie Wakabayashi[1], Masahiro Goto[1], Naofumi Shimokawa[2], Masahiro Takagi[2], Noriho Kamiya[1] (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P82] An Artificial Photo-redox Enzyme Constructed by Incorporation of an Organic Photosensitizer into a Protein

*Yuki Uchida[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P83] Hydroxylation of Propane Using Intracellular Cytochrome P450BM3 in Water/Ionic Liquid Biphasic System

*Yuki Sugai[1], Masayuki Karasawa[1], Yusaku Kodama[1], Shinya Ariyasu[1], Yuichiro Aiba[1], Osami Shoji[1] (1. Graduate School of Science, Nagoya University)

[P84] Combination of cpHaloTag and bio-orthogonal two-step labeling for trafficking studies of transmembrane proteins.

*Jun Ikeshita[1], Yutaro Sugihara[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P85] Development of artificial metalloenzymes for stereoselective hetero Diels-Alder reaction

*Saho Yoshioka[1], Yoshitsugu Morita[2], Nobutaka Fujieda[2] (1. Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 2. Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University)

[P86] Creation of an Artificial Metalloenzymes toward Stereodivergent Michael Addition Reaction

*Ryusei Matsumoto[1], Saho Yoshioka[1], Tomohito Marumo[1], Yoshitsugu Morita[1], Nobutaka Fujieda[1] (1. Osaka Metro. Univ.)

[P87] Kinetic analysis of the interaction of agonist antibodies targeting OX40.

*Kan Ujiie[1], Aki Tanabe[2], Satoru Nagatoishi[3], Kouhei Tsumoto[1,3,4] (1. Dept. of Bioeng., Sch. Eng., The Univ. of Tokyo, 2. AIDS Res. Center, NIID, 3. Inst. Med. Sci., The Univ. of Tokyo, 4. Dept. of Chem Biotech., Sch. Eng., The Univ. of Tokyo)

[P88] Synthesis of cyclic oligo (ethylene glycol) for suppression of amyloid insulin fibrillation

*Thirasara Sammani PituwalaKankanamge[1] (1. Life science and technology , Tokyo Institute of Technology)

[P89] Development of opto-chemogenetics tool for reversible reglation of adenosine A_{2A} receptors

*Harufumi Suzuki[1], Doura Tomohiro[1], Kiyonaka Shigeki[1] (1. Engineering)

[P90] Development of technology for selective degradation of proteins in mitochondria matrix

*Wakana Yamada[1], Shinichi Sato[1,2], Minoru Ishikawa[1], Shusuke Tomoshige[1] (1. Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[P91] Chemogenetic regulation of adenosine A2A receptor focusing on the action of the subtype-selective antagonists

*Yuma Matsuoka[1], Tomohiro Doura[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P92] DNA Labeling to Target Protein by Photoreaction of Benzophenone and Its Application

*Ryota Hidaka[1], Masaru Mori[2], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, 2. Institute for Advanced Bioscience, Keio University)

[P93] TRAP display selection of monobodies for the detection of microinflammation.

*Ryusei Matsuo[1], Tomoshige Fujino[1], Jing-Jing Jiang[2], Murakami Masaaki[2], Hayashi Gosuke[1], Murakami Hiroshi[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Medicine, Hokkaido University, 3. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)

[P94] Novel Chemogenetics for Subunit-selective Inhibition of AMPA Receptor Activity

*Yuta Deen Miura[1], Kento Ojima[1,2], Itaru Hamachi[2], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P95] Preparation of cytochrome b_{562} oligomers using efficient disulfide bond formation

*Karen Kurihara[1], Julian Wong Soon[1], Koji Oohora[1], Takashi Hayashi[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University)

[P96] Improving the efficiency of heme incorporation into recombinant cytochrome P450 by co-expression of ferrochelatase

*Eri Akagawa[1], Maki Sawada[1], Masafumi Yohda[1], Nobuhumi Nakamura[1] (1. Faculty of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P97] Preparation and functional evaluation of nonwoven fabrics made of crosslinkable polymers using bioorthogonal reaction.

*Ishiguro Taira[1] (1. Nagoya Institute of Technology)

[P98] Tensile characteristics of nestin tail domain by AFM

*Rina Tokuoka[1], Koki Uchida[1], Ayana Yamagishi[1,2], Daijiro Takeshita[3], Chiaki Yoshikawa[4], Tomohiko Yamazaki[4], Taro Q.P. Uyeda[5], Chikashi Nakamura[1,2] (1. Grad. Sch. Eng. TUAT, 2. Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST, 3. Biomed. Res. Inst., AIST, 4. NIMS, 5. Waseda Univ.)

[P99] Development of eco-friendly bromolactone synthase

*Takuya Matsuura[1], Hideyasu China[1], Takashi Nakamura[1], Hidehito Mukai[1] (1. Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

[P100] Impact of A-to-I RNA editing in mRNA untranslated regions on the translation process

*Yuki Ogata[1], Masatora Fukuda[1,2] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Fukuoka University, 2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Fukuoka University)

グラフェン上に細胞質側の細胞膜を露出させるペプチド界面の設計

〇齊藤彰吾・立松宗一郎・田中祐圭・大河内美奈（東京工業大学物質理工学院）

Design of a peptide interface to expose the cytoplasmic side of the cell membrane on graphene

(Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo institute of Technology) SAITO, Shogo; TATEMATSU, Soichiro; TANAKA, Masayoshi, and OKOCHI, Mina

【目的】

生体膜にはイオンチャネル等の多種類の膜タンパク質が存在し、これらはしばしば創薬ターゲットとしても用いられることから、機能や応答の計測やイメージング法の開発が進められている。イオンチャネルを標的とした人工細胞膜デバイスの開発を中心に様々な刺激や薬剤応答の評価がさかんに行われてきたが、実際に細胞の生体膜を用いた応答計測には課題があった。本研究では、次世代エレクトロニクス材料として注目されるグラフェンなどの二次元ナノ材料上で細胞の培養界面を構築した。脂質膜に対して強い相互作用をもつペプチドとグラフェン結合性ペプチドを連結した二機能性ペプチドを用いて、高配向性熱分解グラファイト（HOPG）上に自己組織的にペプチドを修飾した。このペプチド界面上で細胞培養後、浸透圧ショックを行うことで、ペプチド界面によって細胞の底面膜が保持された状態で細胞を破砕し、グラフェン上に細胞膜界面を構築した。

【方法】

細胞膜と強く相互作用する配列の探索には、ペプチドアレイを用いた。ペプチドアレイは、既報の膜透過性ペプチド 14 配列と膜融合性ペプチド 3 配列を候補とし、これをスポット合成することで作成した。各ペプチドの評価は、蛍光染色した NIH-3T3 細胞を PBS 中でペプチドアレイ状に播種し、結合した細胞数の計数により行った。グラフェン結合性配列は、グラフェンとのπ-π相互作用が報告される既知配列から選抜し、原子間力顕微鏡を用いた被覆率を評価した。次に、グラフェン結合性配列と細胞膜結合性配列を連結したペプチドを合成し、ペプチド溶液をグラフェンと同様の表面構造を有する HOPG 上に滴下することで自己組織的にペプチド界面を構築した。このペプチド界面上に NIH-3T3 などの細胞を播種し、培養した。ペプチド界面は、結合細胞のカウントにより算出した接着率と、蛍光試薬を用いて算出した細胞生存率によって評価した。HOPG 上での細胞底面膜の露出は、細胞核および膜を染色後、培養液を氷冷した超純水に置換することで浸透圧ショックを行った。HOPG 上の細胞底面膜は、PBS 洗浄後、蛍光顕微鏡および走査型電子顕微鏡で観察した。

【結果および考察】

ペプチドアレイを用いた結合試験より、細胞膜に強く結合するペプチドとして、 SIV ペプチド (AVFVLGFLGFLATAGKKK) が選抜された。また、FEFQFNFK ペプチドは、グラフェン上に安定に結合したことから、グラフェン結合性ペプチドとして用いた。 SIV ペプチドとグラフェン結合ペプチドを連結した二機能性ペプチドを HOPG 上に滴下することにより、安定した細胞接着がみられ、細胞培養が可能となった。このペプチド界面上の細胞に対して浸透圧ショックを行ったところ、細胞破砕によりしたところ、細胞核が抜け、細胞底面膜が露出する様子が蛍光顕微鏡により観察された。さらに走査型電子顕微鏡による観察では、細胞底面膜の微細な線維状や球状の構造が確認された。今後は、生体膜デバイスの開発により、膜受容体などの膜タンパク質の高感度での活性計測について検討する。

分割インテインを活用したMDM2タンパク質に結合するペプチドの探索

○渡辺雄太郎・高橋剛（群馬大院理工）

Selection of Peptides That Bind to MDM2 Protein Using an Engineered Split Intein (Graduate School of Science and Technology, Gunma University) WATANABE, Yutaro; TAKAHASHI, Tsuyoshi

E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 タンパク質は、がん抑制タンパク質 p53 と結合してその転写活性化能の抑制を誘導している。いくつかのがんでは、MDM2 の遺伝子の増幅や MDM2 の過剰発現により、p53 の機能が強く阻害されている。そのため、MDM2 に結合することで、p53 の機能の回復を可能とする化合物の探索が精力的に行われている。

一方、分割インテインは、2 つのポリペプチド鎖（エクステイン）を protein trans-splicing (PTS) で連結させる酵素様のタンパク質である。当研究室ではこれまでに、改変型分割インテインに、相互作用するペプチドとタンパク質を融合することで、ペプチド–タンパク質間の相互作用に依存して PTS 反応が進行する系を構築した。本研究では、エクステインにカナマイシンキナーゼである aminoglycoside3'-phosphotransferase (APH) の分割体を用い、大腸菌のカナマイシン耐性を指標としたペプチド–タンパク質間相互作用検出系の構築を目的とした。また、構築した検出法を用いて、ペプチドライブラリから MDM2 タンパク質に結合するペプチドの探索法への応用を試みた。

最初に、MDM2 に解離定数（K_d）約 3 nM で結合する PMI (TSFAEYWNLLSP) ペプチドと MDM2 を用いたモデル実験を行った (1)。APH の N 側断片、N インテイン、MDM2 を連結した融合タンパク質（APHN-IntN-MDM2）と、PMI、C インテイン、APH の C 側断片を融合したペプチド（PMI-IntC-APHC）を設計した。PMI 配列の 2、3、7、9、10 残基目をそれぞれ Ala に置換し、MDM2 との結合親和性を変化させたペプチドを設計した。対応する遺伝子をコードしたプラスミドで大腸菌 BL21(DE3)を形質転換し、ITPG 存在下で発現誘導した後、カナマイシン含有寒天培地で培養した。カナマイシン濃度 20 μg/mL では、K_d が 1 μM 以下のペプチドを発現する大腸菌は生存した。一方、カナマイシン濃度 320 μg/mL では、K_d が 10 nM 以下のペプチドだけが生存した。以上から、ペプチドと MDM2 との結合親和性と、大腸菌のカナマイシン耐性に相関があることが分かった。

次に、12残基からなるペプチドライブラリを構築し、MDM2と結合するペプチドの探索を試みた。APHN-IntN-MDM2とペプチドライブラリ遺伝子を配置したIntC-APHCを大腸菌で発現させ、カナマイシン含有寒天培地で培養した。生育した大腸菌からプラスミドを抽出し、ペプチド配列を解析した。カナマイシン濃度160 μg/mLから獲得したコロニーは、同一の配列のクローンが複数みられた。また、各ペプチドとも、MDM2との結合に重要なi残基目のPhe、i+4残基目のTrp、i+7残基目のLeu（またはPhe）が保存されていた。このことから、得られたペプチドは、MDM2との結合能をもつことが示唆された。

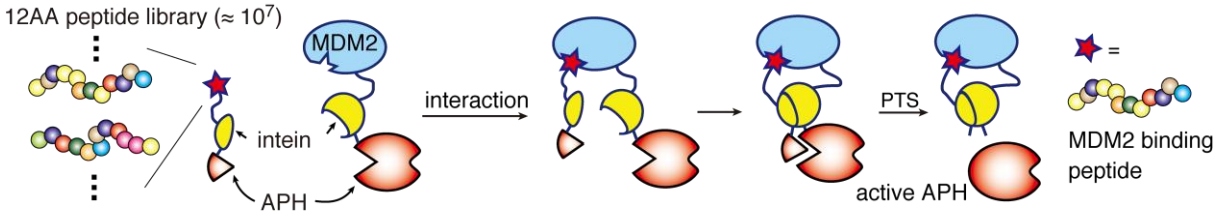


図 . PTS 反応を用いた MDM2 に結合するペプチドの探索の概略図 .

1) C. Li., et al., *J. Mol. Biol.*, **398**, 200-213 (2010).

維持メチル化機構解明を目指したジユビキチン化 PAF15 タンパク質の効率的化学合成ルートの開拓

○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]横市大院医）

Development of an efficient chemical synthesis route for dual-mono ubiquitinated PAF15 for elucidation of maintenance methylation mechanism (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Medical Life Science, Yokohama City University[2]) TAKAHASHI, Yuya[1]; KORI, Satomi[2]; ARITA, Kyohei[2]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1]

「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 1)を組み合わせたものであり、メチル化やアセチル化、ユビキチン（Ub）化などの翻訳後修飾を有するタンパク質の作製を可能にする。本研究では、DNA 維持メチル化において重要な働きを担う Ub 化が 2 カ所に入った PAF15 タンパク質（PAF15Ub2）2)の合成ルートを開拓することを目的とした。

第 1 世代の合成ルートでは、全長 262 アミノ酸からなる PAF15Ub2 を計 5 つのペプチド断片に分割し、N 末端側から C 末端側へ向けてペプチド順次連結させる形で合成を行ったが、生成物の収率が 0.07%、純度が 18 %であり、その後の生化学実験に用いることができなかった。そこで、これらの問題点を解決するため合成ルートを変更することとした(Fig. 1A)。第 2 世代の合成ルートでは変更点として、まず合成ルート全体を、ペプチド 6 と 9 を別々に作製する「収束的合成ルート」へと変更した。また、セグメント 1、2、3 を途中で精製を介さずに連結する「ワンポットライゲーション法」を用いてペプチド 6 の収率の改善を図った。さらに、セレノシステインをセグメント 4 に導入することで、セグメント 5 の配列中に存在するシステインを残しながら選択的にアラニンへと変換が可能となる。結果として、セグメント 1、2、3 のワンポットライゲーションでは収率 41%で得られ、以前のスキームと比較すると、約 4 倍の収率向上に成功した。そして、得られた 6 を脱硫反応により 7 に変換したのち、単離した 7 と 9 の連結反応とセレノシステインからアラニンへの変換をワンポットで行った結果、この 2 段階反応の収率が 22 %で目的の PAF15Ub2 を得ることに成功し、SDS-PAGE 解析によって得られた PAF15Ub2 が高純度であることが明らかとなった(Fig. 1B)。反応経路全体の収率は 4.6 %となり、第 1 世代の合成ルートと比較して約 60 倍の収率の向上に成功した。

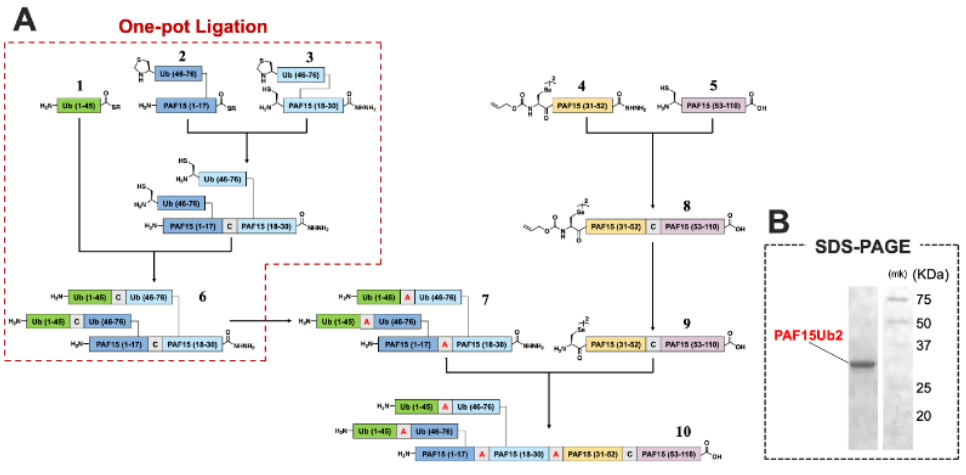


Fig 1. Synthesis of PAF15Ub2. (A) New ligation scheme of PAF15Ub2. (B) Result for SDS-PAGE analysis.

1) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science*, **266**, 776 (1994)
2) A. Nishiyama, D. B. Mulholland, S. Bultmann, S. Kori, A. Endo, Y. Saeki, 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)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

WYP-rich 大環状ペプチドライブラリの構築と有用性の検証

○鷲見大河[1]・藤野公茂[1]・村上裕[1,2]（[1]名大院工、[2]名大ナノライフ）

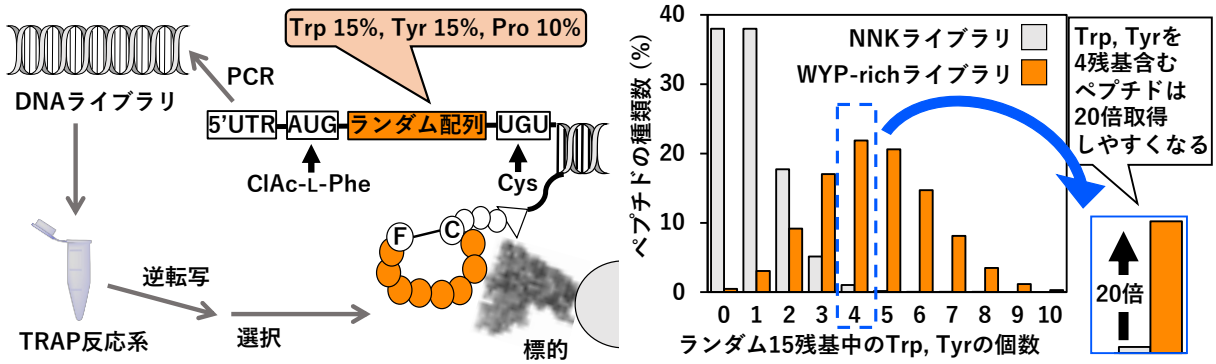
WYP-rich macrocyclic peptide library as a high quality library for *in vitro* selection ([1]Graduate School of Engineering, Nagoya University, [2]Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University) Taiga Sumi,[1] Tomoshige Fujino,[1] Hiroshi Murakami[1,2]

大環状ペプチドは、高い特異性と合成の容易さから、新たな中分子創薬モダリティとして注目されている。進化分子工学的手法では、高い多様性を持ったライブラリから結合力の強い大環状ペプチドの創製が可能であり、中でも、mRNA 提示法や、我々の研究室で開発した TRAP 提示法 (図左) を用いて調製される大環状ペプチドライブラリは [1)]、10〜100 兆種類程度と非常に高い多様性を持っている。

ライブラリでは、多様性が高いほど、高い親和性・特異性を持つ大環状ペプチドが得られることは明らかであるが、質についてはどうであろうか。通常、ライブラリをコードする DNA は、20 種類の天然アミノ酸を網羅しつつ、各アミノ酸の出現割合を均一化し、終止コドンの出現割合を低くするため、NNK (N=A/T/G/C, K=T/G) の繰り返し配列で合成する。しかし、親和性の高い大環状ペプチドの取得を目的とした場合、NNK から得られるアミノ酸組成が適切であるかはまだ検証されていない。一方で、抗体や人工抗体の結合ループのアミノ酸組成を調べた研究では、Trp, Tyr が多く含まれることが知られており [2)]、この 2 つのアミノ酸は、結合に有利に働くと考えられている。

本研究では、抗体や人工抗体と同様に大環状ペプチドにおいても、Trp, Tyr が結合に有利に働くという仮説を立てた。また、環状ペプチドが標的となる分子と結合するには一般的に構造が制限された方が良いと考えられており、ペプチド中の Pro の割合を高めることで構造がより安定になると考えた。これらの仮説を検証するため、Trp, Tyr, Pro の含有率を高めた大環状ペプチドライブラリ (WYP-rich ライブラリ、図左) を構築した。ここで、ランダム配列が 15 残基のペプチドに含まれる Trp, Tyr の残基数を考えると (図右) 、従来の NNK ライブラリでは 0 または 1 残基のものが 8 割近くを占めるのに対し、WYP-rich ライブラリでは 4 残基を中心とした分布となる。Trp, Tyr をペプチド中に 4 残基程度含むことが結合に有利に働くと仮定すれば、このようなペプチドの種類数は、これまで使用されてきた NNK ライブラリに比べて WYP-rich ライブラリで 20 倍も多くなる。よって、WYP-rich ライブラリでは結合力の高いペプチドが得られる可能性が高まると考えられる。

本発表では、上記の仮説を検証するために WYP-rich ライブラリと NNK ライブラリを調製し、様々な標的タンパク質に対し TRAP 提示法による選択を行った結果と、選択後に次世代シークエンスにより得られた配列群を解析した結果について報告する。



1）T. Ishizawa et.al., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135(14), 5433.
2）T. Kondo et.al., *Sci. Adv.* **2020**, 6(42), eabd3916.

脂質ラフト上の GM1 に誘起された Aβ 凝集を阻害する環状ペプチドの開発

○宮本恵里花・松原輝彦・佐藤智典（慶應大理工）

Development of the cyclic peptide which inhibit amyloid β aggregation induced by GM1 cluster on lipid raft

(Faculty of Science and Technology, Keio University) MIYAMOTO, Erika; MATSUBARA, Teruhiko; SATO, Toshinori

【緒言】アミロイドβタンパク質 (Aβ) は凝集することで細胞に毒性を呈し，アルツハイマー病 (AD) の発症および進行に深く関与する．毒性凝集体の形成は，神経細胞膜表面上のガングリオシドに誘起されることが知られている．Aβ が脂質ラフト上のガングリオシドクラスターに結合して構造変化を起こし，さらなる凝集の起点となる凝集核を形成する [1]．我々は以前に，ファージ提示法により GM1 結合性ペプチドを同定し，ペプチドが折れ曲がった立体構造を形成して膜上の GM1 に結合すること，Aβ 線維化の阻害能を有することを明らかにした [2, 3]．ペプチドは環化することで，構造安定性や結合能の向上が期待できる．そこで本研究では，分子内架橋により側鎖間で環化した GM1 結合性環状ペプチドを設計し，脂質ラフトを模倣した平面脂質二分子膜を用いて機能評価を行った．

【方法】 GM1 存在下での p3 の立体構造をもとに、近接する 2 残基を Cys に置換したペプチドを Fmoc 化学で合成し，空気酸化により GM1 に結合する環状ペプチド cy-p3 を得た．脂質ラフトを模倣した人工膜として 10%GM1 含有脂質膜 (GM1/sphingomyelin (SM) /cholesterol (chol), 10:45:45) を基板上に写し取り，ELISA 法や表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で結合能を評価した．次に，10%GM1 含有脂質膜をリン脂質を被覆したマイカ基板上に写し取って脂質二重膜を作製し，膜上で 1 μM $Aβ_{42}$ とペプチドを 37 ℃で 24 h 相互作用させ，膜表面のトポグラフィーを原子間力顕微鏡 (AFM) で観察した．さらに，10%GM1 含有リポソームを作製して $Aβ_{42}$ と相互作用させ, チオフラビン T (ThT) アッセイにより $Aβ_{42}$ 凝集の経時的変化を観察した．

【結果】GM1 結合性ペプチド p3 と環状ペプチド cy-p3 の 10%GM1 含有膜との結合能を SPR 法で評価した結果，解離定数はそれぞれ 0.64 μM および 0.23 μM で，環化後も結合能が維持されていた．次に 10%GM1 含有膜にペプチドと 1 μM $Aβ_{42}$ を同時に相互作用させて AFM 観察を行ったところ，観察される $Aβ_{42}$ 線維の長さがペプチド存在下で減少した. p3 と cy-p3 の $Aβ_{42}$ 凝集に対する阻害能 IC_{50} はそれぞれ 9.7 pM，92 fM であり，ペプチドの環化によって 100 倍向上した．さらに，ThT アッセイから，ペプチドは凝集量の抑制効果に加え，$Aβ_{42}$ が凝集核を形成する時間を延長する効果が示された．

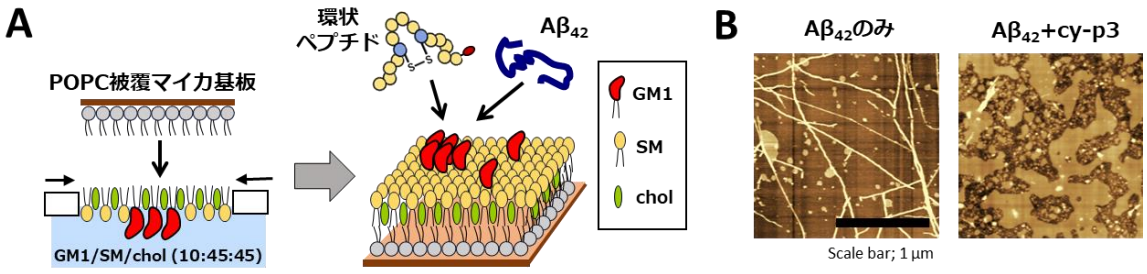


Fig. 1 (A)脂質二重膜の作製と環状ペプチドの $Aβ_{42}$ 凝集阻害能の評価, (B) GM1 含有膜上で誘起される $Aβ_{42}$ 凝集に対するペプチドの阻害能 (同時投与) の AFM 観察.

References
1) K. Yanagisawa, *et. al.*, *J. Neurochem.*, **116**, 806-812 (2011).
2) K. Fujitani, *et. al.*, *Carbohydr. Res.*, **29**, 2258-2264 (2017).
3) T. Matsubara, *et. al.*, *ACS. Chem. Neurosci.*, **13**, 1868-1876 (2022).

免疫細胞の活性化に向けた抗原修飾ペプチド集合体の創製

○山口恭平[1]・若林里衣[2]・神谷典穂[1, 2]・後藤雅宏[1, 2]（[1]九大院工、[2]九大未来化セ）

Creation of antigen-modified peptide assemblies for activation of immune cells (Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University [2]) Yamaguchi, Kyohei[1]; Wakabayashi, Rie[1]; Kamiya, Noriho[1, 2]; Goto, Masahiro[1, 2]

免疫細胞の一種である B 細胞は、病原体の抗原に特異的な抗体を産生することで感染症等から身を守るための生体防御反応における中心的な役割を担っている。B 細胞は細胞膜上に B 細胞受容体 (BCR) を発現しており、この BCR が病原体上の抗原を認識しクラスター化することで活性化され、抗体産生が行われる。そのため、人為的な B 細胞の活性化は免疫療法やワクチン開発につながると期待される。

本研究では、B 細胞を活性化させる材料として両親媒性ペプチド (PA) が水中で形成する自己集合体に着目した。PA 集合体は抗原修飾 PA を導入することで抗原が修飾された PA 集合体を調製することができる。上述の通り、B 細胞の活性化には BCR のクラスター化が重要であり、BCR の細胞膜上における可動性が必要である。これに対して、PA 集合体は自己組織化により形成される動的な構造体であり、PA 集合体上の抗原も移動することが可能であるため、B 細胞の活性化を誘導する材料として非常に有用であると考えた。

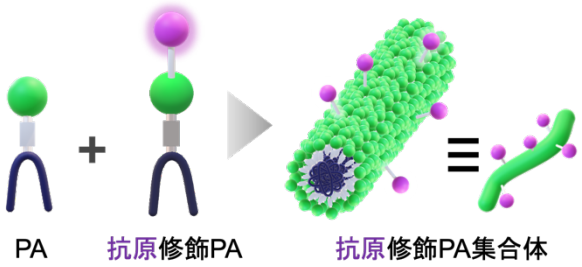


Fig 1. Preparation of antigen-modified PA assemblies.

以上の背景から、本研究では抗原修飾 PA 集合体を用いた B 細胞の活性化を目的とした。今回、モデル抗原として 4-ヒドロキシ-3-ニトロフェニル酢酸 (NP) を利用した。そして、材料部の制御として PA の疎水部の長さ、また、抗原部の制御としてスペーサーの長さが B 細胞の活性化に及ぼす影響を評価した。具体的には、疎水部に長さが異なるアルキル鎖 (C8, C10, C12, C14) を導入した 4 種類の PA として Cn-PA (n = 8, 10, 12, 14) 合成した。また、Cn-PA に NP を修飾した Cn-PA-NP (n = 8, 10, 12, 14) 、および、抗原修飾部位に長さの異なるスペーサーとして polyethylene glycol (PEG) を導入した Cn-PA-(PEG)m-NP (m = 2, 6) を合成した。これらを利用してアルキル鎖長およびスペーサー長が異なる NP 修飾 PA 集合体を調製した。これらの NP 修飾 PA 集合体を NP に対する BCR を発現する B 細胞に作用させることで活性化を試みた (**Fig. 2**)。本発表では、PA のアルキル鎖長およびスペーサー長が B 細胞の活性化に及ぼす影響を報告する。アルキル鎖長およびスペーサー長が異なる NP 修飾 PA 集合体を作用させることで B 細胞の活性化挙動に影響を及ぼすことが確認された。

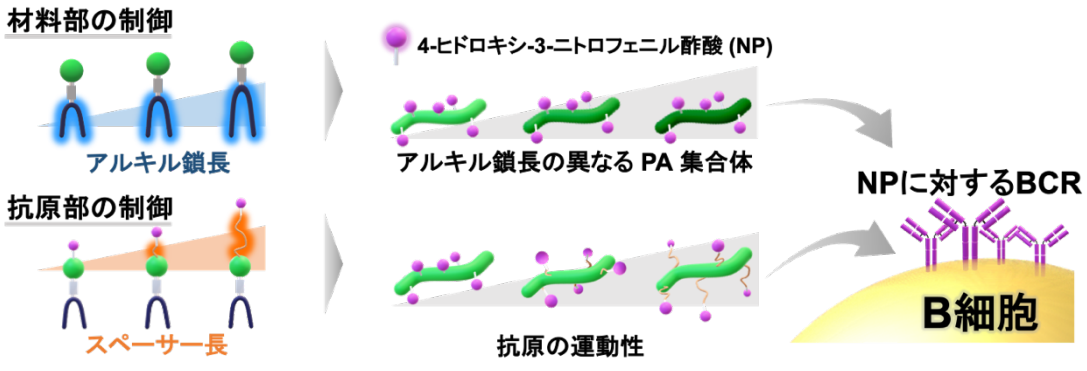


Fig 2. Schematic illustration of this study

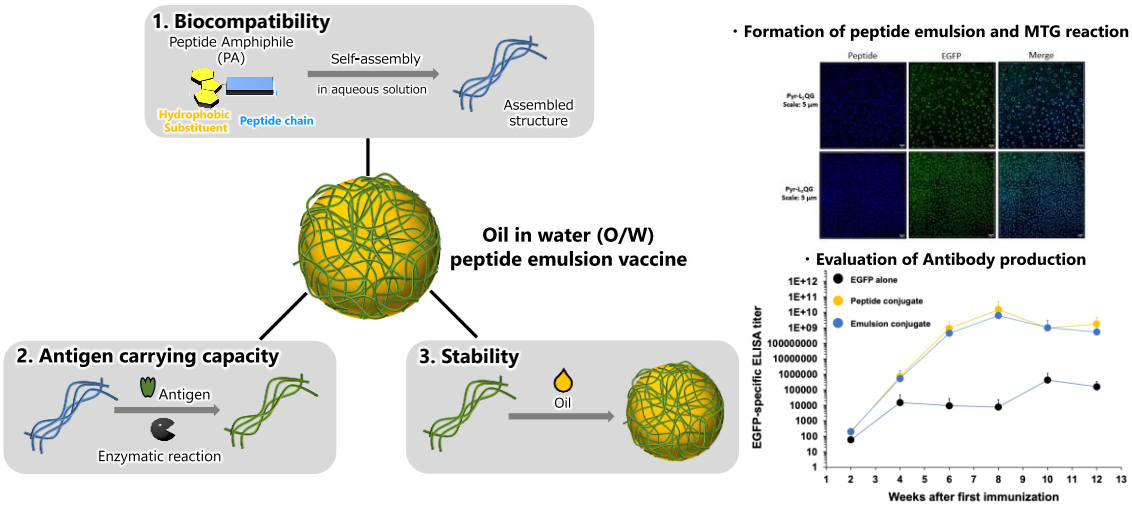
酵素反応性自己組織化ペプチドに基づくエマルション型ワクチンの創製

○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）

Fabrication of emulsion vaccines based on enzyme reactive self-assembling peptides. (Graduate School of Engineering, Kyushu University[1], Center for Future Chemistry, Kyushu University [2]) Higuchi, Ayato[1]; Wakabayashi, Rie[1]; Goto, Masahiro[1, 2]; Kamiya, Noriho[1, 2]

ワクチンによる高い免疫効果を得るためには、抗原と免疫増強効果を有する物質であるアジュバントの同時投与が重要である。Oil-in-water (O/W) 型エマルションは抗原と同時投与することでアジュバント効果を示すことが知られている。そこで本研究では、高い有効性を示す O/W 型エマルションワクチンの創製を目指す。この目的を達成するために界面安定化剤として両親媒性ペプチド (PA) が形成するナノファイバーの利用を考えた[1]。これまでに我々は、グルタミン残基とリジン残基もしくは1級アミンを架橋する酵素である微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) によるタンパク質の部位特異的反応を用いて、PA 集合体上へのタンパク質の集積化に成功しており[2]、この技術を用いることで O/W エマルション界面に存在する PA 構造体上に抗原を特異的かつ安定に担持できるため高い免疫効果が得られることが期待される。

本研究では、MTG 酵素反応性 PA として Pyrene-L_nQG (n = 2, 3) を設計し、リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解させることで集合体を調製した。PA 集合体上に MTG 反応性の Lys 残基を有するモデル抗原タンパク質 EGFP を MTG 反応により導入することで抗原の共有結合的な修飾を行った。抗原タンパク質修飾 PA、共界面活性剤 PEG400、油相に squalene を用いてペプチドエマルションを作製した。マウスを用いた抗原に対する抗体産生評価にて、抗原タンパク質単体を投与した EGFP のみと比較して、抗原タンパク質修飾 PA 集合体とペプチドエマルションは高い抗体産生能を示した。



[1] S. Bai *et al*., *ACS Nano*, **8**, 7005-7013 (2014)

[2] R. Wakabayashi *et al*., *Chem. Commun*., **55**, 640 (2019); R. Wakabayashi *et al*., *Int. J. Mol. Sci*., **22**, 3459- (2021)

ヘムタンパク質の折り畳みと変性の挙動に基づく刺激応答性ゲルの開発

○影山和希・浦山貴大・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Construction of a stimuli-responsive hemoprotein-based hydrogel driven by folding and unfolding behaviors (Graduate School of Engineering, Osaka University) KAGEYAMA, Kazuki; URAYAMA, Takahiro; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

外部刺激に応答して体積や性質を自発的に変化させる刺激応答性材料は、化学センサーやアクチュエーターへの応用を指向する材料として注目されている。このような材料の構築において、構成要素となる分子のミクロな性質をバルク材料の物性に反映する手法は、刺激応答性を発現する有力な戦略である。我々は刺激応答性材料の素材としてタンパク質に着目した。タンパク質は大きな安定化エネルギーを獲得する折り畳み構造を有しており、その構造や機能は pH 変化、温度変化などの外部環境に大きく影響を受けるため、刺激応答性材料の素材として優れている。

本研究では、電子伝達ヘムタンパク質であるシトクロム *c* に着目した（Fig. 1）。シトクロム *c* は補因子であるヘムが 2 つのシステイン残基とスルフィド結合を介してタンパク質マトリクスと結合した構造を有し、ヒスチジン残基およびメチオニン残基がヘムの鉄中心に配位している。シトクロム *c* の折り畳み構造の安定性はメチオニン残基と鉄中心の配位結合と密接に関係しており、メチオニン残基の脱配位により折り畳み構造の一部が崩壊することが報告されている [1]。この配位結合の安定性は鉄中心の酸化還元状態に強く依存し、シトクロム *c* の折り畳み構造の安定性は鉄 2 価の方が鉄 3 価よりも高いことが報告されている [2]。この性質を利用して、鉄中心の酸化還元をトリガーとするタンパク質の折り畳みと変性の過程を追跡する研究が多く行われてきた。本研究では、シトクロム *c* を用いて、鉄中心の酸化還元に伴う折り畳み構造の摂動を作用機序とする刺激応答性ゲルの開発を試みた。

シトクロム *c* の表面には多数のリジン残基が存在しており、このε-アミノ基とグルタルアルデヒドを反応させ、シッフ塩基により架橋し、さらにこのシッフ塩基をシアノ水素化ホウ素ナトリウムで還元した後、フェリシアン化カリウムで鉄中心を酸化することで、シトクロム *c* を構成要素とするゲルを調製した。このゲルを 3.5 M のグアニジン塩酸塩を含む緩衝液に浸漬すると約 2.2 倍の体積に膨潤した。次に還元剤としてジチオナイトと変性剤を含む溶液に浸漬し、鉄中心の還元を行うと、初期の体積の 1.2 倍ほどに収縮した(Fig. 2)。このサイクルは可逆であり、最大 3 回繰り返し可能であることを確認している。ゲルの大きな体積変化を酸化還元により制御することを達成した。種々の対照実験より、これらの体積変化はシトクロム *c* のタンパク質マトリクスが、変性と折り畳みを可逆的に繰り返すことで引き起こされていると考察される。

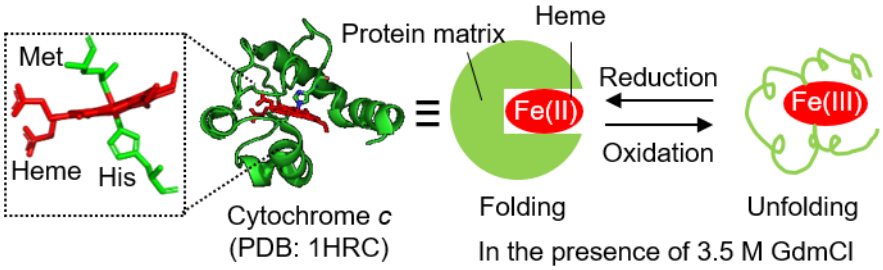


Fig. 1. Redox-dependent folding-unfolding behavior of cytochrome *c*.

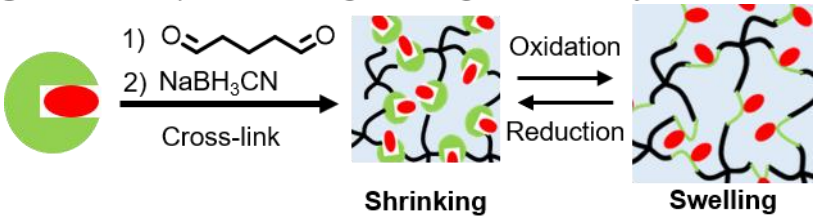


Fig. 2. Preparation of cytochrome *c*-based hydrogel.

[1] D. L. Rousseau *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 17853. [2] H. B. Gray *et al.*, *Science*, **1996**, *271*, 1558.

β-フルオロビニルスルホンアミドを活用するシステイン選択的なコバレントドラッグの開発

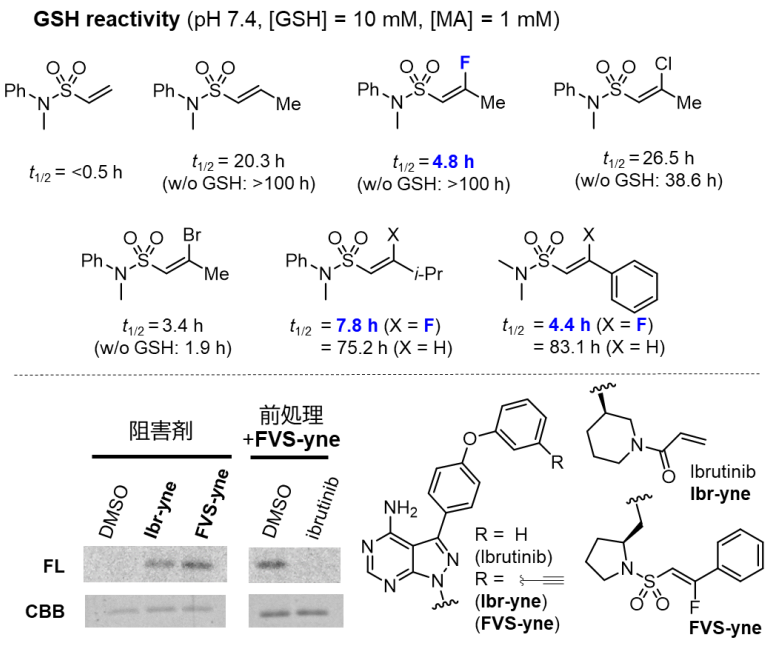
○渡邉俊佑・徳永啓佑・廣瀬侑也・田中雄大・進藤直哉・王子田彰夫（九大院薬）

Development of Cysteine-selective Covalent Drugs Utilizing β-Fluorovinylsulfonamides (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University) WATANABE, Shunsuke; TOKUNAGA, Keisuke; HIROSE, Yuya; TANAKA, Yudai; SHINDO, Naoya; OJIDA, Akio

近年低分子創薬において、標的タンパク質と特異的に共有結合を形成（ラベル化）するコバレントドラッグが注目されている。コバレントドラッグは標的タンパク質と相互作用する「リガンド」部位と、標的タンパク質のアミノ酸残基と反応する「反応基」からなる[1]。これまでにコバレントドラッグの反応基として、システイン残基と反応するアクリルアミドなどのマイケルアクセプター（MA）が汎用されてきた。一方で、β位に置換基を導入した MA 型反応基は反応性が著しく低下することから、従来の MA 型反応基はβ位無置換やアミノメチル置換がほとんどで構造多様性に乏しい。本研究では、これまでに反応基として利用例の少ないビニルスルホンアミドに着目し、反応性のチューニングが可能な新しい MA 型反応基の開発に取り組んだ。

種々のビニルスルホンアミドのシステイン反応性をグルタチオン（GSH）を用いて評価した（図上）。β 位がメチル基で置換されたビニルスルホンアミドは、無置換のものと比べて反応性が大きく低下した。β位をさらに種々のハロゲン原子で置換したところ、β-フルオロビニルスルホンアミド（FVS）は水中安定性を失わずにシステインに対する十分な反応性を示す事がわかった。FVS はフェニル基やイソプロピル基といった比較的かさ高い置換基を β 位に導入する事で、反応性の自由なチューニングが可能であった。一方で FVS は塩基性条件下において、リジン残基に対する反応性を示すが付加体は中性条件下で容易に加水分解される可逆的な反応を示した。

FVS のコバレントドラッグの反応基としての効果を検証すべく、アルキンタグを有する Burton 型チロシンキナーゼ（BTK）阻害剤 **FVS-yne** を合成し、精製 BTK キナーゼドメインをラベル化した（図下）。アルキンタグを TAMRA-N_3 と反応させ蛍光を検出すると、**FVS-yne** のラベル化効率は既承認薬 Ibrutinib の骨格を有する **Ibr-yne** と同程度であった。また、**FVS-yne** の蛍光は BTK キナーゼドメインを Ibrutinib で前処理すると消失したことから、標的システイン残基選択的なラベル化が示唆された。



Reference
1. N. Shindo and A. Ojida, *Bioorg. Med. Chem.*, 2021, **47**, 116386.

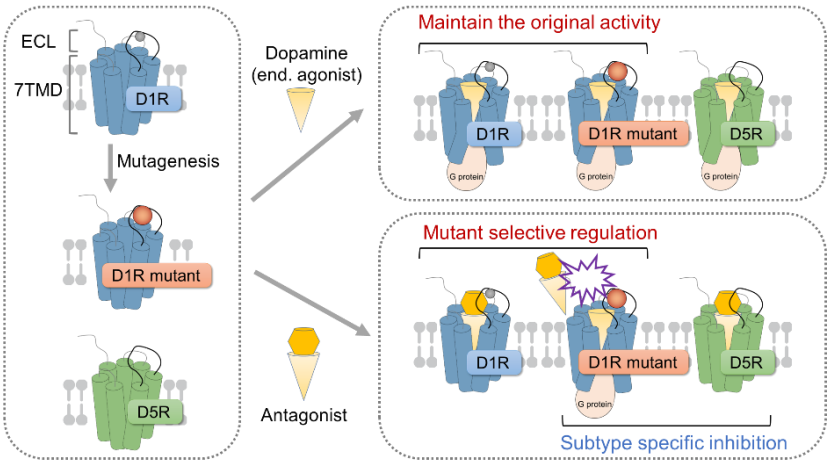
ドーパミン受容体のサブタイプ選択的活性制御を可能にするケモジェネティクス

〇柏 俊太朗・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

***De novo* chemogenetic approach for subtype selective regulation of dopamine receptor activity** (Graduate School of Engineering, Nagoya University) Shuntaro Kashiwa; Tomohiro Doura; Shigeki Kiyonaka

神経伝達物質の一つであるドーパミンは、ドーパミン受容体（DARs）を介したシグナル伝達により運動機能、意欲、快感に関連する行動を制御する。[1] ドーパミンニューロンの失調は、パーキンソン病、統合失調症をはじめとする様々な疾患の原因となることから、それを受容する DARs の機能に対する関心は創薬の面からも非常に高まっている。DARs には 5 種類のサブタイプが存在し、これらは異なる生理機能を有することから、各々のサブタイプの機能を明らかにすべく薬理学や遺伝子工学に基づくアプローチがとられてきた。しかし、DARs のなかでも興奮性のシグナル伝達を担うドーパミン D1 受容体（D1R）とドーパミン D5 受容体（D5R）に関してはサブタイプ選択的な薬剤が存在せず、薬理学的な機能解明は困難である。また遺伝子工学的手法についても過去の報告から、D1R をノックアウトしたマウスでは D1R の欠失に対する代償機構が働くことが示唆されており [2]、既に報告された D1R の生理機能の正当性にも疑問が残る。このような背景から我々は、「受容体本来の機能を維持できる変異を遺伝子工学的に導入した動物個体に対して、変異体選択的に作用する小分子を投与する」ことで D1R と D5R の正しい機能が明らかになると考えた。そこで、当研究室で提唱する化学遺伝学的な GPCR の活性制御法である extracellular-Loop Engineered Chemogenetics (eLEC)の DARs への適用を試みた。

D1R / D5R のうち D1R については多数の構造情報が報告されているため、D1R に対して構造情報を基にデザインを行った。過去の報告から D1R のドーパミン結合部位は 7 回膜貫通ドメイン（7TMD）に存在し、細胞外ループ（ECL）はドーパミンとの結合に影響しないが、人工リガンドとは相互作用することが示唆されている。[3] そこで、D1R の ECL 領域へ立体障害の大きなアミノ酸を導入した変異体作製を行った。また、これら変異体に対してドーパミン活性及び D1R / D5R の阻害剤による阻害能のスクリーニングを行うことで、ドーパミンに対する応答性を維持しながら、野生型よりも阻害能が約 2000 倍低下する変異体と阻害剤のペアを見出した。本手法はドーパミン受容体のみならず、広範な GPCR に対して適用可能な活性制御法となることが期待される。



1) T. Nagai *et al. Neuron* (2016)
2) T. Okubo *et al. Int. J. Dev. Neurosci.* (2018)
3) P. Xiao *et al. Cell* (2021)

シクロオキシゲナーゼを利用した海洋微細藻類におけるプロスタグランジンの生合成

○菊地美穂[1]・松本奈々[1]・鶴雄基[1]・前田義昌[2]・吉野知子[1]・田中剛[1]（[1]東京農工大院工、[2]筑波大院生命環境）

Biosynthesis of prostaglandin by the marine microalga with cyclooxygenase (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology [1], Graduate School of Life and Environmental Sciences, Tsukuba University [2]) KIKUCHI, Miho[1]; MATSUMOTO, Nana[1]; TSURU, Yuki[1]; MAEDA, Yoshiaki[2]; YOSHINO, Tomoko[1]; TANAKA, Tsuyoshi[1]

プロスタグランジン (PG)は C20 脂肪酸からシクロオキシゲナーゼ (COX)により合成される生理活性物質であり、医薬品として広く利用されている。これまでに植物において、COX の異種発現による PG 生産が試みられているが、生産性向上が課題である。そこで当研究室では、PG 前駆体である C20 脂肪酸を高含有する海洋微細藻類 *Fistulifera solaris* に *cox* 遺伝子を導入することで PG 生産を試みている。近年、*F. solaris* と同じ珪藻において COX の存在が示唆されているが、珪藻 COX の機能解析は行われていない [1,2]。本研究では、微細藻類を用いた PG 生産に向けて、C20 脂肪酸を合成する小胞体への COX の局在が PG の生合成に及ぼす影響を評価した。

珪藻 COX の機能解析として、ColbFold を用いて、*Thalassiosira rotula* 由来 COX (TroCOX) 及び *Skeletonema marinoi* 由来 COX (SmaCOX) のアミノ酸配列から立体構造を予測した。予測した珪藻 COX の立体構造を Fig. 1 に示す。TroCOX 及び SmaCOX において、シクロオキシゲナーゼ活性に重要なアミノ酸やペルオキシダーゼ活性に必要なヘム結合部位の立体構造が保存されていることが予測された。したがって、この 2 種の珪藻 COX は機能ドメインを保持しており、PG エンドペルオキシド合成酵素として機能することが示唆された。

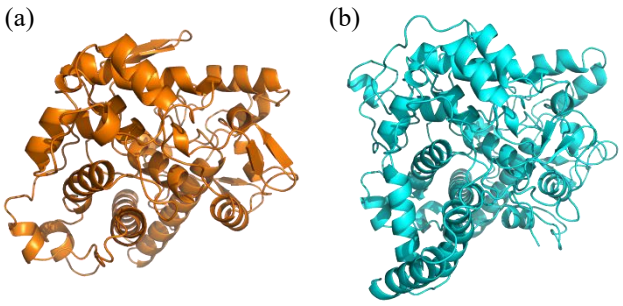


Fig. 1 Superposition of modeled COX structures. (a) TroCOX structure; (b) SmaCOX structure

紅藻 *Agarophyton vermiculophyllum* 由来 *cox* 遺伝子 (*Avcox*)、または小胞体シグナルペプチドを融合した *Avcox* 遺伝子を有するベクターをそれぞれ構築し、*F. solaris* に導入した。AvCOX の発現が確認された形質転換体を選抜したのち、藻体内での PG の存在を確認した。その結果、アラキドン酸由来の PG 3 種 (PGD_2、PGE_2、$PGF_{2\alpha}$)及びエイコサペンタエン酸由来の PG 3 種 (PGD_3、PGE_3、$PGF_{3\alpha}$)が生合成されていることを確認した。さらに、AvCOX に小胞体輸送シグナルペプチドを融合したことにより総 PG 含有量が 1.4 倍向上することが分かった。このことは、PG の前駆体となる C20 脂肪酸が主に小胞体に存在し、COX により効率的に PG に変換されたことを示唆する。一方、PG 以外にもオキシリピンが検出された。これらのオキシリピンがアラキドン酸やエイコサペンタエン酸を前駆体としていることから、PG 合成及び他のオキシリピン合成が競合している可能性があることが示唆された。

1) V. Di Dato, R. Barbarinaldi, A. Amato, F. Di Costanzo, C. Fontanarosa, A. Perna, A. Amoresano, F. Esposito, A. Cutignano, A. Ianora, & G. Romano, *Sci Rep*, 10(1) (2020)
2) V. Di Dato, I. Orefice, A. Amato, C. Fontanarosa, A. Amoresano, A. Cutignano, A. Ianora, & G. Romano, *ISME J*, 11(7), 1722-1726 (2017)

ジクロロトリアジン基をタンパク質反応性基とした金ナノ粒子プローブの開発

○靏野彩加[1]・鴨下潮音[1]・櫻井香里[1]（[1]東京農工大院工）

Dichlorotriazine as a new electrophilic protein label for gold-nanoparticle affinity labeling probes (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1]) TSURUNO, Ayaka[1]; KAMOSHITA, Shione[1]; SAKURAI, Kaori[1]

【背景・目的】　アフィニティーラベリングは生物活性リガンドの標的タンパク質を共有結合により直接ラベル化できるため、標的タンパク質を同定する有用な方法である。個々のリガンドにおける標的タンパク質の構造は多様であり、それらを効率的に探索するためには、親和性やラベル基などのプローブ設計の最適化を可能とする新たな設計指針が必要である。当研究室ではプローブの最適化を効率的に行うため、リガンドとラベル基を任意の組み合わせで高密度に修飾できる金ナノ粒子プローブを開発してきた[1,2]。金ナノ粒子表面においてリガンドとラベル基の局所濃度が高いことを利用し、標的タンパク質に対する親和性と反応性の向上を達成した。また、アフィニティーラベル基として *p*-sulfonyl fluoride 基が有効であることを見出した[1,2]。本研究では種類が豊富な求電子基の中からアフィニティーラベリングに有効な官能基の探索を行うため、求電子基が異なる金ナノ粒子プローブを新たに設計・合成し、それらの反応性を評価した。

【方法・結果】　タンパク質ラベル化へ応用された例のある求電子基を選択した。金ナノ粒子修飾部位として、糖鎖リガンドと求電子基のリポ酸誘導体をそれぞれ合成した。先行研究に基づき、リガンド交換法を用いて糖鎖リガンドと求電子基を共修飾した金ナノ粒子プローブと糖鎖リガンドのみからなるプローブをそれぞれ作製した。モデル系タンパク質に対する結合活性アッセイにおいて、モノマーの糖鎖リガンドと比べて、プローブの結合強度は 40000 倍程度向上することを確認した。各プローブをモデルタンパク質と反応させ、SDS-PAGE および CBB 染色により糖鎖結合タンパク質のラベル化量を解析した。その結果、*p*-sulfonyl fluoride 基を有するプローブが最も高いラベル化効率を示した。次に、アフィニティーラベリングの選択性を評価するため、過剰量の非結合タンパク質共存下において同様に反応させたところ、dichlorotriazine 基を有するプローブが最も効率的かつ選択的にモデルタンパク質をラベル化した。さらに dichlorotriazine 基によるラベル化部位を明らかにするため、ラベル化タンパク質を酵素消化後、LC/MS により解析した。以上から、金ナノ粒子プローブのラベル基として dichlorotriazine 基の有効性が見出された。

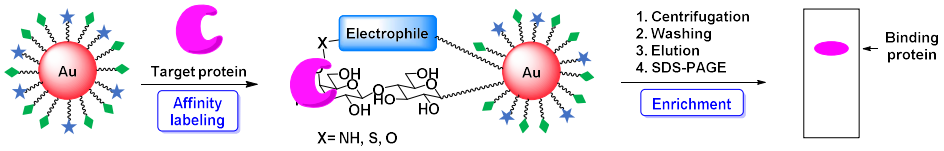


Figure. 1 Reactivity analysis using gold nanoparticle-based affinity labeling probes.

1) N, Suto.; S, Kamoshita.; S, Hosoya.; K, Sakurai. *Angew. Chem. Int. Ed* **2021**, *133*, 2-10.
2) S, Kamoshita.; S, Matsui.; N, Suto.; K, Sakurai. *ChemBioChem.* **2022**, *23*, e202100388.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

シナプスレベルでの光制御を目指した AMPA 型グルタミン酸受容体 covalent inhibitor の開発

○柴田晃大[1]・曽我恭平[1]・浜地格[2]・清中茂樹[1]([1]名大院工、[2]京大院工)

AMPA-type glutamate receptor covalent inhibitor for light control at the synaptic level (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University [2]) SHIBATA, Akihiro[1]; SOGA, Kyohei[1]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

脳は約一千億個もの神経細胞によって構成されており、神経細胞同士が受容体を介して複雑なネットワークを構築することで高次脳機能を発現している。ポストシナプスに発現するグルタミン酸受容体は中枢神経系で主要な興奮性の神経伝達物質受容体であり、特に AMPA 型グルタミン酸受容体(AMPAR)は記憶や学習に関与することが知られている。AMPAR は記憶に際してシナプスのスパイン上での動態がダイナミックに制御されており、活性化に伴い AMPAR の数が増加することで引き起こされる長期増強(LTP)は記憶・学習の基盤となることが知られている。LTP を始めとした AMPAR の挙動は数 μm の範囲に複数存在するスパインごとに制御されているため、局所選択的な AMPAR の活性制御法が求められている。

当研究室では、これまでに AMPAR のアンタゴニストをベースとし、光照射前はアンタゴニストとして機能し、光照射によって親和性が低下する光分解性アンタゴニスト pdNIQX(photo-decomposable *o*-nitrobenzyl quinoxaline dione)を設計した。先行研究では、pdNIQX を用いて光照射部位選択的な AMPAR の活性制御に成功している。本研究では、よりシャープな活性制御を目指し、covalent に AMPAR を阻害する系へと展開した。そこで、Ligand-directed acyl imidazole(LDAI)化学[1)]に着目し、光照射により親和性が低下するアンタゴニスト pdNIQX と acyl imidazole を併せ持つ covalent inhibitor として cpNIQX(covalently inhibitable and photo-releasable *o*-nitrobenzyl quinoxaline dione)を設計し、AMPAR を活性制御することを試みた。AMPAR に cpNIQX を処置すると AMPAR がリガンドを認識し、AMPAR 上の求核性アミノ酸が acyl imidazole を攻撃することで AMPAR に ligand を共有結合的に標識することができる。この状態でグルタミン酸を加えてもエントロピー的に不利なためリガンドとグルタミン酸との交換は起こらない。一方で、光を照射すると共有結合が切れ、親和性が低下したリガンドがグルタミン酸と交換され AMPAR が活性化する。

本研究では、cpNIQX を用いて AMPAR の covalent な阻害に成功したことを報告する。光で共有結合を切断することで、AMPAR の活性が回復することが期待される。

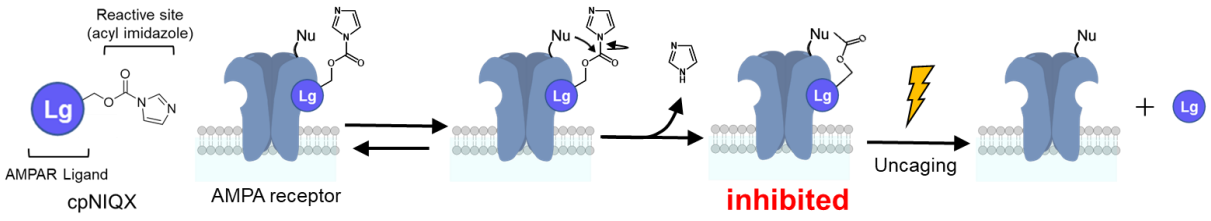


Fig. 1 Inhibition of AMPA receptors using cpNIQX

1) Fujishima, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **134,** 3961-3964 (2012).

配位ケモジェネティクス法の class A GPCR 選択的な活性阻害への展開

○菅原巧人[1]・辻川宗男[2]・三浦裕太[1]・妹尾暁暢[1]・浜地格[2]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]京大院工）

Coordination Chemogenetics for Selective Inhibition of class A GPCR (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University [2]) SUGAWARA, Takuto[1]; TSUJIKAWA, Muneo[2]; MIURA, Yuta[1]; SENOO, Akinobu[1]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

細胞膜受容体の中で最大のファミリーを形成する G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、身体のあらゆる組織に存在し、それぞれの組織で細胞外からのシグナルを細胞内に伝達する役割を果たしている。特に脳神経領域では GPCR の緻密な活性制御が行われており、同じ受容体でも異なる組織に発現していれば、異なる機能をもつと考えられている。そのため、GPCR を組織選択的に制御することができれば、未だ知られていない脳機能の解明や精神疾患のメカニズムの解明につながると考えられている。我々は GPCR の結晶構造に基づいた変異体デザインを行うことで class C GPCR に属する代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の活性制御に成功している [1)]。配位ケモジェネティクス法と名付けたこの手法では class C GPCR に特徴的な細胞外のリガンド結合部位(LBD)近傍に配位性アミノ酸を変異導入することで、金属イオンの配位により LBD の構造変化を人為的に惹起して活性制御を実現した。

本研究では class C 以外の GPCR にも広く適用可能な配位ケモジェネティクス法を開発するため、新たな変異導入位置の模索を行った。我々は全ての GPCR に共通する構造である 7 回膜貫通領域(TMD : TM1-TM7)に着目した。近年の X 線結晶構造解析や CryoEM 構造解析により GPCR の中でも class A に属する受容体の構造変化メカニズムは特に詳細に議論されている。その中でも構造解析が進んでいる adenosine A_{2A} 受容体を標的とした。構造的知見に基づき、受容体の活性化に伴い大きく配向が変化する TM5 と TM6 に金属イオンの配位サイトを導入し、各種金属イオン処置後のアゴニスト応答を評価した。その結果、新たに Cu(II)の配位によって内在リガンドであるアデノシンによる活性を阻害する変異体の取得に成功した。現在、本手法の他の GPCR に対する適用拡大を行なっている。

1) Ojima K., Kakegawa W., Yamasaki T., Miura Y., Itoh M., Michibata Y., Kubota R., Doura T., Miura E., Nonaka H., Mizuno S., Takahashi S., Yuzaki M., Hamachi I., Kiyonaka S. *Nat. Commun.*, **13**, 3167 (2022).

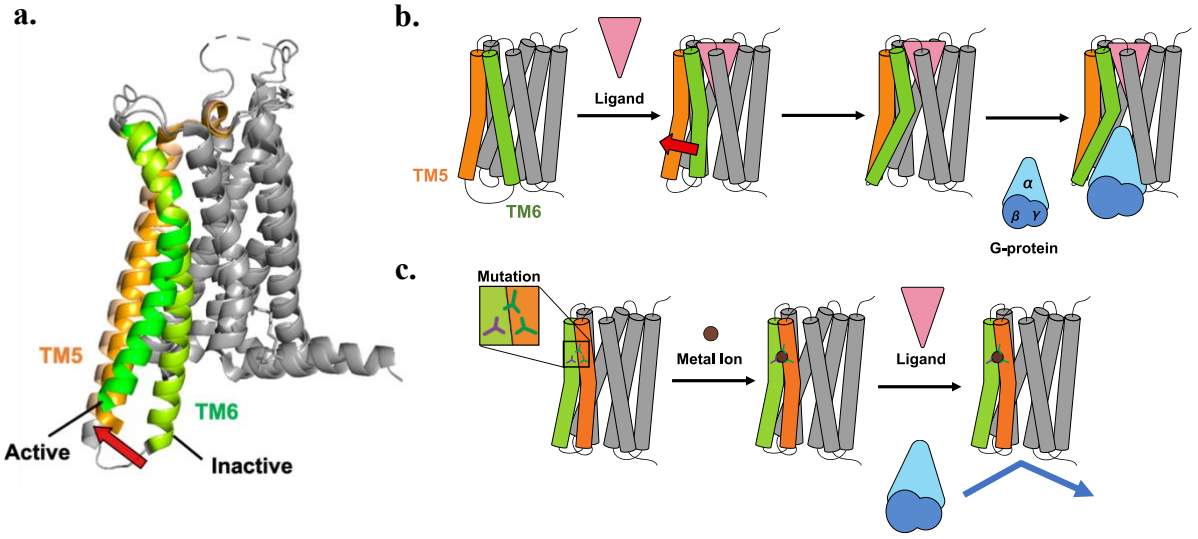


Fig 1. (a) Conformational changes associated with receptor activation (PDB IDs : 3RFM, 5G53). Schematic illustration of activation of class A GPCR by endogenous ligand (**b**) and chemogenetic inhibition of a GPCR mutant by metal ion (**c**).

人工パルミトイル化タンパク質のラフト局在と細胞内送達機構

○内田 和希[1]・大林 洋貴[1]・南畑 孝介[1]・若林 里衣[1]・後藤 雅宏[1]・下川 直史[2]・高木 昌宏[2]・神谷 典穂[1]（[1]九大院工、[2]北陸先端大マテリアルサイエンス）

Artificial palmitoylation of protein controls the raft localization and intracellular delivery

([1]Graduate School of Engineering, Kyushu University, [2]School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology) UCHIDA, Kazuki[1]; OBAYASHI, Hiroki[1]; MINAMIHATA, Kosuke[1]; WAKABAYASHI, Rie[1]; GOTO, Masahiro[1]; SHIMOKAWA, Naofumi[2]; TAKAGI Masahiro[2]; KAMIYA, Noriho[1])

【目的】生体内でパルミトイル化されたタンパク質は、細胞膜上の機能性ナノドメインであるラフトに局在し、多彩な生理機構への関与が示唆されている[1)]。本研究では、パルミトイル化タンパク質の脂質二分子膜上でのアンカリング挙動の理解を目指し、目的タンパク質の人工的なパルミトイル化を介したラフトへの局在化について、生体模倣膜と生細胞を用いた比較検討を行なった。

【方法】微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) が触媒する架橋反応を利用し、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) に部位特異的にパルミトイル基が修飾された EGFP-Pal を得た (**Fig. 1 (a)**)。生体模倣膜として giant unilamellar vesicles (GUVs) を選択し、流動性が高い Liquid disordered (Ld) 相と流動性が低い Liquid ordered (Lo) 相からなる Ld/Lo 相分離 GUV ([DOPC]:[DPPC]:[Cholesterol] = 4:4:2)、Ld 相とゲル相である Solid ordered (So) 相からなる Ld/So 相分離 GUV ([DOPC]:[DPPC]= 5:5) を調製した。また、Rhodamine-DHPE により Ld 相を染色した。一方、生細胞としてヒト白血病性 T 細胞株 Jurkat を選択し、Concanavalin A による Jurkat 細胞の活性化に伴うラフトの局在と内在化を利用して、EGFP-Pal の細胞質内への小胞輸送経路について評価した[2)]。ラフトの標識には蛍光標識 Cholera toxin subunit B (CT-B) を、細胞膜中の Cholesterol の抽出には methyl-β-cyclodextrin (MβCD) を用いた。

【結果と考察】共焦点レーザ顕微鏡 (CLSM) による GUV の観察から、EGFP-Pal はラフトを模した Lo 相に局在することが確認された。また、Cholesterol を欠いた So 相には EGFP-Pal の局在が観察されなかった (**Fig. 1 (b)**)。この結果から、EGFP-Pal は脂質間相互作用によって Lo 相へ局在し、脂質二分子膜中の Cholesterol が局在に重要なことが示唆された。次に、Jurkat 細胞を用いた検討から、EGFP-Pal は濃度依存的に Jurkat 細胞膜にアンカリングし、高濃度条件下において細胞質内への移行と、ラフトクラスターとの共局在が観察された (**Fig. 1 (c)**)。次に、細胞膜のコレステロールを枯渇させた Jurkat 細胞と EGFP-Pal を共培養すると、CT-B および EGFP-Pal の内在化が大幅に抑制され (**Fig. 1 (c)**)、EGFP-Pal の内在化には Cholesterol の存在が重要なことが示唆された。このことから、EGFP-Pal は Jurkat 細胞膜のラフトに局在し、ラフトの一形態であるカベオラに依存したエンドサイトーシスにより内在化すると考えられた。以上の結果から、タンパク質の人工的パルミトイル化によるラフトへの局在の制御と、カベオラを介した細胞質内送達が可能なことが示唆された[3)]。

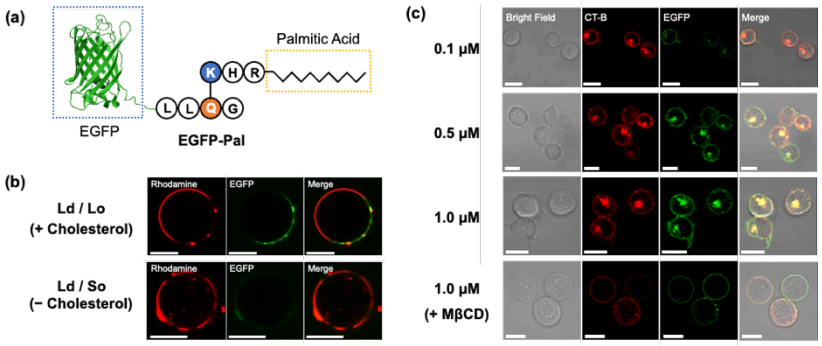


Fig. 1 (a) Schematic image of EGFP-Pal synthesized through MTG reaction which catalyzes the formation of isopeptide bond between Glutamine (Q) and Lysin (K). (b)(c) CLSM images of (b) phase-separated GUVs and (c) Jurkat cells with EGFP-Pal. (bar : 10μm)

1) K. Simons *et al.*, *Nature*, **387**, 569–572 (1997); 2) S. Yabuuchi *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 685–693 (2017); 3) K. Uchida *et al.*, *Langmuir*, 10.1021/acs.langmuir.2c01205.

有機光増感色素とタンパク質により構成される光レドックス人工酵素の開発

○内田裕貴・大洞光司・林 高史（阪大院工）

An Artificial Photo-redox Enzyme Constructed by Incorporation of an Organic Photosensitizer into a Protein (Graduate School of Engineering, Osaka University) UCHIDA, Yuki; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

光による励起エネルギーを利用した光増感色素による光レドックス触媒反応は、通常困難な物質変換反応に対して有用である。近年では、光レドックス触媒と生体触媒を組み合わせることで、光レドックス触媒が促進するユニークな反応と、生体触媒が得意とする基質特異性と立体・位置選択性を組み合わせた、温和な条件下での高選択的な反応系の模索が報告されている[1]。しかし、それらの多くの系は、光レドックス触媒による光反応と生体触媒による光学分割の２段階で立体選択性を発現させており、光レドックス触媒反応の立体選択性の直接制御は限られている。そこで我々は、タンパク質の反応場に光レドックス触媒を配置し、光反応の立体選択性を直接的に制御する光レドックス人工酵素の開発を試みた。本研究では、光レドックス触媒として有機色素である fluorescein を、足場タンパク質として lipocalin をそれぞれ選択した。すでに、lipocalin と fluorescein が結合した複合体の結晶構造は報告されており、光レドックス人工酵素として最適な組み合わせであると考えた[2]。本研究では、lipocalin と fluorescein を複合化した光レドックス人工酵素を用いて、常温・常圧・水中における光誘起イミン還元反応を評価した (Fig. 1)。

初めに、大腸菌を用いて lipocalin を発現し、fluorescein に対する lipocalin の滴定実験から結合定数を 1.6×10^7 M^{-1} と決定した。続いて、既報[3]を参考に 3,4-dihydroisoquinoline 誘導体 **1** の還元反応を目的反応として選択した。Ascorbic acid ($AscH_2$)、チオール系添加剤 (MPA, MPAA) の存在下で、青色 LED の照射によるイミン還元反応に対する lipocalin-fluorescein 複合体 (Lip-Flu) の触媒活性を評価した (Fig. 2)。Fluorescein が触媒として機能し、lipocalin が触媒回転数を向上させることは確認されたが、lipocalin との複合化による立体選択性の発現は達成できなかった。触媒能のさらなる向上や立体選択性の発現には、反応場周辺での水素原子移動の制御が重要であると考え、lipocalin 反応場付近のアミノ酸残基を cysteine に置換した変異体を設計した。遺伝子工学的手法により調製した lipocalin 変異体 (D1C, K38C) と fluorescein の複合体を光レドックス人工酵素として、光イミン還元反応に対する活性を評価し、現在、条件の最適化等を検討している。

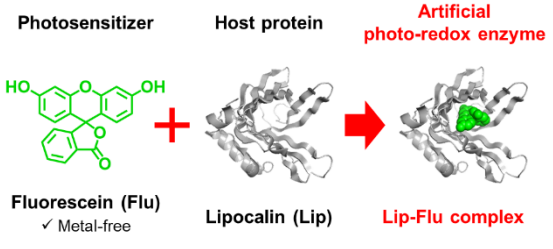


Fig. 1. Construction of an artificial photo-redox enzyme.

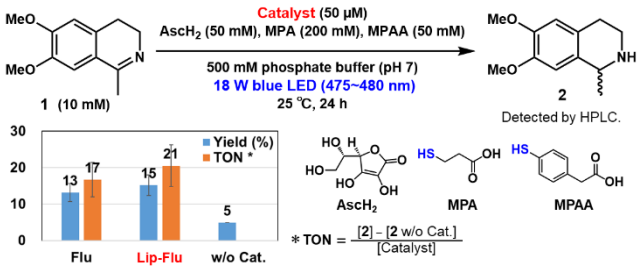


Fig. 2. Evaluation of the catalytic activity toward imine reduction.

1) D. W. C. MacMillan, T. K. Hyster *et al.*, *Science*, **2020,** *369*, 1113–1118.
2) I. P. Korndörfer, G. Beste, A. Skerra, *Proteins*, **2003**, *53*, 121-129.
3) X. Guo, Y. Okamoto, M. R. Schreier, T. R. Ward, O. S. Wenger, *Chem. Sci.*, **2018**, *9,* 5052–5056.

水/イオン液体二相系を用いたシトクロム P450BM3 による菌体内でのプロパン水酸化

○須貝友紀・唐澤昌之・児玉侑朔・有安真也・愛場雄一郎・荘司長三（名大院理）

Hydroxylation of Propane Using Intracellular Cytochrome P450BM3 in Water/Ionic Liquid Biphasic System (Graduate School of Science, Nagoya University) SUGAI, Yuki; KARASAWA, Masayuki; KODAMA, Yusaku; ARIYASU, Shinya; AIBA, Yuichiro; SHOJI, Osami

シトクロム P450BM3 (P450BM3) は、天然において長鎖脂肪酸の亜末端部位を水酸化する酵素である。不活性な C-H 結合を高効率に水酸化可能であり、基質特異性の改変による非天然基質の水酸化が研究されている。特にガス状アルカンの水酸化は、貯蔵、運搬の簡便化や、天然ガスの化成品としての利用に繋がる重要な反応として盛んに挑戦されている。我々の研究グループでは、基質を模倣した小分子 (デコイ分子) により酵素の基質特異性を改変する基質誤認識システムを開発し、デコイ分子の添加により野生型の P450BM3 を用いたプロパンの水酸化に成功した [1] (Fig. 1)。しかし、P450BM3 は反応のために高価な補酵素である NADPH を化学量論量消費するという欠点があるため反応のスケールアップや長時間化は現実的ではない。一方、P450BM3 を発現させた大腸菌を反応容器とし、菌体内で再生させた NADPH を用いて P450BM3 によるベンゼンや一部のベンゼン誘導体の水酸化を達成している [2]。

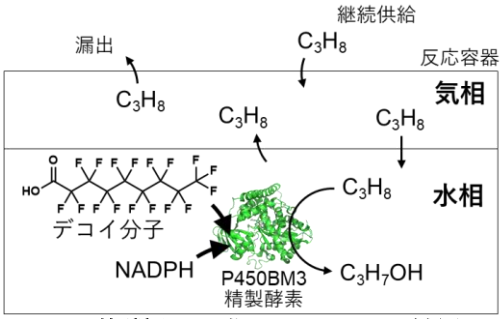


Fig 1. 基質誤認識システムを利用した P450BM3 によるプロパン水酸化 (従来法)

本研究では、P450BM3 の菌体内反応によるプロパン水酸化に取り組んだ。P450BM3 を発現させた大腸菌にデコイ分子を添加し、反応系へプロパンを供給すると 2-プロパノールの生成が確認された。しかし、プロパンが反応系中から容易に抜けてしまうことが課題となった。従来の手法では、基質濃度を一定に保つために継続的にプロパンを供給している (Fig. 1)。これを長時間の菌体内反応に適用すると、ガスの供給量の違いにより再現性が低下する。加えて、多量のプロパンガスが消費される。そこで、イオン液体にプロパンを溶解する水/イオン液体二相系を構築した (Fig. 2)。イオン液体は常温付近に融点を持つ有機イオンの塩であり、不揮発性、難燃性でガスの溶解性が高いという特徴を持つ。イオン液体相が高濃度のプロパンを保持し、水相から抜けた基質が相間の分配によりイオン液体相から補給されると期待した。これにより、反応中に外部からプロパンを供給しなくとも、菌体が存在し反応が行われる水相において、高い基質濃度が長時間維持される。毒性が無く、反応を阻害しないイオン液体として[$P_{6,6,6,14}$][NTf_2] (Fig. 3A) を選択した。二相系で反応を行うと、イオン液体を添加しない場合と比べて 5 倍以上の 2-プロパノールが生成した (Fig. 3B)。水に対するプロパンの飽和濃度 (1.49 mM) を上回る濃度の生成物が得られており、イオン液体相から基質が供給された効果と推測できる。

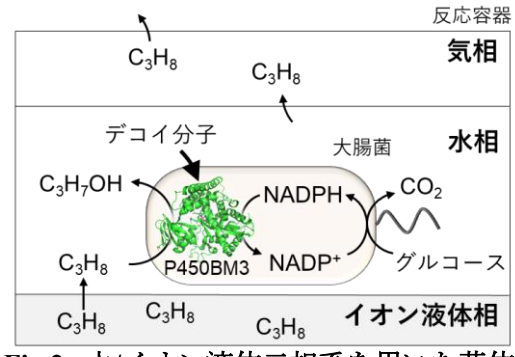


Fig 2. 水/イオン液体二相系を用いた菌体内でのプロパン水酸化 (本研究)

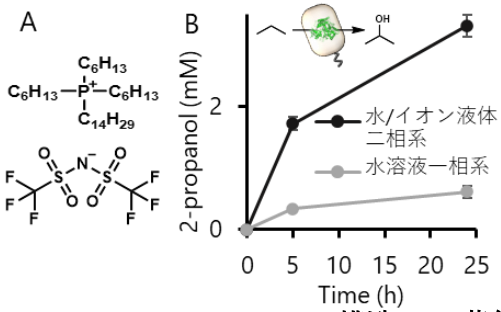


Fig 3. (A) [$P_{6,6,6,14}$][NTf_2]の構造 (B) 菌体内反応の 2-プロパノール収量の経時変化

1) S. Ariyasu, Y. Kodama *et al., ChemCatChem,* **11**, 4709 (2019)
2) M. Karasawa. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 12264 (2018)

細胞膜タンパク質の精密動態解析を可能とする cpHaloTag および二段階ラベル化法の開発

○池下 潤[1]・杉原 佑太朗[1]・清中 茂樹[1]（[1]名大院工）

Combination of cpHaloTag and bio-orthogonal two-step labeling for trafficking studies of transmembrane proteins. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]) IKESHITA, Jun[1]; SUGIHARA, Yutaro[1]; KIYONAKA, Shigeki[1].

細胞膜タンパク質は形質膜上に存在し，外部からの刺激に応答して細胞内にシグナルを伝達する．これら膜タンパク質の動態を追跡することは生理現象の理解や病態の解明，そして創薬科学など基盤技術の発展にもつながると考えられる．膜タンパク質の可視化には蛍光タンパク質やタンパク質タグの融合が広く用いられるが，タンパク質タグを用いる方法では，蛍光標識リガンドを添加したタイミングで可視化でき，高い時間・空間分解能での解析が可能である．その代表例として，共有結合で修飾可能な HaloTag が挙げられる．HaloTag は 30 kDa のタンパク質であり，アルキルクロライド骨格からなるリガンドと選択的に共有結合を形成し，蛍光標識が可能である[1)]．HaloTag は標的タンパク質の N 末端あるいは C 末端に入れることが多い．しかし，タンパク質末端は他のタンパク質の相互作用に関与する可能性があることや，両末端が細胞内に存在する膜タンパク質を細胞表層で可視化できないことが問題である．これらの問題を解決するには，タンパク質の細胞外ループに HaloTag を導入する必要が出てくるが，HaloTag の N, C 末が離れており，細胞外ループに融合すると標的タンパク質に摂動が加わり，機能が損なわれる懸念がある．

本研究では HaloTag 本来の N, C 末をリンカーでつなぎ，新たに N, C 末をつくる circular permutation 法でほどこした circularly permutated HaloTag (cpHaloTag)を膜タンパク質の細胞外ループに融合し，タンパク質への摂動を最小限に留めることに成功した．このように設計された cpHaloTag を TRP チャネルや AMPA 受容体など様々な膜タンパク質に融合させ，生体直交的二段階ラベル化法[2)]で蛍光ラベル化を行った．具体的には，まず HaloTag リガンドに *trans*-cyclooctene (TCO)を連結させた HTL(TCO)用いて標的タンパク質を TCO ラベル化した．HTL(TCO)は疎水性が高く，細胞膜を透過する性質を持つため，細胞内外全ての標的タンパク質が TCO ラベル化されると予想される．続いて蛍光色素を融合したテトラジンを加えることで，迅速かつ選択的に膜タンパク質の局在が示された．このような手法を用いて，従来解析しにくかった膜タンパク質をより詳細な研究ができ，創薬プラットフォームに有用なツールを与えることが期待される．

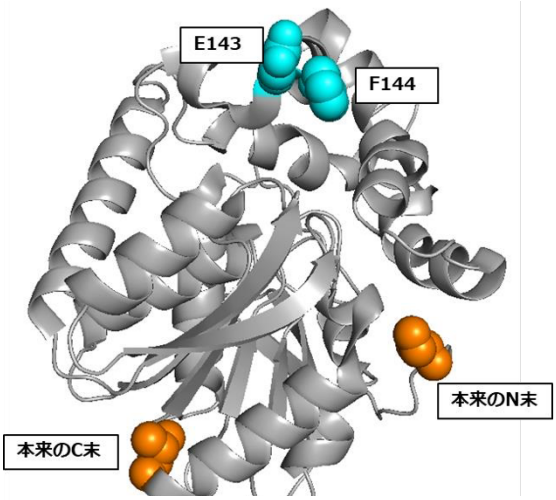


Fig. 1 X-ray crystal structure of HaloTag

1) K. Wood *et al.*, *ACS Chem. Bio.* **3**, 373, (2008).
2) S. Kiyonaka *et al.*, *Nat. Commun.* **12**, 831, (2021).

立体選択的ヘテロ Diels-Alder 反応を触媒する タンパク質金属錯体の開発

○吉岡紗穂[1]・森田能次[2]・藤枝伸宇[2]（[1]大阪府大院生命、[2]大阪公大院農）

Development of artificial metalloenzymes for stereoselective hetero Diels-Alder reaction (Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University[1], Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University [2]) YOSHIOKA, Saho[1]; MORITA, Yoshitsugu[2]; FUJIEDA, Nobutaka[2]

ここ近年､環境汚染と安全性への配慮から有機合成における反応溶媒として､「水」に大きな関心が寄せられている。しかし、水は反応性が高く、使用する触媒が分解することもあり、新しい触媒系の構築が必要である。酵素は水系において有力な触媒の一つであり、細胞内で、消化・呼吸・代謝などに関わる種々の化学反応を触媒する。酵素は既存の触媒に比べて、常温、常圧、中性といった非常に温和な条件下で反応を促進するのみならず、高い位置･立体選択性と基質･反応特異性を発揮する。しかし、一般的に酵素は不安定であり、化学工業的に要望される反応を触媒するものもあまり見つかっておらず、そのままでは利用できない場合がほとんどである。このような問題を解決するため、タンパク質を反応場として遷移金属の反応性を高めた「人工金属酵素」が数多く研究されている。[1]

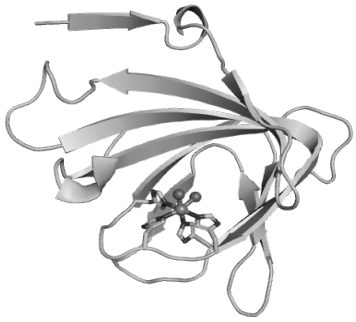
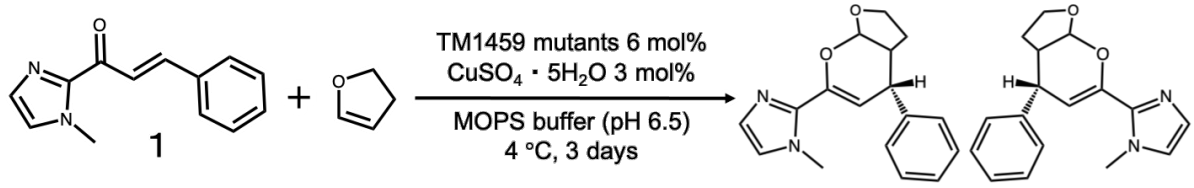


Fig 1. Cupin-type protein (TM1459)

一方で、当研究室では超好熱菌由来の TM1459 タンパク質[2]を用い（図 1)、このタンパク質が持つ 4 つのヒスチジン残基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、第一配位圏にある 4 つのヒスチジン残基のうち 1 つまたは 2 つをアラニンに変異させた変異体(H52A, H54A, H58A, H92, H52A/H54A, H52A/H58A, H54A/H58A, H58A/H92A)を構築した。また、これを用いた立体選択的逆電子要請型ヘテロディールスアルダー反応を行った結果について報告する。

α, β-不飽和アシルイミダゾール誘導体(1)とジヒドロフランを用いたディールスアルダー反応を対象に、タンパク質配位子のスクリーニングを行なった。野生型ではほとんどエナンチオ選択性が見られなかったが、H54A/H58A 変異体を用いた場合、*exo* 体はほとんど検出されず、*endo* 体で高いエナンチオ選択性が見られた。本発表ではさらなる変異導入の結果についても報告する。



Scheme 1. Diels-Alder Reaction of α, β-unsaturated acyl imidazole with dihydrofuran

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. (b) Fujieda, N.; Itoh, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 7717.

立体選択的マイケル付加反応を志向した人工金属酵素の開発

○松本隆聖・吉岡紗穂・丸毛智史・森田能次・藤枝伸宇（大阪公大院農）

Creation of Artificial Metalloenzymes toward Stereodivergent Michael Addition Reaction (Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Osaka Metropolitan University) MATSUMOTO, Ryusei; YOSHIOKA, Saho; MARUMO, Tomohito; MORITA, Yoshitsugu; FUJIEDA, Nobutaka

近年、人工金属酵素(ArMs)の開発に向けた様々なアプローチが活発に行われている[1]。反応の足場とするタンパク質は、結合した金属錯体の水に対する溶解性を向上させ、分解速度を低下させる。そのため、ArMsは金属錯体由来の高い反応性や、立体特異性などの酵素的な能力を活用し、高難度な化学反応も加速させることができる。このように ArMs の触媒作用は非常に有望であるが、金属錯体やペプチドの合成は煩雑であり、労力が必要である。そこで、タンパク質に直接金属イオンを導入することによる簡便な人工金属酵素の構築を目指した。これまでに超好熱菌 *Thermotoga maritima* から得たクピン型タンパク質 (TM1459)を用いて、金属中心の周りにアミノ酸残基を配置した人工金属酵素を開発している[2,3]。この金属結合部位は4つのヒスチジン残基からなり、tris(2-pyridylmethyl)amine (TPA)リガンド系の配位構造と類似の形状をしている。そこで、金属結合部位の 4 つのヒスチジンを変異させることにより、高い立体選択性を持つ酵素の構築を試みた。本研究では、第一配位圏にある 4 つのヒスチジン残基のうち 2 つをそれぞれ、カルボン酸を側鎖に持つアミノ酸とアラニンに変異させた変異体を構築し、硫酸銅を導入することで立体選択的なマイケル付加反応のスクリーニングを行なった。

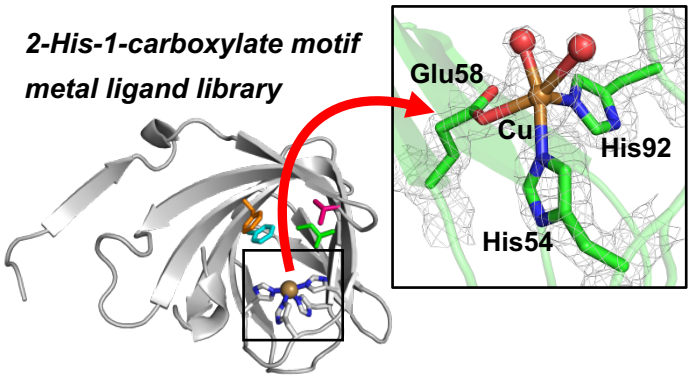
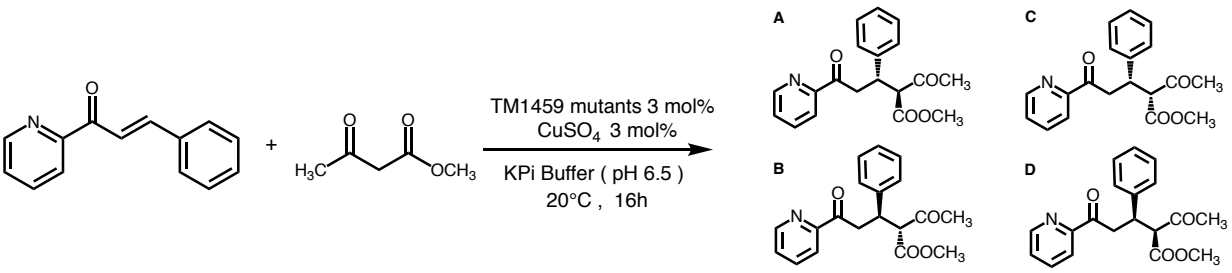


Fig 1. Active Center of TM1459 Mutants; Cu-H52A/H58E

モデル反応として、2-アザカルコンをアクセプター、アセト酢酸メチルをドナーとして用いた 4 つの立体異性体を生成する反応(Scheme. 1)を行なった。野生型を用いた場合には選択性を示さなかった。一方で、構築した変異体をライブラリーとしてスクリーニングしたところ、銅イオンとともに H52A/H58E 変異体(Fig. 1)を添加した際に鏡像異性体過剰率が 96 %を示し、高い立体選択性が見られた。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ライブラリーの拡充について議論する。



Scheme 1. Asymmetric Michael Addition Reaction Catalyzed by Cu-TM1459

1) T. R. Ward et al., *Chem. Rev.* **2018**, 118, 142–231
2) N. Fujieda.; Itoh, S. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 5149 – 5155.
3) N. Fujieda.; Itoh, S. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 7717.

抗 OX40 アゴニスト抗体の相互作用に関する速度論的研究

○氏家寛[1]，田部亜季[2]，長門石曉[3]，津本浩平[1,3,4]（[1]東大・院工・バイオエンジ，[2]国立感染研・エイズ研，[3]東大・医科研，[4]東大・院工・化学生命工学）

Kinetic analysis of the interaction of agonist antibodies targeting OX40. (Dept. of Bioeng., Sch. of Eng., The Univ. of Tokyo[1], Inst. of Med., The Univ. of Tokyo[3], AIDS Res. Center, NIID[2], Dept. of Chem and Biotech., Sch. of Eng., The Univ. of Tokyo[4]) Kan Ujiie[1]; Aki Tanabe[2]; Nagatoishi Satoru[3]; and Kouhei Tsumoto[1,2,4]

TNF 受容体スーパーファミリー（TNFRSF）に属する T 細胞活性化因子 OX40（TNFRSF）を標的としたアゴニスト抗体は，癌免疫療法への応用が期待される(1)一方で，そのシグナル伝達制御の分子メカニズムは未だ解明されていない。本研究では，臨床試験段階にある 4 種類の抗 OX40 アゴニスト抗体の分子認識・受容体制御機構において重要な物理化学的パラメータを明らかにすることを目指した。

まず，表面プラズモン共鳴法（SPR）を用い，センサーチップに固定化した IgG 抗体に対して組み換え発現した OX40 を流すことより，1:1 の分子間相互作用の速度論的解析を行った。すべての抗体-OX40 間の結合を確認し，抗体間で特に OX40 結合の解離速度定数 k_{off} が大きく異なることが解った。続いて，OX40 のドメイン欠損体を用いて SPR を行い，各抗体のエピトープを OX40 の N 末端側 /C 末端側の二種類に分類し，C 末端側に結合する抗体は親和性が高い傾向にあることを明らかにした。

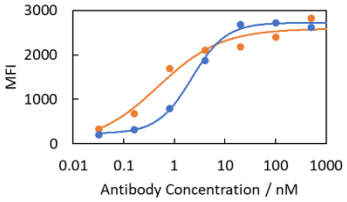


Fig. 1 フローサイトメトリー
青：Tavolixizumab，橙：Revdofilimab

次にフローサイトメトリー法を用いて，細胞表面上に発現する OX40 に対する各抗体の結合活性の評価を行い，結合活性は解離定数 K_D の順位とは異なっていることが解った。速度論的パラメータに着目してみると，むしろ結合速度定数 k_{on} に相関があり，k_{on} が高いほど細胞表面上の OX40 に対する結合活性が強いことが示唆された。

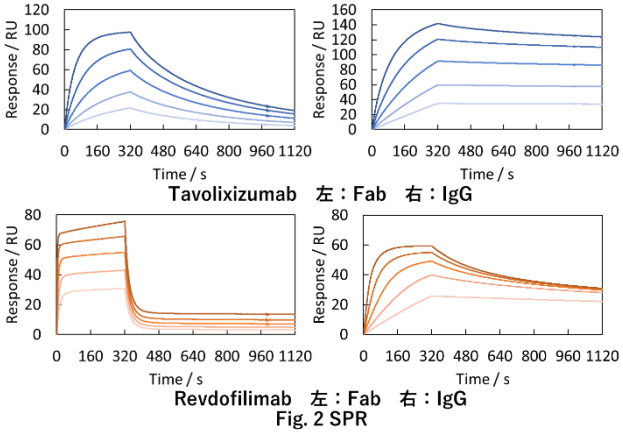


Fig. 2 SPR

このことについて，細胞表面上で OX40 が局所的に発現している場合，一度解離した抗体が再び別の OX40 に結合することで，1 分子同士の k_{on} が，巨視的な細胞表面上の系では解離速度を遅くしている可能性を考えた。そこで，より細胞表面上の相互作用に近づけるため，SPR の系を，OX40 をチップ表面上に固定化し各抗体を流す系に変更し解析を行った。すると，抗体を固定化するときに比べて k_{on} の変化は小さかったものの，k_{off} は著しく変化し，各抗体間で見られていた k_{off} の差が小さくなった。同様の実験を抗体の結合部位を切り出した Fab でも行ったところ，もともとの抗体を固定化した際の速度論的パラメータとほとんど変化がなかったため，全長の抗体を流すことによって起きた k_{off} の変化は，IgG 抗体が持つ二価性によって得られる Avidity 効果によって達成されていることが示唆された。すなわち，結合が速く解離しても，二価の結合によってすぐに結合が回復し，巨視的に見たときに結合の増減がないということが考えられた。

これらのことから，結合部位の k_{on}, k_{off} が遅い抗体は，OX40 の C 末端側に安定に結合し OX40 の距離を一定以内に保つことでアゴニスト活性を示す一方で，k_{on}, k_{off} が速い抗体は N 末端側に結合し，解離と結合を繰り返すことによって OX40 を集合させ，アゴニスト活性を示すことが考えられた。さらに細胞上の OX40 に対する IgG 抗体の見かけ上の結合活性には、高い k_{on} も深く関与していることが明らかとなった。

1) D. N. Khalil et. al., **2016**, *Nat. Rev., Clinical Oncology*, 13, 273-91

Synthesis of cyclic oligo (ethylene glycol) for suppression of amyloid insulin fibrillation ([1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) SAMMANI, Thirasara[1.]; YOSPANYA, Wijak[1.]; WAWRO, Adam M.[1.]; SATO, Kohei[1.]; KINBARA, Kazushi[1.]

Protein aggregation leads to many types of diseases such as type 2 diabetes, Alzheimer's and Parkinson's. [1] There are many types of aggregation suppressors which have been developed to suppress protein aggregation such as water-soluble polymers, amino acid etc. We have demonstrated that monodisperse phenyl terminated oligo (ethylene glycol) (OEG) and cyclic triangular OEG derivatives suppress lysozyme aggregation at 90 ºC. [2,3] Herein, we attempted to synthesize cyclic amphiphilic OEG derivatives, containing hydrophobic and hydrophilic parts, to suppress insulin fibrillation. We developed a technique to obtain the mixture of cyclic OEG drivatives with different molecular sizes, which were separated by a recycling GPC system. Then the hydrophobic parts, which contain methyl benzoate units, were modified with ethanolamine through the transamidation reaction. All compounds were identified by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy.
Next, we scrutinized the effects of cyclic OEG derivatives on insulin fibrillation. The insulin solution was incubated with the cyclic OEG derivatives at 60 ºC in the phosphate buffer (pH 2) for 8 h. After 5 h, unchanged insulin was quantified every 1 h by UPLC. We observed that the unchanged insulin in the solution depleted to less than 1% after 5 h. Then, we used 18-crown-6 ether as a reference cyclic OEG and performed the same experiment. As a result, 18-crown-6 ether did not suppress insulin fibrillation. In contrast, insulin in the presence of monomeric cyclic OEG derivative with weight ratio 1:16 and 1:10, 80% of unchanged insulin remained after 8 hours. Thus, this study demonstrates the importance of amphiphilicity in the design of cyclic OEG derivatives to suppress insulin fibrillation.

Reference

1.Wang, S., Zheng, J., Ma, L., Petersen, R. B., Xu, L., & Huang, K.(2022). Inhibiting protein aggregation with nanomaterials: The underlying mechanisms and impact factors. *Biochim. Biophys. Acta*, *1866*, 130061.

2.Sadhukhan, N., Muraoka, T., Ui, M., Nagatoishi, S., Tsumoto, K., & Kinbara, K. (2015). Protein stabilization by an amphiphilic short monodisperse oligo (ethylene glycol). *Chem. Commun.*, *51*, 8457-8460.

3.Muraoka, T., Adachi, K., Ui, M., Kawasaki, S., Sadhukhan, N., Obara, H., ... & Kinbara, K. (2013). A structured monodisperse PEG for the effective suppression of protein aggregation. *Angew. Chem.*, *125*, 2490-2494.

アデノシン A_{2A} 受容体の細胞種選択的な可逆的制御を指向したオプトケモジェネティックツールの開発

○鈴木啓文・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

Development of an opto-chemogenetics tool for reversible regulation of adenosine A_{2A} receptors in a cell-type specific manner (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SUZUKI, Harufumi; DOURA, Tomohiro; KIYONAKA Shigeki

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は7回膜貫通型タンパク質である。ヒトには800種類以上のGPCRが存在し、人体における様々な生理プロセスを制御しているため、GPCRは重要な創薬標的分子である。しかし、細胞種選択的なGPCRの活性制御は困難であり、個々のGPCRの詳細な機能は未解明な部分が多い。そこで、我々は特定細胞でのGPCRの活性制御を可能とする手法として「eLEC: extracellular Loop Engineered Chemogenetics」という化学遺伝学的手法を提唱している。この手法では、GPCRに保存される7回膜貫通(7TM)ドメインと細胞外ループ(ECL)という特徴的な構造に着目し、ECLにアミノ酸変異を加えることで内在リガンドとの親和性は維持しつつ、デザインした人工リガンドにより変異受容体選択的な活性制御を行う。当研究室ではclass A GPCRに属するアデノシン A_{2A} 受容体($A_{2A}R$)に対してeLECを適用することで、変異型 $A_{2A}R$ 選択的に活性化させる人工リガンドと変異型 $A_{2A}R$ の組み合わせを発見している。

本研究では、人工リガンドに可逆的光異性化能を有するアゾベンゼン構造を光スイッチング部位として導入することで、変異型受容体選択的制御に加え、光照射による局所選択的かつ短いタイムスケールでの可逆的活性制御を可能にすることを目指す。以前に、光スイッチング型リガンドMRS5543が野生型 $A_{2A}R$ に対して *trans* 体では作動薬(agonist)として作用し、*cis* 体では拮抗薬(antagonist)として作用することが報告されている[1]。しかし、MRS5543は野生型 $A_{2A}R$ に対して親和性が低く、熱緩和により迅速に *cis* 体が *trans* 体に異性化するため、光を照射し続ける必要がある点が課題であった。そのため、MRS5543の構造を参考に、新たに熱緩和が十分遅く、変異型 $A_{2A}R$ に対して高親和性で異性体間で異なる活性化能を有する光応答性リガンドを合成し、eLECによる変異型 $A_{2A}R$ 選択性と光による時間分解能を有するオプトケモジェネティックツールの開発研究を進めている。本発表ではその結果について報告する。

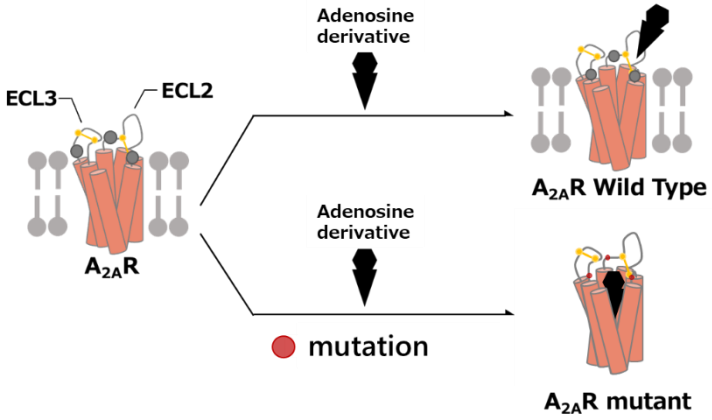


Figure 1. eLECによる受容体選択的制御

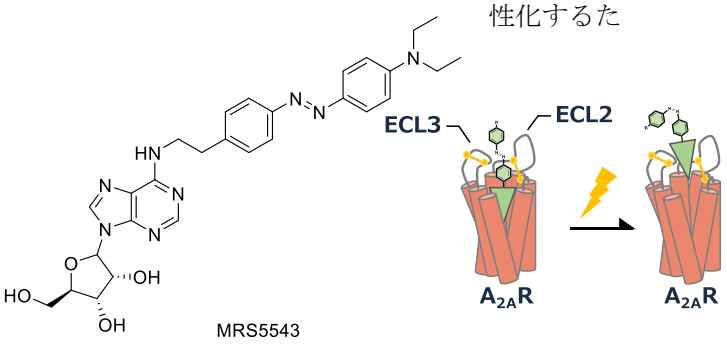


Figure 2. MRS5543の構造とその光制御

1) Bahamonde, M., *et al*. *Bioconjugate Chemistry*, **25**, 1847-1854 (2014)

ミトコンドリア内タンパク質選択的分解技術の開発

○山田若菜[1]・佐藤伸一[1,2]・石川稔[1]・友重秀介[1]（[1]東北大院生命、[2]東北大学際研）

Development of technology for selective degradation of proteins in mitochondria matrix (Graduate School of Life Sciences, Tohoku University[1], Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University[2])
YAMADA, Wakana[1]; SATO, Shinichi[1,2]; ISHIKAWA, Minoru[1]; TOMOSHIGE, Shusuke[1]

近年、生体内のタンパク質分解機構を利用し、標的タンパク質を分解する「プロテインノックダウン法」が注目されており、PROTACs (Proteolysis Targeting Chimeras) をはじめとして、プロテインノックダウンを引き起こす標的タンパク質分解薬が多く開発されている[1]。標的タンパク質分解薬は標的タンパク質の生化学的な機能に関係なく分解できること、その作用が触媒的であることが特徴である。しかし、これまでに開発されてきた手法は、リソソームやオートファジー、ユビキチン-プロテアソーム系など細胞質のタンパク質分解機構を利用するため、ミトコンドリア内のタンパク質には適用できない。昨今、ミトコンドリアの機能と神経変性疾患やがんなど様々な疾患との関連が明らかになっており、ミトコンドリア内タンパク質が創薬ターゲットとして注目されている。そこで、本研究では、ミトコンドリアが持つタンパク質分解酵素を化合物により「ハイジャック」することで、ミトコンドリア内の任意の標的タンパク質のみを選択的に分解する新しい技術の開発を目標とした。ミトコンドリア内のタンパク質分解酵素として Caseinolytic Protease P (ClpP) に着目した。ClpP はミトコンドリアのマトリックスに内在し、活性化されることで非特異的なタンパク質分解が可能になることが報告されている[2]。そこで ClpP の活性化剤と標的タンパク質のリガンドを連結した化合物は、標的タンパク質を強制的に ClpP に近づけ、標的タンパク質の選択的な分解を誘導できると考えた (図 左)。

コンセプト証明を行うために、monomeric streptavidin (mSA) を標的タンパク質として設定した。mSA リガンドの desthiobiton と ClpP 活性化剤として報告されている TR79[2] を連結した化合物 **1** を合成した (図 右)。ClpP により分解されることで蛍光を発するペプチド基質 Ac-WLA-AMC (7-amino-4-methylcoumarin) を用いた実験より化合物 **1** が ClpP を活性化することを確認した。また、[mSA-化合物 **1**-ClpP] の三者複合体が形成されることを pull-down 実験により示した。さらに、mSA、化合物 **1**、ClpP を混合したところ化合物 **1** の濃度依存的に mSA の残存量が減少しており、化合物 **1** の mSA 分解誘導活性が確認できた。TR79 と desthiobiotin それぞれを用いた各種実験から、mSA の分解には化合物 **1** の連結構造および三者複合体の形成が重要であることを明らかにした。加えて、細胞 lysate を用いた夾雑下での実験より、分解が mSA 選択的であることを明らかにした。

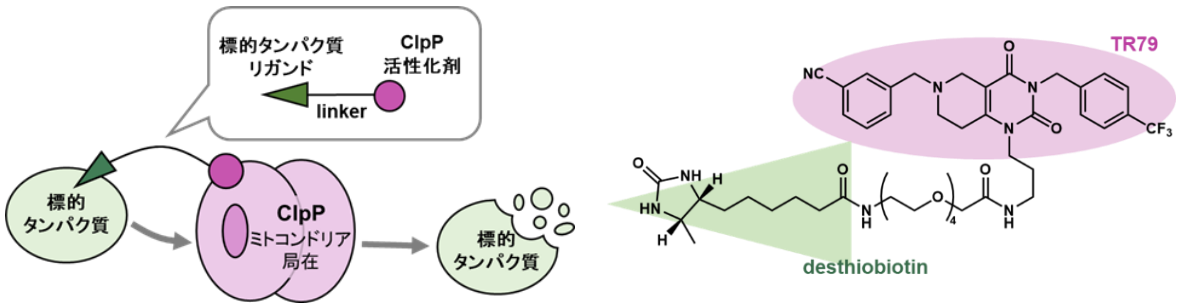


図. 連結化合物による標的タンパク質選択的分解誘導 (左)、化合物 **1** の構造(右)

[1] Zhao, L. *et al.*, *Sig Transduct Target Ther.* **2022**, *7*, 113. [2] Paul, G. *et al., ACS Chem. Biol.* **2019**, *14,* 1020.

サブタイプ選択的拮抗薬の作用機序に着目したアデノシン A_{2A} 受容体のケモジェネティクス制御

○松岡佑真、堂浦智裕、清中茂樹（名大院工）

Chemogenetic regulation of adenosine A2A receptor focusing on the action of the subtype-selective antagonists (Graduate School of Engineering, Nagoya University) Yuma Matsuoka, Tomohiro Doura, Shigeki Kiyonaka Hanako[2]

G タンパク質共役型受容体（GPCR）は細胞膜を介したシグナル伝達により広範な生理学的プロセスに関与し、創薬標的として注目される。同種の GPCR であってもサブタイプや発現細胞種によって異なる機能を持つことが知られるが、薬理学に代表される従来法ではサブタイプ選択性が高い薬剤を用いた GPCR の制御が可能である一方で、細胞種選択的な GPCR の活性制御は困難であった。特定の GPCR の生理機能解明を目指す上で、本来の受容体機能に摂動を与えることなく細胞種選択的に GPCR を制御する新たな手法の開発が求められている。

以上の背景から、我々は特定 GPCR を細胞種選択的に本来の生理応答のタイムスケールで制御する手法として extracellular Loop-Engineered Chemogenetics（eLEC）を提唱している。この手法では、多くの GPCR において細胞外ループ（ECL）が内在リガンドの結合位置である 7 回膜貫通（7TM）ドメインから空間的に離れていることに着目し、ECL にアミノ酸変異を導入する。ECL への変異導入は内在リガンドへの親和性に影響を与えずに、ECL と相互作用する拮抗薬の親和性を変化できると期待した。

本研究では class A GPCR に属するアデノシン A_{2A} 受容体（$A_{2A}R$）へ eLEC を適用し、受容体本来の機能に影響を与えることなく、変異型 $A_{2A}R$ を選択的に制御することを目標とした。変異受容体の設計を行う上で、アデノシン受容体が持つ 4 つのサブタイプ（A_1, A_{2A}, A_{2B}, A_3）のうち、A_1R と $A_{2A}R$ において内在リガンドであるアデノシンに対する親和性が高度に保存されている点に着目した。さらに、様々な $A_{2A}R$ 選択的拮抗薬は A_1R を含めた他のサブタイプへの親和性が低下するように設計されていることから、$A_{2A}R$ の ECL を A_1R の ECL に置換することで、内在リガンドの親和性に影響を与えることなく $A_{2A}R$ 選択的な拮抗薬の親和性のみを低下させることが可能であると考えた。実際に $A_{2A}R$ の ECL の一部を A_1R の ECL で置換した変異型 $A_{2A}R$ を作製し、様々な拮抗薬に対して HEK293 細胞を用いた活性評価を行なったところ、$A_{2A}R$ 選択性が非常に高い拮抗薬において変異型 $A_{2A}R$ 選択的に阻害能が 500 倍以上低下することを見出した。さらに、マウスから単離した初代アストロサイトにおいても本戦略が適用できることを確認したため、本学会で報告する。

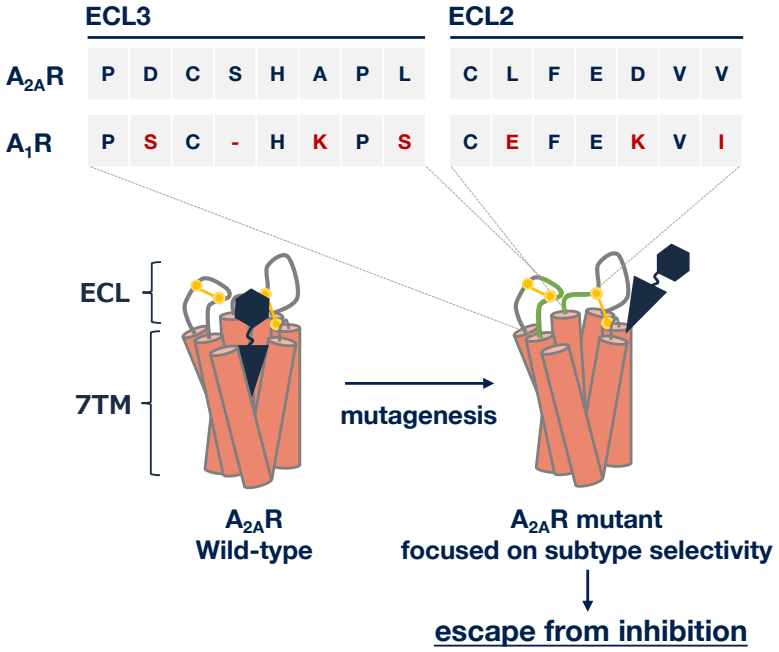


Fig. Outline of chemogenetic regulation of $A_{2A}R$ focused on subtype selectivity

ベンゾフェノンを活用した標的タンパク質へのDNA光標識手法の開発と応用

○日高綾太[1]・森大[2]・西原達哉[1]・田邉一仁[1]（[1]青学大院理工、[2]慶大先端研）

DNA Labeling to Target Protein by Photoreaction of Benzophenone and Its Application (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University[1], Institute for Advanced Bioscience, Keio University[2]) HIDAKA, Ryota[1]; MORI, Masaru[2]; NISHIHARA, Tastuya[1]; TANABE, Kazuhito[1]

タンパク質は酵素や抗体に代表されるように様々な機能を有する生体材料である一方、DNAはDNA origamiなどで活用されるように高いプログラム性を有し、化学合成や化学修飾が容易といった特徴を持つ。近年、これら機能性分子であるタンパク質とDNAを複合化し、新たな機能を有した生体材料の開発が進められている。

現在、タンパク質とDNAを複合化する方法論の構築に向け、様々な研究が展開されているが、数ある手法の中で、光反応を利用したラベル化法は、反応制御が容易であることから、有力な手法として着目されている。この手法は、標的タンパク質に対するリガンドと光反応基を導入したDNAを用い、近接状態を作り出すことでラベル化を実現するものである。この光アフィニティーラベル化法は、非常に優れた方法であるものの、標的タンパク質のリガンドの利用を前提としているため、①標識可能なタンパク質が限定される　②光反応部位の最適化が必須　といった課題を抱えており、汎用性の改善が求められてきた。

以上を踏まえ、本研究では、簡便かつ汎用性の高い新規DNAラベル化法の構築を目指した。具体的には、タンパク質の等電点 (pI) を踏まえた光ラベル化法を設計した。本ラベル化法の概略を次に示す。まず、溶液中のpHをpI以下に調製することでタンパク質を正に帯電させる。続いて、負の電荷を帯びたDNAを添加し、両者を静電相互作用により近接させる。DNAには光反応基であるベンゾフェノンを導入しておき、光照射下で標的タンパク質とDNAを架橋し、タンパク質を標識する (Figure 1)。

本方法論を実証するために、標的タンパク質として牛血清アルブミン (BSA) を選択した。BSAのpI以下のpH条件でBSAとベンゾフェノン、及び蛍光色素FAMを備えたDNA (BP-DNA-FAM) と混合し、光 (365 nm) を照射した。SDS-PAGEを用いて反応を評価した結果、BSAのpI以下のpH条件でのみラベル化の進行を確認することができた 。さらに、ラベル化部位の解析のために、DNAラベル化BSAを消化し、ペプチド断片をLC-MS/MSを用いて解析を行った。その結果、BSA表面、及び、内部でのラベル化反応の進行が示唆され、合計8カ所6種類のアミノ酸が光架橋部位となり得ることを見出した 。

続いて、本研究の汎用性を示すためにレポーター酵素であるβ-ガラクトシダーゼ (β-gal) やIgG抗体に対しても本方法を適用したところ、同様にpI以下のpHでラベル化が達成された。また、得られたDNAラベル化タンパク質は、DNA二重鎖形成能とタンパク質機能をそれぞれ維持していることも確認できた。本発表ではこれらの詳細について報告する。

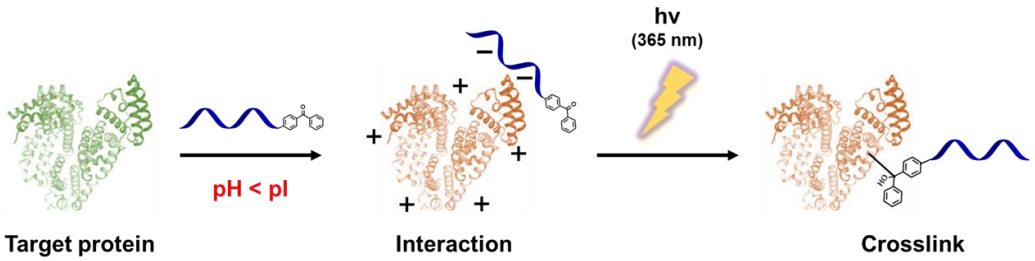


Figure 1. Schematic illustration of photo-induced DNA labeling to target protein.

微小炎症検出を目指した人工抗体の TRAP 提示法による創製

○松尾瑠星[1]・藤野公茂[1]・Jing-Jing Jiang[2]・村上正晃[2]・林剛介[1]・村上裕[1,3]

（[1]名大院工、[2]北大院医、[3]名大ナノライフ）

TRAP display selection of monobodies for the detection of microinflammation. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Medicine, Hokkaido University[2], Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University [3]) Matsuo, Ryusei[1]; Fujino, Tomoshige[1]; Jing-Jing, Jiang[2]; Murakami, Masaaki[2]; Hayashi, Gosuke[1]; Murakami, Hiroshi[1,3]

IL-6 アンプは、多発性硬化症のような免疫病や動脈硬化を起点とした脳血管障害や心血管障害、アルツハイマー病のような認知症などの炎症性疾患を増強する機構である[1]。このような炎症性疾患は血管周辺の微小炎症が拡大することによって発症する。そこで、個体内で IL-6 アンプを特定し微小炎症を検出できれば、疾患の早期治療が可能となると考えられている。

本研究では TRAP 提示法による人工抗体の選択法（図左）[2,3] を用い、IL-6 アンプ関連タンパク質であるマウス IL-6R、CTLA-4、PD-1 を標的としたモノボディ人工抗体の創製を行った。モノボディは抗体医薬品として用いられている IgG 抗体の 1/10 程度の大きさであり、組織浸潤性が高く、PET プローブにすることで高感度に微小炎症を検出することが期待される。まず、Biotin 化した標的と 10 兆種類以上からなる人工抗体/cDNA 複合体を混合した。このうち標的タンパク質に結合する人工抗体をストレプトアビジン磁気ビーズで釣り上げ、得られた人工抗体の cDNA を増幅し、さらに人工抗体/cDNA 複合体を翻訳合成した。この操作を繰り返すことにより標的に結合する人工抗体を濃縮した。得られた cDNA を次世代シーケンサーにより解析後、出現率の高いクローンを精製し、バイオレイヤー干渉法により解離定数の測定を行った。その結果、数 nM レベルの解離定数を持つ人工抗体が得られたことが分かった（図右）。

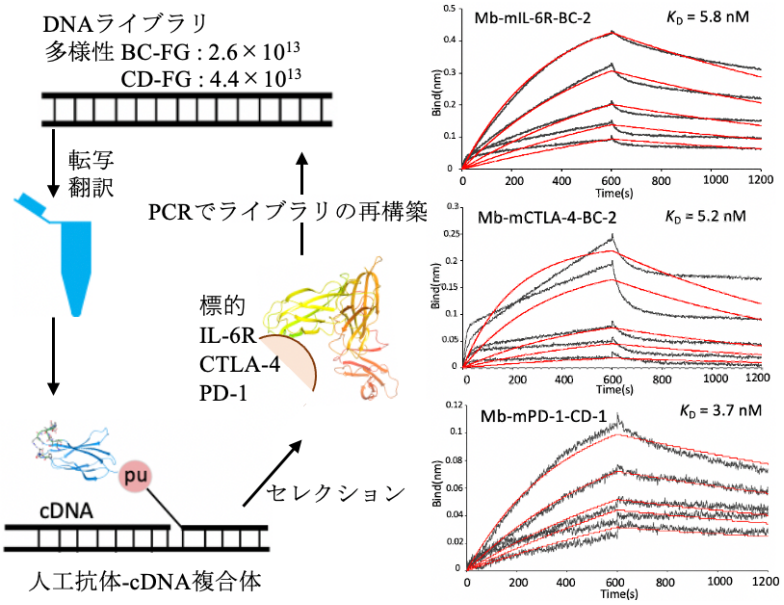


図 マウス IL-6R、CTLA-4、PD-1 に対するモノボディの TRAP 提示法による選択と解離定数

1. Ogura, H. et al., *Immunity*. 2008, 29, 628-636.
2. Ishizawa, T. et al., *J Am Chem Soc*. 2013, 135 (14), 5433-40.
3. Kondo, T. et al., *Sci Adv*. 2020, 6 (42), eabd3916.

AMPA 受容体のサブユニット選択的活性阻害を指向した新規ケモジェネティクス法の開発

○三浦裕太[1]・小島憲人[1,2]・浜地格[2]・清中茂樹[1]（[1]名大院工、[2]京大院工）

Novel Chemogenetics for Subunit-selective Inhibition of AMPA Receptor Activity. (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University [2]) MIURA, Yuta[1]; OJIMA, Kento[1,2]; HAMACHI, Itaru[2]; KIYONAKA, Shigeki[1]

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

このような背景の下、我々は受容体の構造変化に着目した新規ケモジェネティクス法「配位ケモジェネティクス」の開発を進めている。約 30 種存在するグルタミン酸受容体は、グルタミン酸の結合に伴いリガンド結合ドメインが開いた構造から閉じた構造へと変化し、活性化するという共通メカニズムを持つ(Fig. 1a)。我々はその構造変化を利用して、グルタミン酸受容体を人為的に活性化させることに成功した[2,3)]。具体的には、まずリガンド結合部位近傍の上下に配位性アミノ酸である His の変異導入を行う。そこに Pd(bpy)錯体を加えることで変異導入された His と配位結合を形成し、閉構造への変化を誘起して活性化させた(Fig. 1b)。

本研究では、配位ケモジェネティクスによって活性化させる先行研究とは異なり、Pd 錯体の配位子が比較的嵩高いことに着目した。狙った位置に導入した配位サイトへ錯体が配位結合する事で、構造変化に干渉して活性阻害するのではないかと構想した。まず AMPAR の活性化時に大きく構造変化する位置に His を近接するように 2 残基変異導入して配位サイトを作製した。そこに嵩高い錯体を配位させることで、閉構造への変化を妨げて受容体の活性を阻害する事に成功した(Fig. 1c)。本手法により、従来の方法で不可能だったサブユニット選択的な活性阻害の実現が期待される。

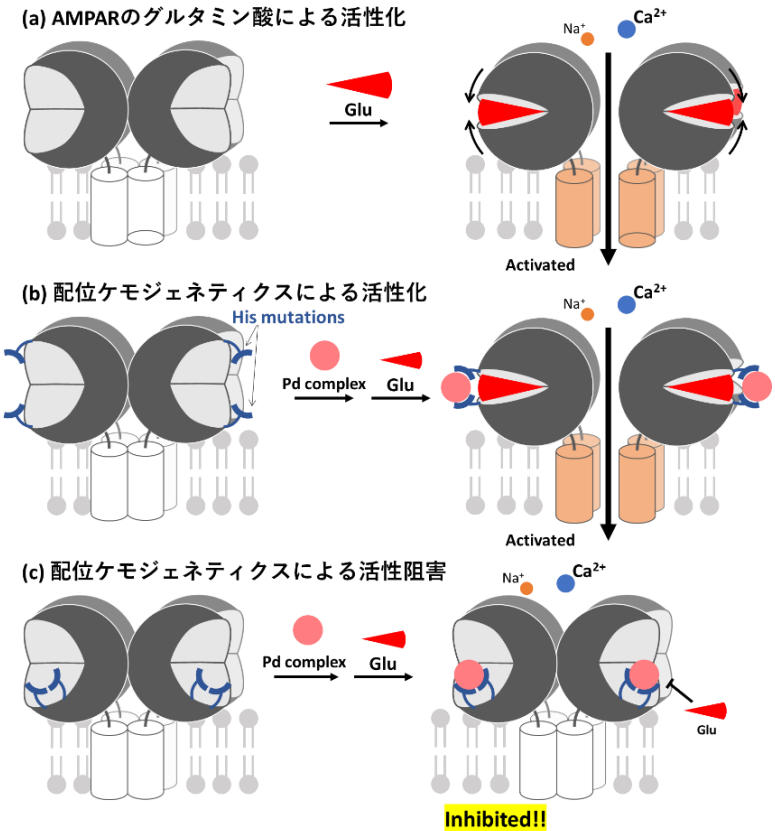


Fig. 1 (a) Glutamate-induced activation mechanism of AMPARs. (b) Coordination-based chemogenetic activation of AMPARs. (c) Coordination-based chemogenetic inhibition of AMPARs.

1) J. M. Henley *et al*, *Nat. Rev. Neurosci.* (2016)
2) S. Kiyonaka *et al*, *Nat. Chem.* (2016)
3) K. Ojima *et al*, *Nat. Commun.* (2022)

効率的なジスルフィド結合形成を用いたシトクロム b_{562} 多量体の調製

○栗原花怜・Julian Wong Soon・大洞光司・林 高史（阪大院工）

Preparation of cytochrome b_{562} oligomers using efficient disulfide bond formation (Graduate School of Engineering, Osaka University) KURIHARA, Karen; WONG SOON, Julian; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

生体内のタンパク質の中には、集合体を形成し、多様な生体機能を示すものがある。近年、高機能バイオマテリアルへの応用を目指し、タンパク質を望みの構造に集合化する手法の開発が盛んに行われている[1]。特に 2 つのチオールが連結したジスルフィド結合は、その安定性と可逆性を両立する特性から、タンパク質間相互作用形成に有用である。しかし、タンパク質間におけるジスルフィド結合形成は一般的に時間を要し、反応がランダムに進行するため、目的とする複合体形成の制御が困難である課題を有する。効率的な形成と制御を達成するには結晶等の特殊な反応環境を必要とするが、適応可能なタンパク質は限定的である[2]。

そこで本研究では、ピリジルスルフィドとシステイン間のジスルフィド結合形成と活性なチオールにおけるジスルフィド交換反応に着目し、効率的なタンパク質間ジスルフィド結合形成法の確立を試みた。ピリジルジスルフィド(PyS)基は求核性官能基であるチオール(SH)基と速やかに反応し、ジスルフィド結合を形成する。これらの官能基をそれぞれタンパク質表面に導入し、反応させることにより、チオール基間での酸化を介したジスルフィド結合の形成が進行する前に、2 種類のタンパク質間で選択的にジスルフィド結合を形成して集合化することを想定した（Fig. 1）。素材となるタンパク質として、単純な構造でヘム（補因子 : 鉄ポルフィリン）の吸収強度により簡便に定量可能なタンパク質であるシトクロム b_{562} (Cyt)を用い、変異導入箇所として Glu49 および Asn80 を選択した（Fig. 2）。

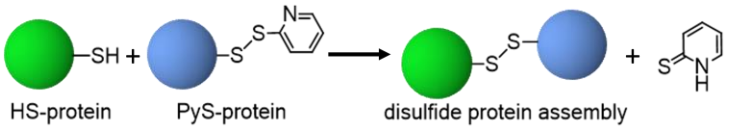


Fig. 1. Disulfide protein assembly via the reaction with 2,2'-dipyridyldisulfide.

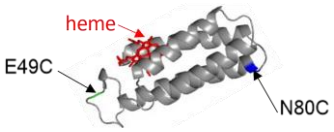


Fig. 2. Structure of cytochrome b_{562}.

大腸菌発現系により、Glu49 または Asn80 をシステインに変異した 3 種類の Cyt 変異体（single mutant: E49C, N80C、double mutant: E49C/N80C）を調製した。各変異体を 2,2'-ジピリジルジスルフィドと反応させると、ピリジルスルフィドが結合した Cyt 変異体（PyS-Cyt、具体的な変異体を示す場合、PyS-N80C 等と省略する）が得られたことを質量分析により確認した。PyS-N80C と E49C を反応させると、ジスルフィド二量体（N80C—E49C）が定量的に形成することが電気泳動と液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS)から示された。また、$(PyS)_2$-E49C/N80C と N80C を反応させると、目的の配列を有するジスルフィド三量体 (N80C—(E49C/N80C)—N80C)が選択的に得られることが同様に確認された。さらに、$(PyS)_2$-E49C/N80C と E49C/N80C を反応させると、多量体が形成することを電気泳動により確認した（Fig. 3）。

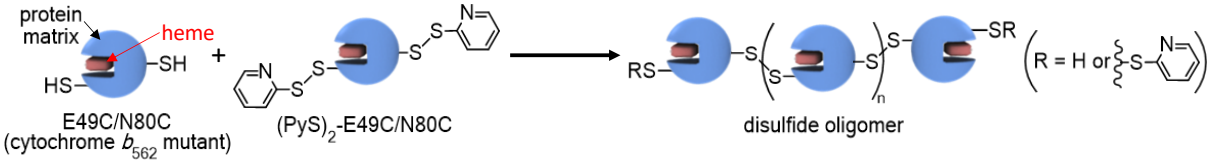


Fig. 3. Disulfide oligomer of cytochrome b_{562} via the disulfide exchange reaction.

1) J. Liu *et al. Chem. Rev.* **2016**, *116*, 13571.　2) T. Ueno, *et al. Chem. Sci.* **2019**, *10*, 1046.

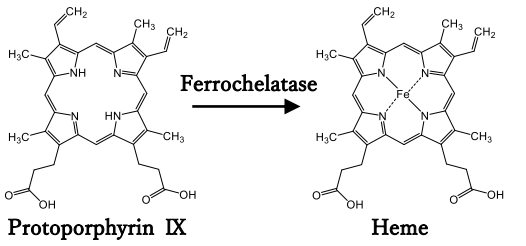
©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

鉄付加酵素 Ferrochelatase 共発現によるシトクロム P450 へのヘム導入効率の向上

○赤川絵理・澤田真希・養王田正文・中村暢文（東京農工大院工）

Improving the efficiency of heme incorporation into recombinant cytochrome P450 by co-expression of ferrochelatase (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology) AKAGAWA, Eri; SAWADA, Maki; YOHDA, Masafumi; NAKAMURA, Nobuhumi

シトクロム P450(P450)は不活性な炭化水素部位へのモノオキシゲナーゼ反応を触媒するヘムタンパク質である。好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 由来 P450 (P450st)は、高い熱安定性と広範囲な pH 耐性を有する。また高価な NADH を必要としない、過酸化水素を用いた簡便な触媒反応が可能なことから、工業的な利用が期待できる。P450 はその活性中心に鉄が導入されたポルフィリン(ヘム)を持つ。これまでの我々の研究において、大腸菌を用いて P450st を発現・精製する際に、ヘム前駆体のプロトポルフィリンIX (PPIX)を有する P450st が生成してしまうことが課題であった。ヘムを持つ P450st は 500～600 nm 付近の吸収波長領域のピークが 2 つに分裂している(Q2)一方で、PPIXを有する P450st は 500～600 nm の吸収波長領域のピークが 4 つに分裂している(Q4)。Q4 は触媒活性が無く、Q2 と比較して熱安定性も低い。大腸菌でヘムタンパク質を発現させると適切にヘムの取り込みが行われないことは他のヘムタンパク質でも問題となっており、ヘム合成過程において PPIXに鉄を付加させる酵素 Ferrochelatase (FC) (Scheme 1)をヘムタンパク質と共発現することでヘムの取り込みを改善する方法が報告されている[1]。当研究室では、FC を P450st と共発現することで Q2 の発現を向上させることを目的として、P450st の発現・精製を行い、これまで定量的に議論されてこなかった Q2 と Q4 の収量の観点から共発現の有効性を評価した。



Scheme 1 The final step in heme biosynthesis catalyzed by ferrochelatase.

His-tag を付加した P450st 及び FC をコードした pETDuet-P450st-FC、そして比較対象として His-tag を付加した P450st のみをコードしたベクター pET-23d-P450st を用いてそれぞれ大腸菌 BL21(DE3)を形質転換・培養した。培地には抗生物質として 100 mg/L アンピシリンを加えた。また、IPTG 誘導時には大腸菌におけるヘム合成の出発物質である 5-アミノレブリン酸を 0.5 mM/L となるように添加した。P450st は熱処理、His-tag 精製、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。精製過程の試料を SDS-PAGE で確認したところ、菌体破砕後の上清及び熱処理後の沈殿に FC (35 kDa)と考えられるバンドが見られ、FC が発現し熱処理によって除去されたことが確認された。FC を共発現した場合、しなかった場合それぞれ 3 回培養・精製を行った。Fig. 1 に得られた Q2 及び Q4 のスペクトルを示す。FC を共発現した場合には Q4 は生成しなかった。FC の共発現により、ヘムのみが導入された P450st のみが得られることが明らかになった。

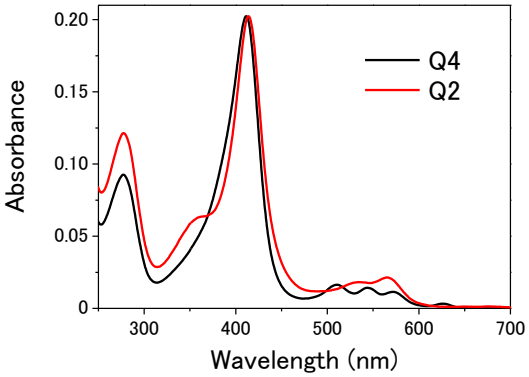


Fig. 1 UV-vis spectra of Q2 and Q4.

1) J. Sudhamsu, M. Kabir, M. V. Airola, B. A. Patel, S. R. Yeh, D. L. Rousseau, B. R. Crane, *Protein Exp. Purif.*, **73**, 78-82(2010).

生体直行反応を用いた架橋性高分子からなる不織布の作製と機能評価

（名工大院工） ○石黒泰良・水野稔久*

〈緒言〉これまで当研究室では、蛋白質や機能性核酸などの生体高分子を不織布繊維内部に内包固定化する手法の検討を検討してきており、紡糸途中に架橋反応が進行する後架橋可能な水溶性高分子を利用する SCES （In ***S***itu ***C***rosslinking during ***E***lectro***S***pinning）法（**Fig. 1**）を確立することで、これらの変性を抑えた繊維内部への内包固定化に成功している。現在までに、有機-無機ハイブリッドゲルを形成するγ-PGA/GPTMS[1]、アクリルアミド(AM)と、側鎖にケト基を持つジアセトンアクリルアミド(DAAM)からなる poly(AM/DAAM)を二官能性架橋剤であるアジピン酸ジヒドラジド(ADH)でヒドラゾン結合を介して架橋することで得られる水和ゲル poly(AM/ DAAM)/ADH[2]、同様にケト基を側鎖に持つメタクリルアミド系高分子 poly(HPMA/DAMA)と ADH の架橋により得られる水和ゲル poly(HPMA/DAMA)/ADH[3]などを、蛋白質の内包固定化が可能な不織布作成の部材として検討を進めてきた。しかし使用する pH によっては架橋反応が切断し利用が難しい、内包する蛋白質量を大きく増やした場合に不織布作製が難しくなるなどの問題点があった。そこで本研究では新たに SCES 法が適応可能な後架橋高分子と架橋剤のペアとして、アジドとアルキン間のヒュスゲン環化反応を用いた生体直行反応により架橋が可能な poly(HPMA/AzMA)と二官能性架橋剤 Bis-propargyl-PEG1 (BP-1)を用いた、不織布作製の検討を行った。

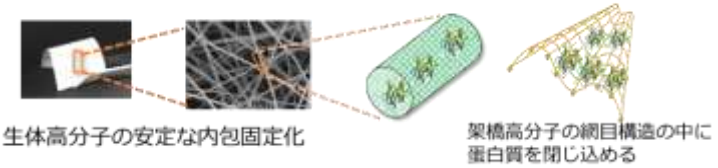


Fig. 1 Novel method to construct the protein encapsulated fibermats via SCES method.

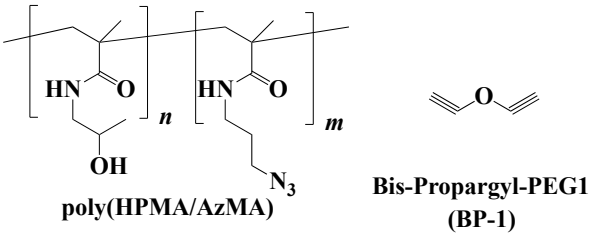


Fig. 2 Chemical structure of poly(HPMA/AzMA) and bifunctional crosslinker, Bis-propargyl-PEG1 (BP-1).

〈実験・結果〉HPMA、AzMA などのモノマー合成は先行研究に倣って行い、さらに架橋点となるアジド基を 15%程度含む Poly(HPMA/AzMA)の合成は仕込み比 HPMA/AzMA = 8:2、AIBN を開始剤に用いたフリーラジカル重合にて行った。^{1}H-NMR、GPC 分析により合成された Poly(HPMA/AzMA)中の HPMA と DAMA のユニット比は 17:3 であり、M_n、PDI は 28 kDa、3.39 であることが分かった。Poly(HPMA/AzMA)に対する架橋剤として、BP1 を選択し、20 wt% poly(HPMA/AzMA)の Tris 緩衝溶液（100 mM, pH 7）に BP-1（ケト基に対して 1/2 当量）、Cu(II)SO_4、アスコルビン酸を添加した溶液を前駆体溶液として電界紡糸することにより、不織布の作製に成功した。詳細なナノ構造や酵素内包挙動などについては、当日発表を行う。

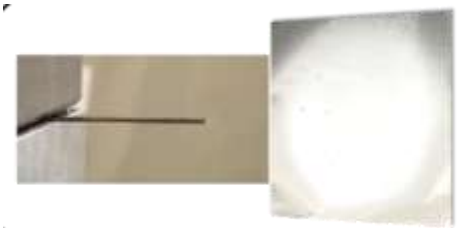


Fig. 3 Electrospinning of the precursor solution (left) and the obtained fibermat of poly(HPMA/AzMA) and BP-1.

[1] S. Koeda & K. Ichiki & T. Mizuno, *Langmuir* 32, 221-229 (2016); [2] Y. Ido & T. Mizuno, *Polymer* **132**, 342-352 (2017); [3] 加藤柚奈、水野稔久「乳酸脱水素酵素を固定化した酵素内包コアシェル不織布の開発」第 71 回高分子学会年次大会

Construction of the enzyme-encapsulated fibermats, using the post-crosslinkable hydrophilic polymers

Taira Ishiguro, Toshihisa Mizuno* (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Showa-ku, Nagoya Aichi 466-8555, Japan)
Tel: 052-735-5641, Fax: 052-735-5237, E-mail: t.ishiguro.415@stn.nitech.ac.jp

原子間力顕微鏡を用いたネスチンテール領域の引張特性

○徳岡里奈 1・内田幸希 1・山岸彩奈 1,2・竹下大二郎 3・吉川千晶 4・山崎智彦 4・上田太郎 5・中村史 1,2（1 農工大院工、2 産総研細胞分子工学、3 産総研バイオメディカル、4 物材研機能性材料、5 早大院先進理工）

Tensile characteristics of nestin tail domain by AFM (Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.[1], Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST[2], Biomed. Res. Inst., AIST[3], Res. Cent. Funct. Mater., NIMS[4], Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ.[5]) TOKUOKA, Rina[1]; UCHIDA, Koki[1]; YAMAGISHI, Ayana[1,2]; TAKESHITA, Daijiro[3]; YOSHIKAWA, Chiaki[4]; YAMAZAKI, Tomohiko[4]; UYEDA, Q.P. Taro[5]; NAKAMURA, Chikashi[1,2]

細胞内部では、アクチンフィラメント、微小管、中間径フィラメント(IF)が相互に結合し、3 次元的なネットワーク構造を形成することで、細胞形態の維持に重要な役割を担っている。このうち IF は、N 末端側からヘッド、ロッド、テールの 3 領域から成るタンパク質で構成されており、細胞の弾性維持に寄与している。また IF は細胞骨格としての役割だけでなく、様々なタンパク質が結合する足場としても機能している。IF の一種であるネスチンは、高転移性のがん細胞に高発現であることが報告されている。ネスチンは 170 kDa もの巨大なテール領域がその大きな特徴であり、転写関連因子が結合することも報告されているが、その詳細な機能は不明であった。これまでの我々の研究から、ネスチンはテール領域の C 末端側でアクチンに結合することが示唆されている。このことから、巨大なネスチンテール領域が可逆的に伸展・収縮する特性を持つと推察し、この構造変化によってテール領域に結合した転写関連因子が解離し、核移行することで下流の遺伝子発現が調節されているのではないかと考えた。そこで本研究では、原子間力顕微鏡(AFM)のカンチレバーにネスチンテール領域の N 末端側を修飾し、C 末端側のアクチン結合部位を基板上のアクチン繊維に結合させ、引張試験を行うことで、同テール領域が伸展可能な構造を取るのか、その機械的特性を調査することを目的とした。

ガラス基板を APTES で修飾し、グルタルアルデヒドを介してアクチン繊維を固定化した。一方 AFM 探針(バネ定数 0.04 N/m)は NTA-アミンで修飾し、N 末端に His-tag を付加したネスチンテール領域を Ni-NTA 経由で固定化した。基板上のアクチン繊維にネスチンテール固定化探針を接触させ、基板から引き離す際のフォースカーブを解析した結果、アクチン繊維が固定化された箇所で特異的にタンパク質の伸展を示す特徴的なフォースカーブが得られた。このフォースカーブを Worm-like chain model でフィッティングし高分子鎖の長さを表す経路長 を算出した結果、約 0.45 μm であり、ネスチンテール領域の最大伸展長の約 8 割に達することが分かった。さらに、算出された持続長は 84 pm であり、過去に報告されている他のタンパク質の持続長と比較しても短いことから、ネスチンテール領域は非常に柔らかい分子であることが示唆された。以上より、ネスチンはテール領域の C 末端側でアクチンと結合し、ネスチンテールーアクチン間の結合より弱い力で大きく伸展することが示唆された。また、現在ネスチンに結合する転写関連因子として Clic1 に着目しており、ネスチンーClic1 の結合を抗体修飾ナノニードルで評価した結果についてもあわせて報告する。

環境調和を志向したブロモラクトン合成酵素の開発

○松浦拓哉・知名秀泰・中村卓・向井秀仁（長浜バイオ大院バイオサイエンス）

Development of eco-friendly bromolactone synthase (Laboratory of Peptide Science, Graduate School of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology) MATSUURA Takuya; CHINA Hideyasu; NAKAMURA Takashi; MUKAI Hidehito

不飽和カルボン酸のハロラクトン化反応は、環構造形成と共に更なる誘導化に有用なハロゲン原子を導入することから、様々なラクトン類の精密合成に用いられている。犠牲試薬として化学量論量のハロゲン化試薬を用いる有機化学的手法では反応後に環境負荷要因となり得る廃棄物を与えるが、環境中にありふれた無機ハロゲン化物塩とグリーン酸化剤の過酸化水素を用いる酵素化学的手法は反応後の廃棄物を最小限に留める。しかし、環境調和に優れた後者を利用するためには、有機溶媒安定性に優れた合成用酵素が求められる。近年、バナジウム依存型ブロモペルオキシダーゼを用いた酵素学的ハロラクトン化反応の例が限定的に報告されているが、酵素内で発生した低分子活性種の次亜ハロゲン酸と不飽和カルボン酸の反応が非酵素学的経路を経るため、反応選択性に本質的な課題が残った[1,2]。このような中、我々は上記のタイプとは異なるカルボン酸依存型ブロモペルオキシダーゼ（C-BPO）において有機溶媒中で利用可能な BPO-A1 を見出しており[3]、基質が活性中心に結合する触媒様式をとる本酵素では、特に反応選択性の改善が期待された。また、*Streptomyces aureofaciens* 由来の本酵素は比較的高い有機溶媒安定性を有しているが、基質汎用性の拡大には更なる酵素安定性が求められる。

本研究では、BPO-A1 のブロモラクトン化反応の検討と極性アミノ酸オリゴペプチド付与による有機溶媒安定性の改良を試みた。前者においては、複数の C-BPO の反応選択性を比較した結果、*exo*/*endo* 比から BPO-A1 の *exo* 環化選択性が最も高いことが明らかになり、また BPO-A1 は複数の不飽和カルボン酸に基質汎用性を示した (Fig 1A)。一方、後者においては、酵素活性に影響を及ぼさない BPO-A1 の C 末端に各種極性アミノ酸オリゴペプチドを付与した結果、塩基性アミノ酸ポリペプチド類（His_8、Lys_8、Arg_8）が BPO-A1 の有機溶媒安定性を高めることが示唆された (Fig 1B)。

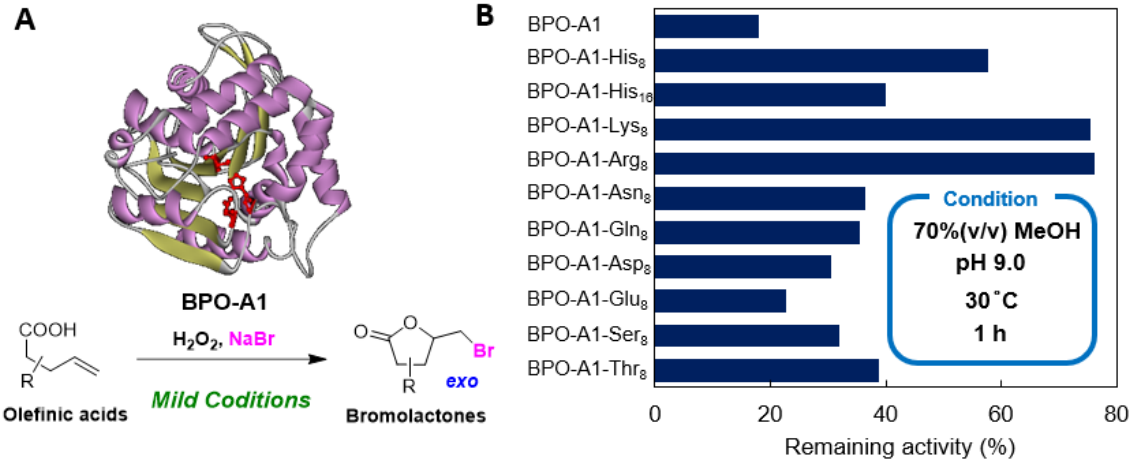


Fig 1. (A) Bromolactonization of olefinic acids using carboxylate-dependent bromoperoxidase BPO-A1 from *Streptomyces aureofaciens*. (B) Organic solvent stability of BPO-A1 with oligopeptides at its C-terminus against 70%(v/v) MeOH.

1) F. Hollmann *et.al.*, *ACS Sustainable Chem. Eng.* **8**, 2602 (2020).
2) F. Hollmann *et.al.*, *ChemSusChem* **13**, 97 (2020)
3) H. China, H. Ogino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **516**, 327 (2019).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

mRNA 非翻訳領域における A-to-I RNA 編集が翻訳過程に与える影響の解析

○緒方 悠岐・福田 将虎（福岡大・理・化学）

Impact of A-to-I RNA editing in mRNA untranslated regions on the translation process ([1]Dept. Chem., Graduate School of Science, [2]Fukuoka Univ.Dept. Chem., Fac. Sci., Fukuoka Univ.) Yuki Ogata[1], Masatora Fukuda[1,2]

生体には RNA 中のアデノシン(A)を脱アミノ化し、イノシン(I)に変換する A-to-I RNA 編集機構が存在する。mRNA に生じた I は、その化学的類似性によって翻訳過程ではグアノシン(G)として認識されるため、A-to-I RNA 編集はアミノ酸コドンを変換することができる。これまでに、AUA コドン（イソロイシンコドン）の A-to-I RNA 編集により生じた AUI コドンがタンパク質翻訳の開始点として機能することが報告されている[1]。また、生体内には同一の mRNA 上に複数の翻訳領域があるポリシストロニックな遺伝子が存在し、上流の遺伝子の翻訳が下流の遺伝子の翻訳量に影響することも報告されている[2]。以上の知見から「5’-非翻訳領域(untranslated region: UTR) で生じる A-to-I RNA 編集が、新たな翻訳領域を生成、または既存の翻訳領域を削除し、下流のタンパク質翻訳を制御する」という、A-to-I RNA 編集を介した遺伝子制御機構が考えられる。

本研究では、上記の A-to-I RNA 編集による遺伝子制御機構を実験的に証明することを目的とし、独自に設計したモデル配列を用いた研究を行なっている。まず、AUI トリプレットが開始コドンとして機能するかを確認するため、ルシフェラーゼ（Luc）mRNA のオリジナルの開始コドン AUG を AUA コドンに置換したモデルレポーターRNA を設計した。このレポーターmRNA に対して、ガイド RNA と組換え ADAR2 を用いた RNA 編集反応を行い[3]、開始コドンの位置に AUI トリプレットを有するレポーターmRNA を取得した。次いで、得られたレポーターmRNA を用いて in vitro 翻訳反応を行い、発光強度測定により Luc の発現量を解析した。結果、AUA≥AUI＞AUG の順となり、確かに A-to-I RNA 編集により、新たな翻訳開始点が生成できることを確認した。次いで、Luc mRNA の 5'-UTR に AUG トリプレットを挿入したレポーターRNA を新たに構築し、挿入した AUG を IUG に変換することで、上流翻訳領域の欠失による遺伝子発現への影響を評価した。結果、Luc の発光強度は AUG＜IUG≒GUG となり、上流の AUG を IUG に変換することで下流の翻訳領域の翻訳量が増加することが示された。以上の結果は、非翻訳領域の A-to-I RNA 編集が遺伝子発現量を制御できることを示唆している。本発表では、上記 in vitro での実験結果に加え、培養細胞内で評価した結果も併せて報告する。

1. Vogel P. et al., ACS Synth Biol., 6(9), 1642-1649(2017).
2. Karginov T. A. et al., Trends Genet.,33(2), 129-142(2017).
3. Fukuda M *et al., Sci. Rep.*, **7,** 41478 (2017).

Closing Remarks

Mon. Sep 12, 2022 4:30 PM - 5:30 PM JST | Mon. Sep 12, 2022 7:30 AM - 8:30 AM UTC | Online Site A Online Streaming

Closing Remarks

4:30 PM - 5:30 PM JST | 7:30 AM - 8:30 AM UTC

[3E-1630-1add] Closing Remarks

Closing Remarks | Closing Remarks

Closing Remarks

Mon. Sep 12, 2022 4:30 PM - 5:30 PM Online Site A (Online Streaming)

4:30 PM - 5:30 PM

[3E-1630-1add]Closing Remarks

©Division of Biofunctional Chemistry, The Chemical Society of Japan, Biotechnology Subcommittee

Oral Session

Mon. Sep 12, 2022 10:00 AM - 12:00 PM JST | Mon. Sep 12, 2022 1:00 AM - 3:00 AM UTC | Online
Site B Online Streaming

Online Session

Chair: Hiromu Kashida (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

10:00 AM - 10:20 AM JST | 1:00 AM - 1:20 AM UTC

[3ONB-01] Design of fluorescent probes based on triplex-forming PNAs targeting the influenza A virus RNA promoter region

*Yusuke Sato[1], Hiromasa Miura[1], Takaaki Tanabe[1], Seiichi Nishizawa[1] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University)

10:20 AM - 10:40 AM JST | 1:20 AM - 1:40 AM UTC

[3ONB-02] Formation of double-stranded DNA assemblies and their properties under crowded conditions

Tetsunao Makino[1], Yuuki Yamaguchi[1], *Makiko Tanaka[1] (1. The University of Electro-Communications)

10:40 AM - 11:00 AM JST | 1:40 AM - 2:00 AM UTC

[3ONB-03] Development of new membrane permeable oligonucleotides for therapeutics

*Fangjie Lyu[1] (1. Graduate School of Science ; School of Science, Nagoya University)

11:00 AM - 11:20 AM JST | 2:00 AM - 2:20 AM UTC

[3ONB-04] Novel non-aqueous solvents in life sciences

*Kosuke Kuroda[1], Yui Kato[1], Tetsuo Komori[1], Kenji Takahashi[1], Kazuaki Ninomiya[1], Kojiro Ishibashi[1], Eishu Hirata[1] (1. Kanazawa University)

11:20 AM - 11:40 AM JST | 2:20 AM - 2:40 AM UTC

[3ONB-05] Studies on the new method for an antibody to be converted to its catalytic antibody

*Emi Hifumi[1,2], Tamami Nonaka[1], Hiroaki Taguchi[3], Taizo Uda[4] (1. Institute for Research Management, Oita University , 2. Research Center for GLOBAL/LOCAL Infectious Diseases, Oita University, 3. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science, 4. Institute of Systems, Information Technologies, and Nanotechnologies)

11:40 AM - 12:00 PM JST | 2:40 AM - 3:00 AM UTC

[3ONB-06] Immunostimulatory Effect of Phosphodiester-based CpG Oligodeoxynucleotides using an Antiparallel Guanine-Quadruplex Structure as a Scaffold

*TOMOHIKO YAMAZAKI[1,2], Fika Ayu SAFITRI[1,3], Anh Thi Tram TU[1,2], Nguyen Bui Thao LE[1,2], Soumitra PATHAK[1,2], Kaori TSUKAKOSHI[4], Kazunori IKEBUKURO[4] (1. Research Center for Functional Materials, National Institute for Materials Science, 2. Graduate School of Life Science, Hokkaido University, 3. Bandung Institute of Technology , 4. Graduate School of Technology, Tokyo University of Agriculture and Technology)

A 型インフルエンザ RNA プロモーター領域を標的とした三重鎖形成性 PNA を基盤とする蛍光プローブの設計と応用

○佐藤雄介[1]・三浦弘真[1]・田邊貴昭[1]・西澤精一[1]（[1]東北大院理）

Design of fluorescent probes based on triplex-forming PNAs targeting the influenza A virus RNA promoter region (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University[1]) SATO Yusuke[1]; MIURA Hiromasa[1]; TANABE Takaaki[1]; NISHIZAWA Seiichi[1]

A 型インフルエンザウイルス（IAV）は遺伝子変異に由来する薬剤耐性株の出現が問題となっており、新たな抗ウイルス薬の開発が求められている。IAV の RNA にはプロモーター領域と呼ばれる、A 型インフルエンザ株全体にわたって高度に保存されている領域があり、新たな創薬標的として注目を集めている。本研究では、IAV RNA プロモーター領域を構成する RNA 二重鎖とインターナルループ構造を同時認識する蛍光性プローブ開発を指向して、RNA 二重鎖と三重鎖を形成し蛍光応答を示す Thiazole orange 擬塩基含有ペプチド核酸(tFIT プローブ)[1)]に対してインターナルループ構造結合性小分子 DPQ[2)] を連結したコンジュゲート(tFIT-DPQ)を合成し、その機能を評価した。

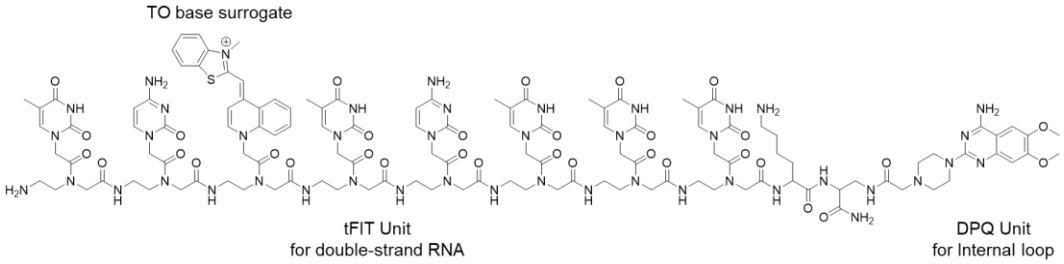


Fig. 1 Chemical structure of tFIT-DPQ conjugate for IAV RNA promoter region.

tFIT-DPQ はプロモーター領域を含む標的 RNA との結合に伴い、TO 擬塩基部位が明瞭な light-up 応答を示した。驚くことに、元来 tFIT プローブは蛍光応答を示さない中性条件下においても tFIT-DPQ は蛍光応答を示した。これは DPQ 部位によるインターナルループ構造結合が pH に依存しないため、アンカリング効果を示していることに起因していると考えられる。標的 RNA に対する tFIT-DPQ の解離定数 K_d は 107 nM と算出され、DPQ 単体（K_d = 51 μM[2]）や DPQ を持たない Control tFIT（K_d = 1.54 μM）に比べ強い結合力を有することが分かった。また、tFIT-DPQ はインターナルループ構造を持たない RNA や一本鎖 RNA に対する蛍光応答が減少しており、標的 RNA に対する高い選択性を持つことがわかった。tFIT-DPQ は H1N1 インフルエンザウイルスに感染した細胞の Total RNA に対しても蛍光応答を示し、60 ng/mL の RNA 量で感染の有無を識別可能であることが見出された。さらに、tFIT-DPQ は蛍光ディスプレイスメントアッセイ（FID assay）のインジケーターとしても機能することもわかり、IAV RNA プロモーター領域を標的とする分子のスクリーニングや結合力の評価に有用であることが見出された[3)]。

1) T. Sato, Y. Sato, S. Nishizawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 9397-9400 (2016).
2) Lee, T. et.al., *Chem. Commun.*, **50**, 368-370 (2014).
3) Y. Sato, H. Miura, T. Tanabe, C. U. Okeke, A. Kikuchi, S. Nishizawa, *Anal. Chem.*, **94**, 7814-7822 (2022).

分子混雑環境における二本鎖 DNA の集合体形成とその特性

牧野哲直[1]・山口湧暉[1]・○田仲真紀子[1]（[1]電通大院情報理工）

Formation of double-stranded DNA assemblies and their properties under crowded conditions (Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications[1]) MAKINO, Tetsunao[1]; YAMAGUCHI, Yuuki[1]; TANAKA, Makiko[1]

DNA の二重らせんは、効率的に電子を移動させる媒体として期待され、二本鎖 DNA が酸化され生じたホール（正孔）が塩基のスタッキングを介して移動する DNA 内電子移動過程は、長年にわたって研究されてきた。しかしほとんどの研究は主に希薄で均一な水溶液中でなされてきており、高密集の混雑環境にある DNA の特性については、未だ明らかとなっていないことが多い。近年では周囲の環境変化に応じて DNA は自己集合し、液晶や液滴状となることも注目されている。当研究グループでは、高濃度のポリエチレングリコール(PEG)と塩の存在下で二本鎖DNAがコレステリック液晶を形成し、液晶中では DNA 内電子移動によって誘発されるグアニン塩基の損傷効率が大幅に増大することを明らかとしている [1)]。

しかしながら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ため、グアニンの損傷は電子移動をモニターするマーカーとして適しているわけではない。そこで本研究では、一電子酸化によりすみやかな開環反応を起こすシクロプロパン環を有するグアニン（^{cp}G）を、液晶中の DNA 内のホール捕捉塩基として使用した [2)]。固相合成により ^{cp}G を含むオリゴヌクレオチドを準備し、DNA にホールを注入する光増感剤 5-(pyrenylethynyl)-2'-deoxyuridine（^{Py}U）を含むオリゴヌクレオチドとアニーリングすることにより二本鎖を形成させ、溶液に PEG を高濃度で混合することで DNA のコレステリック液晶を形成させた。^{Py}U への選択的な光照射によって引き起こされる ^{cp}G の分解量をサンプルの酵素分解処理により評価したところ、液晶 DNA 中では大幅な ^{cp}G 分解の促進が観測され（図１）、液晶中で効率的な電子移動が起こることが示唆された [3)]。

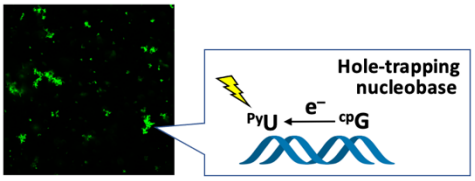


Fig 1. Schematic representaion of ^{cp}G decomposition in liquid crystalline DNA.

さらに DNA の配列と濃度、PEG 濃度を変化させ、集合体形成への影響を検討したところ、特定の条件下で明確な 5~15 μm の六角形プレート型集合体が形成された（図２）。この新規に観測された六角形型 DNA 集合体について偏光顕微鏡による観測と、円二色性スペクトル測定を行った結果、二本鎖 DNA の長軸が六角形の面に対して垂直に並んでいることが示唆された。六角形型 DNA 集合体を含む溶液について、吸光度の温度変化測定を行ったところ、二本鎖 DNA の一本鎖への解離による吸光度変化以外に、より低い 30-45 ℃の温度領域での吸光度変化が観測された。そこで集合体を加温しながら顕微鏡観測を行ったところ、30 ℃で集合体の溶解が始まり、45 ℃では集合体が消失することを確認した。

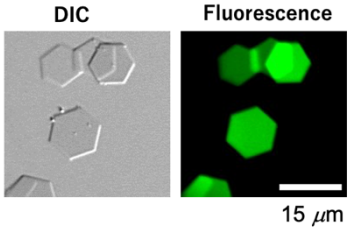


Fig 2. DIC and fluorescence images of hexagonal DNA assemblies. DNAs were stained using SYBR Green I.

このように二本鎖 DNA が、周辺環境に依存して集合状態を変化させることが明らかとなった。集合状態変化が DNA への新たな機能と特性の付与につながる可能性が期待できる。

1) S. Sakurai, M. Esumi, M. Tanaka, *Chem. Commun.* 2019, ***55,*** 7695.
2) K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc*. 2001, **123**, 9681.
3) Y. Taketomi, Y. Yamaguchi, S. Sakurai, M. Tanaka, *Org. Biomol. Chem*. 2022, **20**, 2043.

医薬ための新型細胞膜透過型性オリゴ核酸の開発

Development of new membrane permeable oligonucleotides for therapeutics

(Graduate School of Science, Nagoya University[1]; Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine[2])

Lyu Fangjie[1], Hayase Hakariya[1], Haruka Hiraoka[1], Li Zhenmin[1], Noriaki Matsubara[1], Satoshi Uchida[2], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1]

Gene therapy is a new type of medical strategy attracting much focus recently and now being emphasized on research topics. As an innovative and revolutionary medical strategy, gene therapy makes it possible for us to modulate gene expression and protein production artificially on molecular level. Among all these different types of gene therapy, oligonucleotides play important roles in practical medicine applies, including antisense DNA, siRNA, aptamer etc. (**Figure 1**) The oligonucleotides bring us advantages like easy production, flexible design, and good specificity when utilized in gene therapy cases.

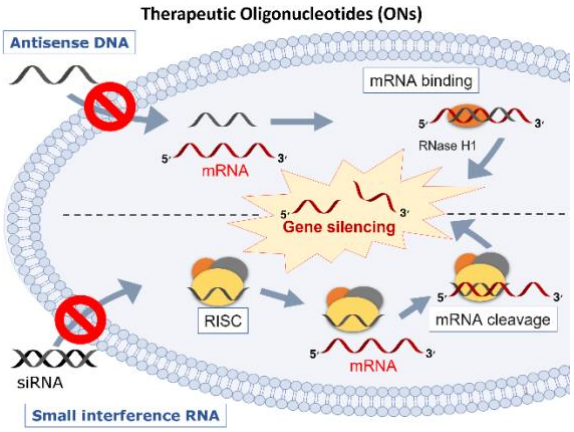


Figure 1. **Mechanism of therapeutic ONs in gene therapy**

However, due to the low cell membrane permeability of naked antisense DNA and siRNA, it is difficult to deliver them in cells effectively under normal conditions. To overcome such problem in therapeutic oligos' development for practical application, it becomes necessary and meaningful for us to discover gene delivery strategies with high efficiency and biosafety which meet the requirement for therapeutic purpose in the clinic.

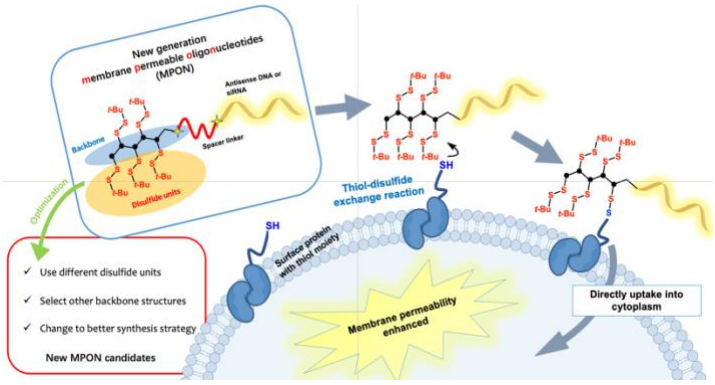


Figure 2. **Expected mechanism of cellular uptake of MPON with new molecular design**

Our lab previously successfully developed novel cell *membrane permeable oligonucleotides* (MPON). We conjugated disulfide units at terminal ends of siRNA or antisense DNA oligos which were easily achieved based on phosphoramidite chemistry by automatic DNA synthesizer. Through thiol-disulfide exchange reaction, this strategy can significantly enhance membrane permeability and corresponding cellular uptake efficiency of oligonucleotides (compared with natural sequences). We have obtained a comparable or even better gene silence effect compared with the widely applied lipofection method for gene delivery.

Here in the new study, we further optimized the existed structure and designed new generation MPONs. We subsequently selected cyclic disulfide units and constructed a brand new trimer backbone to improve current synthesis strategies. Moreover, we attempted to add appropriate spacer linkers between MPON units and oligonucleotides to ensure best activities, like antisense effect. We reported that new generation MPONs were successfully developed and investigated preliminarily. It was indicated that they can give enhanced cellular uptake and comparable results knock down activity. They are possible to be synthesized in better yield and more easily purified. antisense level, and less biological side-effects. Forward *in vivo* experiments also showed its great potentials for further applications.

[1] Shu, Z. et al. *Angew Che. Int Ed* **2019,** *58* (20), 6611-6615. **[2]** Hiraoka, H. et al. *ChemBioChem* **2021** (n/a)

ライフサイエンスにおける新たな非水溶媒の提案

○黒田 浩介[1]，加藤優衣[1]，小森鉄雄[1]，高橋 憲司[1]，仁宮一章[2]，石橋公二朗[3]，平田英周[3]（[1]金沢大理工、[2]金沢大新学術、[3]金沢大がん研）

Novel non-aqueous solvents in life sciences (Institute of Science and Engineering, Kanazawa University[1], Institute for Frontier Science Initiative, Kanazawa University[2], Division of Tumor Cell Biology and Bioimaging, Cancer Research Institute of Kanazawa University, Kanazawa University[3]) Kosuke Kuroda[1], Yui Kato[1], Tetsuo Komori[1], Kazuaki Ninomiya[2], Kenji Takahashi[1], Kojiro Ishibashi[3], Eishu Hirata[3]

1. 緒言

細胞の溶媒として最も使われる溶媒は水である。その一方で、最も使われている細胞用の非水溶媒はジメチルスルホキシド（DMSO）であり、「凍結保存剤」や「難溶性薬剤の添加溶媒」として使われている。しかし、DMSO はあくまで“有機溶媒の中では低毒性”であり、1〜2%程度の添加でも細胞に悪影響を与える。我々がこれまでに開発した、微生物に対して低毒性な双性イオン液体 (OE_2imC_3C、図 1)[1,2] が動物細胞に対しても低毒性であるならば、DMSO に代わる細胞用の非水溶媒となり得る。そこで本研究では、OE_2imC_3C がヒト細胞へも低毒性であることを確かめた。さらに、OE_2imC_3C が「凍結保存剤」や「難溶性薬剤の添加溶媒」として利用できるかどうか、検討を行った。

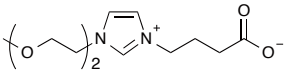


図 1 OE_2imC_3C の構造

2. 結果と考察

はじめに OE_2imC_3C の毒性を検討した。ヒト線維芽細胞に OE_2imC_3C を 2 もしくは 10% (w/v)添加し、24 時間培養した後の細胞生存率を調べた。その結果、それぞれの細胞生存率は 103, 77%であり、強い毒性がないことが確認された。同様に 2 もしくは 10%の DMSO を添加した場合、生存率はそれぞれ 94, 34%であった。このことから、OE_2imC_3C は DMSO よりも毒性が低く、ヒト細胞においても有効な溶媒であることが確認された[3]。

ヒト線維芽細胞の凍結保存を試みた。市販の凍結保存剤（DMSO とアルブミンを含有）を利用したときの、凍結保存後の生存細胞数は 6.5×10^5 であった。5%の OE_2imC_3C を用いた場合の生存細胞数は、市販品の場合と同等の 6.5×10^5 であった。このことから、OE_2imC_3C はが非常に良い凍結保護作用を示すことが分かった[3]。溶液組成を最適化することで、凍結に弱いとされている細胞（K562, OVMANA）も効率良く凍結保存できることが分かっている[4]。

最後に、難溶性薬剤の溶解を試みた。非水溶性の抗がん剤であるシスプラチンは DMSO に溶解するが、DMSO によってその抗がん効果が抑制される。シスプラチンをよく溶かせ、シスプラチンの効果を抑制しない低毒性溶媒は存在しない。その一方で、100 および 50 wt% OE_2imC_3C 水溶液にシスプラチンは溶解した。その後、ヒト乳がん細胞に対し、50% OE_2imC_3C 水溶液へ溶解したシスプラチンを添加した（終濃度 : 100 μM）。72 時間後の細胞生存率を調べたところ、約 80%の乳がん細胞が死滅した。その一方で DMSO を溶媒として用いた場合に死滅した乳がん細胞は 9%であった。このことから OE_2imC_3C はシスプラチンを溶かせ、シスプラチンの効果を抑制しない、唯一の低毒性液体であることが示された。

3. 参考文献

1 K. Kuroda, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 16052-16055.
2 T. Komori, et al., *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2021, **9**, 11825-11836.
3 K. Kuroda, et al., *Commun. Chem.*, 2020, **3**, 163.
4 Y. Kato, et al., *Commun. Chem.*, 2021, **4**, 151.

抗体を抗体酵素に変換する新手法に関する研究

○一二三恵美[1,2]・野中玲実[1]・田口博明[3]・宇田泰三[4] ([1]大分大・研究マネージメント機構、[2]同・グローカル感染症研究センター、[3]鈴鹿医療大、[4]九州先端研）

Studies on the new method for an antibody to be converted to its catalytic antibody (Institute for Research Management, Oita University[1], Research Center for GLOBAL/LOCAL Infectious Diseases, Oita University[2], Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science[3], Institute of Systems, Information Technologies, and Nanotechnologies (ISIT)[4]) HIFUMI, Emi[1,2]; NONAKA, Tamami[1]; TAGUCHI Hiroaki[3]; UDA, Taizo[4]

抗原認識サイトの近傍に酵素活性サイトを有する抗体鎖は、抗体酵素として機能する。演者らは、抗体可変領域に存在する触媒三ツ組残基に着目して解析を進める中で、ヒトやマウスの kappa 型軽鎖では、胚細胞性遺伝子の段階でこの構造が encode されていることを明らかにした。抗体の分子進化を考えると、触媒三ツ組残基以外の酵素活性サイトを encode する遺伝子が存在しても不思議ではない。健常人由来の kappa 型軽鎖の遺伝子ライブラリーから発現・精製した軽鎖タンパク質をバンク化し、遺伝子配列と酵素活性の関係を探索して行く過程で、上述の仮説を支持し、抗体鎖が潜在的に持っている酵素作用を発揮させるための重要な知見を得たので報告する。

1.「Pro95 の欠失」による酵素活性の発現（or 向上）:ヒト kappa 型軽鎖 S35 クローンと S38 クローンのアミノ酸配列の相同性は 99.5%で、両者の違いは Pro95 の有無のみである。しかしながら両者の酵素活性は大きく異なり、Pro95 を持つ S35 は酵素活性を示さないのに対して、Pro95 が欠失している S38 は明確に酵素活性を示した(Fig.1)。この現象は、触媒三ツ組残基様構造を encode している他のヒト kappa 型軽鎖に於いても確かめられた[1)]。そこで、この手法のマウス型モノクローナル抗体への適用を試みた。具体的には、インフルエンザウイルスのヘマグルチニン保存領域に対するモノクローナル抗体(InfA series)[2)]に対して、軽鎖（Kappa 鎖）Pro95 欠失変異体を作製した。すると、触媒三ツ組残基が機能を発揮する様になり、H1N1 型ウイルスの MDCK 細胞への感染を約 30%の割合で阻害した。

2.「His に代わる Arg」,「Ser に代わる Thr」による新酵素活性サイト: ヒト kappa 型軽鎖の#7 クローンに 2 つの変異（G29T / Y30R）を導入すると、変異体は合成基質(Arg-pNA)や Aβ-peptide に対する加水分解活性を獲得した[3)]。他方、免疫チェックポイント PD-1 分子を加水分解する H34 クローン[4)]に、「R95A」や「T93A」の変異を導入すると酵素活性が大幅に低下した。これらは、His に代わって Arg が、また Ser に代わって Thr が触媒三ツ組残基の構成員として機能することを示唆する新しい知見である。しかもこの種の構造を持つヒト型抗体軽鎖は major group であることから、さらに多くの抗体を抗体酵素に変換する道筋を示したと言える。

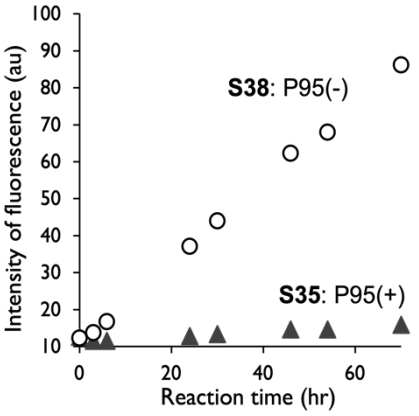


Fig.1 Time course of the cleavage reaction for FRET-Aβ peptide by S38 and S35 clone.

3. これまでの結論と今後の展開: 抗体酵素は「特殊な抗体」と捉えられてきたが、潜在的な酵素活性サイトを有する抗体鎖は我々の想像よりも高い頻度で存在し、簡単な変異導入により酵素機能を引き出すことが可能であることが明らかになってきた。この手法を応用すれば、これまでに世界中で作製されてきたモノクローナル抗体の酵素化が可能となり、抗ウイルス剤や抗がん剤などの開発に新しい道を拓くことが出来る。

1) Hifumi, E. et al. *Science Advances*, **6**(13), eaay6441(2020). 2) Hifumi, E. et al. *J. Biosci. Bioeng.,***109**(6), 598(2010). 3) Hifumi, E. et al. *FASEB Bioadvances*.**Vol.1**(2), 93(2018). 4) Hifumi, E. et al. *RSC Chemical Biology,* **2**(13), January, 2021.

逆平行グアニン四重鎖構造をスキャフォールドとして用いた未修飾CpGオリゴデオキシヌクレオチドの免疫活性化効果

○山崎智彦[1,2]・SAFITRI Ayu Fika[1,3]・TU Thi Tram Anh[1,2]・LE Bui Thao Nguyen[1,2]・PATHAK Soumitra[1,2]・塚越かおり[4]・池袋一典[4]（[1]物材研機能性材料、[2]北大院生命科学、[3]バンドン工科大学、[4]農工大院工）

Immunostimulatory Effect of Phosphodiester-based CpG Oligodeoxynucleotides using an Antiparallel Guanine-Quadruplex Structure as a Scaffold

(Res. Cent. Funct. Mater., NIMS[1], Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.[2], Bandung Inst. Technol.[3], Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.[4])

YAMAZAKI, Tomohiko[1,2] SAFITRI Ayu Fika[1,3]・TU Thi Tram Anh[1,2]・LE Bui Thao Nguyen[1,2]・PATHAK Soumitra[1,2]・TSUKAKOSHI, Kaori[4]・IKEBUKURO Kazunori[4]

シトシン(C)-グアニン(G)のジヌクレオチドを有する一本鎖核酸であるCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)は免疫細胞内で自然免疫受容体であるトール様受容体9(TLR9)のアゴニストとして機能し、抗体産出を誘導する炎症性サイトカインとI型インターフェロン(IFN)の発現を誘導し、免疫系を活性化する。しかしながら、CpG ODNのような一本鎖DNAは、体内でDNA分解酵素により容易に分解される。この問題を解決するためにCpG ODNのリン酸エステル部位をホスホロチオエート化した修飾核酸が開発され、米国では2017年にB型肝炎ワクチン（HEPLISAV-B）のアジュバントとして承認された。しかしながら修飾核酸は、体内での蛋白質凝集を誘導し、循環器や肝臓の疾患やアミロイドーシス疾患を引き起こす副作用が懸念されている。

我々は、副作用の懸念のない安全な未修飾核酸のみで構成されるCpG ODNを新たに開発するためにDNAが細胞核内部で形成している高次構造の1つであるグアニン四重鎖（G4）構造に着目した研究を進めている[1,2]。本研究では、逆平行G4構造を形成することが報告されているトロンビンアプタマーであるRE31をCpG ODNのスキャフォールドとして用いることで、未修飾CpG ODNの核酸分解酵素に対する耐性を向上させ、免疫活性化能を向上させることを目的とした。

RE31の3箇所のループ領域にCpG配列（5’-GTCGTTTTGTCGTT-3’）を導入し、円二色性スペクトル測定によりトポロジー構造を解析したところ、5’末端から1番目と3番目のループにCpG配列を導入することにより逆平行G4構造保持することが示された。また、免疫活性化効果をマウスマクロファージ細胞株であるRAW264細胞を用いて評価したところ、1番目のループにCpG配列を導入したODNは高い免疫活性を示すのに対して、3番目のループにCpG配列を導入したODNは免疫活性化を示さなかった。さらに、逆平行G4構造を維持しながら、ループ配列に導入したCpG配列とポリG間のスペーサー配列を検討したところ、CpG配列の5’末端にシトシンもしくはアデニン、3’末端にシトシンを導入することにより免疫活性化能を大きく向上させることができた[3]。

RE31は5’末端と3’末端が2本鎖を形成しているDuplex/G4構造を形成するため、ループ領域に比較的長い配列を導入してもトポロジー変化が起こらず、構造が安定であることから、CpG ODNのスキャフォールドとして有効であることが示された。

[1] Hoshi, K. *et al.* G-quadruplex structure improves the immunostimulatory effects of cpg oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* **29**, 224–229 (2019). [2] Tu, A. T. T. et al. Monomeric G-Quadruplex-Based CpG Oligodeoxynucleotides as Potent Toll-Like Receptor 9 Agonists. *Biomacromolecules* **21**, 3644–3657 (2020). [3] Safitri, F. A. *et al.* Enhancement of the Immunostimulatory Effect of Phosphodiester CpG Oligodeoxynucleotides by an Antiparallel Guanine-Quadruplex Structural Scaffold. *Biomolecules* **11**, 1617 (2021).

Poster Session

Mon. Sep 12, 2022 1:00 PM - 2:00 PM JST | Mon. Sep 12, 2022 4:00 AM - 5:00 AM UTC | Online Site B Online Streaming

Poster Session (P101-P134)

[P101] Intramolecular energy transfer utilized single molecule excitation light source

*Yuki Minamide[1], Fumiaki Takano[1], Koichi Tanimoto[1], Akinori Kuzuya[1] (1. Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University)

[P102] Accelerated DNA double-strand break and cancer cell-selective cytotoxicity induced by tetranuclear copper complex

*Takuto Tokunaga[1], Machi Hata[1], Yutaka Hitomi[1], Masahito Kodera[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University)

[P103] Specific capture of circulating tumor cells by anti-EpCAM aptamer-modified filters.

*Haruna Hayashi[1], Yusuke Kitamura[1], Yuta Nakashima[1], Keiichiro Yasuda[2], Masaaki Iwatsuki[3], Seitaro Kumamoto[2], Yousuke Katsuda[1], Yoshitaka Nakanishi[1], Hideo Baba[3], Toshihiro Ihara[1] (1. Faculty of Advanced Science and Technology, 2. OGIC technologies Co., Ltd, 3. Faculty of Life Sciences, Kumamoto University)

[P104] Preparation of bioelectrodes for creatinine detection using three enzymes

*Maki Haraguchi[1], Nobuhumi Nakamura[1] (1. Graduate school of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P105] Development of heme-selective biomolecule-labeling probes for tissue imaging

*Ryo Kakiuchi[1], Tasuku Hirayama[1], Shohei Tsuji[1], Masamitsu Shimazawa[1], Tomonori Tamura[2], Itaru Hamachi[2], Mieko Tsuji[1], Hideko Nagasawa[1] (1. Gifu Pharmaceutical University, 2. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P106] Development of a three-dimensional fluorescence imaging method for hypoxia utilizing Cu-catalyzed click reaction

*Iori Tamura[1], Daichi Sakamoto[1], Bo Yi[1], Yutaro Saito[1], Naoki Yamada[1], Yoichi Takakusagi[2], Shimpei Kubota[3], Kazuki Tainaka[4], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology, 3. Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, 4. Brain Research Institute, Niigata University)

[P107] Development of Identification Model for Foodborne Pathogens Based on Colony Fingerprinting Using Colony Morphology and Optical Properties

*Hikaru Tago[1], Yusuke Tanaka[1], Someya Takumi[1], Yoshiaki Maeda[1], Tae-Kyu Lim[2], Manabu Harada[2], Tomoko Yoshino[1], Tadashi Matsunaga[1], Tsuyoshi Tanaka[1] (1. Division of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Malcom Co. Ltd.)

[P108] Development of system for metabolite analysis using phenylboronic acid modified artificial oligonucleotides

*Yuto Motohashi[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[P109] Glutathione Imaging in Frozen Tissue Slice Using Functional Thin-Layer Chromatography

*Koki Nishida[1], Tatsuya Nishihara[1], Kazuhito Tanabe[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)

[P110] Development of a group of enzymes and substrates of "human cell orthogonal" and its application to multiple colored sensitization analysis of cells

*Ryosuke Kaneko[1], Chuya Tateishi[2], Kenta Tanito[2], Kota Yamanaka[2], Noriho Kamiya[1,4], Kaoru Takekawa[5], Teruki Nii[1], Akihiro Kishimura[1,3], Takeshi Mori[1], Yoshiki Katayama[1,3] (1. Graduate School of Engineering, Kyushu University, 2. Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University, 3. Center for Molecular Systems, Kyushu University, 4. Kyushu University Center of Future Chemistry, 5. Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

[P111] Development of electrospun fibermats, encapsulating the lactate-respondent protein

*Yuna Kato Kato[1], Toshihisa Mizuno[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[P112] Structure-based design of fluorescent immunosensor using anti-cortisol nanobody

*Akihito Inoue[1], Taiga Suzuki[1], Yinghui Yang[1], Yasuda Takanobu[2], Bo ZHU[2], Tetsuya Kitaguchi[2], Hiroshi Ueda[2] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Tech, 2. Laboratory for Chemistry and Life Science Institute of Innovative Research, Tokyo Tech)

[P113] Establishment of a protocol for detection of circulating tumor cells from the blood in canine urothelial carcinoma

*Ryo Miura[1], Tatsuya Usui[2], Haru Yamamoto[2], Daigo Azakami[2], Tsuyoshi Tanaka[1], Tomoko Yoshino[1] (1. Institute of Engineering Division of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Institute of Agriculture Division of Animal Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P114] Organelle-targeted NIR Fluorescent Probe for Real-time Monitoring of Glutathione

*Yuki Moro[1], Wu Qian[2], Masayasu Taki[2], Shigehiro Yamaguchi[1,2] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. ITbM, Nagoya University)

[P115] Multi-functionalization of Phospha-rhodamine Dyes Using a Cross-Coupling Reaction

*Yuichi Asada[1] (1. Faculty of Science, Nagoya University)

[P116] Quantitative single-cell analysis of membrane proteins inside the cells

*Yuki Umeda[1], Satoshi Yamaguchi[1], Shinya Yamahira[2], Motonao Nakamura[3], Akimitsu Okamoto[1] (1. School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Center for Medical Sciences, St. Luke's International University, 3. School of science, Okayama University of Science)

[P117] Effects of Axial Ligand on Cyclohexane Hydroxylation by Compound I Model Complex

*Toshiya Higashi[1], Yuma Morimoto[1], Hiroshi Fujii[2], Shinobu Itoh[1] (1. Graduate School of Engineering, Osaka University, 2. Nara Women’s University)

[P118] Characterization of biochemical property of β-carboxysome shell protein CcmO toward the development of novel nanomaterials

*Eiichiro Okubo[1], Yuka Sugiyama[1], Masaya Ohata[1], Ryutaro Nakamura[1], Hirotoshi Matsumura[1], Keiichi Noguchi[2], Masafumi Yohda[2], Masafumi Odaka[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Akita University, 2. Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology)

[P119] Preparation and applications of agarose gel beads carrying carbohydrate-appendages

*Keisuke Yoshida[1] (1. Graduate School of Life Sciences, Toyo University)

[P120] A comprehensive analysis of lipid-specific proteins with lipid-immobilized beads

*Masayuki Morito[1], Masanao Kinoshita[1], Takayuki Kawai[1], Nobuaki Matsumori[1] (1. Graduate School of Science, Kyushu University)

[P121] Synthesis and applications of bacteria cellulose hydrogels having pendent carbohydrates units.

*Mizuki Tobito[1], Teruaki Hasegawa[2] (1. Graduate School of Life Sciences, Toyo University, 2. Faculty of Life Sciences, Toyo University)

[P122] Inhibition of quorum sensing by capturing *Staphylococcus aureus* intercellular communication molecules

*Ruki Inagaki[1], Naoya Tatsumi[1], Eri Nasuno[2], Norihiro Kato[2] (1. Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya University, 2. School of Engineering, Utsunomiya University)

[P123] Contribution of water-insoluble glucan to the stability of biofilms formed by *Streptococcus mutans*

*Narumi Ushijima[1], Eri Nasuno[1], Hidenobu Senpuku[2], Norihiro Kato[1] (1. School of Engineering, Utsunomiya University, 2. School of Department of Dentistry, Dentistry at Matsudo)

[P124] Development of a novel photo-induced cyclization reaction based on the unique reactivity of photo-sensitive oxime structures

*Hidenori Okamura[1,2], Momoka Iida[1,2], Yui Kaneyama[1,2], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University)

[P125] Development of GSH-responsive PAI/PTT Theranostic Agent

*Takaya Sugahara[1], Kohei Nogita[1], Koji Miki[1], Kouichi Ohe[1] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

[P126] Isolation of Useful Microorganisms Using Artificial Siderophore-iron Complex Modified Substrates

*Ririka Sugita[1], Suguru Endo[1], Tomohiro Ozawa[1], Hideki Masuda[1,2], Tomohiko Inomata[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, 2. Faculty of Engineering, Aichi Institute of Technology)

[P127] Exploring Target Proteins of Novel Plant Growth Promoters

*Yuma Shisaka[1], Shuhei Kusano[1], Sakuya Nakamura[1], Masanori Izumi[1], Shinya Hagihara[1] (1. RIKEN Center for Sustainable Resource Science)

[P128] Synthesis and Cellular Delivery of Nano-Sized Ribbon-Shaped Gold Crystals Using Nuclear Localization Signal-Tethering Peptide as A Template

*Kazutoshi Ishida[1], Takahito Imai[1], Masayuki Yamasaki[2], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Graduate School of Advanced Science and Technology, Ryukoku University, 2. Graduate School of Food Sciences and Human Nutrition, Ryukoku University)

[P129] Synthesis of Cationic Peptides Toward Boron Delivery into Cells

*Takahiro Kayashita[1] (1. Graduate School of advanced Science and Technology)

[P130] Efficient Gene Suppression by the Novel Ligand Conjugated siRNA in the Skeletal Muscle and Central Nervous System

*Kei Takiyama[1], Shinnichi Yokota[1], Motoki Sawamura[1], Keisaku Wakabayashi[1], Mado Nakajima[1], Norikazu Kuroda[1], Takashi Nakamura[2], Hiroko Morino[2], Takahiro Fujiwara[1], Takeshi Kasuya[1], Yasuo Sasaki[1], Shin-ichiro Hori[1], Akira Kugimiya[1] (1. Shionogi & Co., Ltd., 2. Shionogi TechnoAdvance Research CO., LTD.)

[P131] Light-dependent induction of apoptosis using pre-miR-664a-loaded Lactsomes

*Mai Miyamoto[1] (1. Graduate School of Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama University)

[P132] pDNA delivery by an iminoboronate-functionalized dendrimer

*Akira Matsumoto[1], Tsuyoshi Minami[1] (1. Institute of Industrial Science, The University of Tokyo)

[P133] Modification of Titanium Surface with Collagen Model Peptides Containing both Titanium Binding and Cell Recognition Sites

*Shun TANAKA Tanaka[1], Yoshifumi Aoi[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. ryukoku University)

[P134] Structural stability and calcium ion responsibility of a collagen model peptide with a carboxy group

*Naoki Takemura[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

単分子励起光源を利用した分子内エネルギー移動

○南出悠貴・高野史章・谷本晃一・葛谷明紀（関西大化学生命工）

Intramolecular energy transfer utilized single molecule excitation light source ((Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University,) MINAMIDE, Yuki; TAKANO, Fumiaki; TANIMOTO, Koichi; KUZUYA, Akinori

植物は光合成において太陽光を効率的に活用するため、光アンテナという集光機構を備えている。これは数百個のクロロフィル分子で構成されており、光エネルギーを補足して高エネルギーな電子を生み出す。励起電子のエネルギーは分子から分子へと次々に受け渡されていき、最終的に 2 個のクロロフィル分子からなるスペシャルペアに集められる。この過程におけるエネルギー移動は無放射の共鳴機構により実現されている。このようなエネルギーを受け渡す機構の模倣が試みられてきた。しかし、バルクの励起光源を用いて光アンテナのように同一蛍光色素で再現した場合、励起光が全ての蛍光物質を同時に励起してしまうため、直接的なエネルギー移動を観察できなかった。また、異なる蛍光物質を配列し、エネルギー準位を少しずつ下げることでエネルギー移動を試みた例もあるが、配列できる蛍光物質の数に制限があり伝送距離が短くなるという課題があった。

そこで本研究では生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) に注目した。BRET とは発光基質が光を発する為に使うエネルギーが極近傍にある蛍光物質へと移動する現象のことである。当研究室では相補な二本の DNA のうち片方に発光タンパク質を化学修飾し、もう片方に蛍光色素を修飾することで、DNA をリンカーとした BRET システムを報告している。本研究ではこれを応用し、リンカーとなる DNA の鎖内に複数個の蛍光色素を挿入し、発光タンパク質の近傍に局在化した蛍光色素のみを励起することで同一蛍光色素による分子内エネルギー移動を試みた。

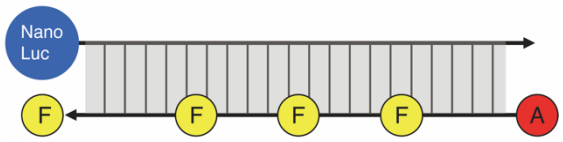


Fig. 1 Schematic diagram of this system.

本研究では発光タンパク質に NanoLuc ルシフェラーゼ [1]を選択した。これは深海エビ由来の青色発光を示す発光タンパク質であり、小断片側のペプチド鎖 (HiBiT) と大断片側の LgBiT に分割できる。このスプリット体のうち HiBiT を DNA に修飾し HiBiT-DNA を合成した。次に HiBiT-DNA に相補な DNA の鎖内に FAM を複数個挿入し、5'末端に Alexa 594 を修飾した DNA を合成した。この二本の DNA をハイブリダイゼーションさせた後、LgBiT を加えて NanoLuc を再構築させ Furimazine を加え発光スペクトルを測定した。その結果、リンカーの DNA に挿入した FAM の数が多いほど Alexa 594 への FRET 効率が向上した。

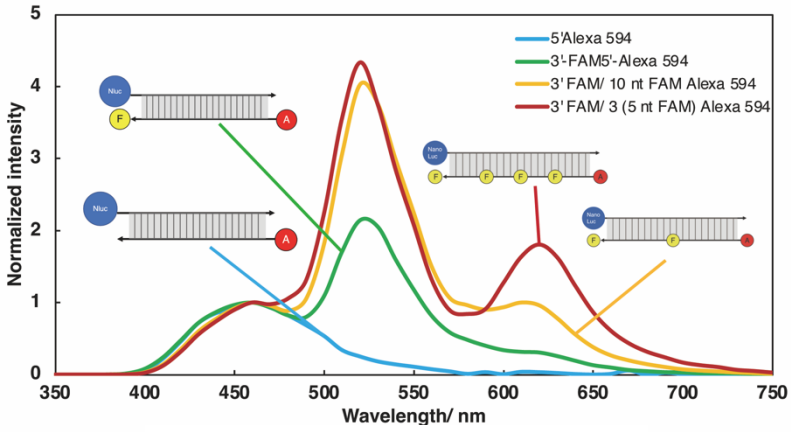


Fig. 2 Normalized spectra of this system.

1) A. S. Dixon, *et al.*, *Anal. Chem.* **2016**, *11*, 400-408.

四核銅(II)錯体による DNA 切断の高速化とがん細胞選択的細胞毒性

○徳永拓人・畑真知・人見穣・小寺政人（同大院理工）

Accelerated DNA double-strand break and cancer cell-selective cytotoxicity induced by tetranuclear copper complex. (Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University) TOKUNAGA, Takuto; HATA, machi; HITOMI, Yutaka; KODERA, Masahito

ブレオマイシン(BLM)の鉄錯体は，DNA を二本鎖切断して細胞死を導く細胞障害性の抗がん剤として広く臨床利用されている[1]．Que らは N4Py 配位子の単核鉄(II)錯体$[Fe(N4Py)(MeCN)]^{2+}$ (**5**)を BLM の機能モデルとして報告した．Roelfes らは 2 分子の **5** をリンカーで繋いだ$[Fe_2(di\text{-}N4Py)(MeCN)_2]^{4+}$ (**6**)が還元剤存在下で **5** より高い DNA 切断活性を示すことを報告した[2]．しかし，これらの錯体は，がん細胞選択性がなく，正常細胞に対しても同様の毒性を及ぼした．

がん細胞は，正常細胞に比べて活性酸素種(ROS)や還元性物質の濃度が高い特異環境にあることが知られている．我々は，副作用の少ない抗がん剤の開発を目指し，がん細胞の特異環境で DNA 切断を加速する金属錯体を開発してきた．これらの研究の中で，四核銅(II)錯体$[Cu_4(\mu\text{-}OAc)_4(L2^{4\text{-}H})]^{2+}$(**3**)が還元剤であるアスコルビン酸ナトリウム(AscNa)の存在下，DNA の二重鎖切断に対して高い活性を示すことを見出した．**3** では 2 つの二核銅が協同的に働き，O_2 活性化を加速することを示した．今回の研究で，四核銅(II)錯体 **3** では各種細胞株に対する細胞毒性が二核銅(II)錯体$[Cu_2(\mu\text{-}OAc)_2(L1^{4\text{-}H})]^{+}$ (**1**)の約 6-12 倍に大きく向上することを見出した．ICP-MS の測定から，**3** の細胞取込量は **1** の約 1.1 倍であり，その細胞膜透過性は同程度であることがわかった．従って，**3** による ROS 生産能の増大が細胞毒性の向上の原因と考えられる．肺や膵臓のがん細胞と正常細胞に対する細胞毒性の比較から，**3** は **1** と同程度のがん細胞選択性を示すことがわかった．

これまでの我々の研究で **1** の py 環の 4 位に MeO 基を導入した二核銅(II)錯体$[Cu_2(\mu\text{-}OAc)_2(L1^{4\text{-}OMe})]^{+}$ (**2**) が，反応初期に高い DNA 切断活性を示すとともに，各種細胞株に対して **1** よりも約 4-7 倍高い細胞毒性を示すことが明らかになった．**2** の高い細胞毒性は細胞取込率が **1** よりも約 7.2 倍高いことによる．また **2** は肺と膵臓の細胞株に対して **1** より高いがん細胞選択性を示すことがわかっている．

そこで今回，さらに高い DNA 切断活性及びがん細胞選択的細胞毒性を示す金属錯体の開発を目指し，新規四核銅(II)錯体$[Cu_4(\mu\text{-}OAc)_4(L2^{4\text{-}OMe})]^{2+}$(**4**)を合成した．本発表では，**3** の細胞毒性とともに，**4** の DNA 切断活性と細胞毒性について報告する．

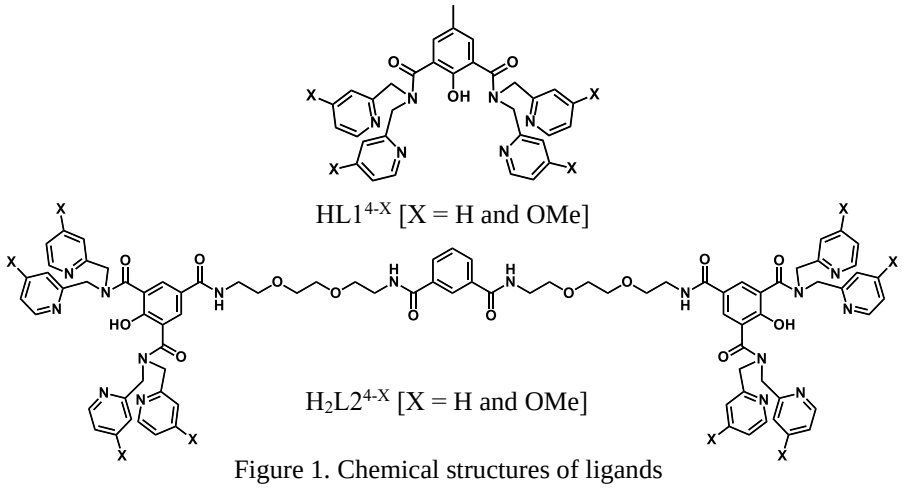


Figure 1. Chemical structures of ligands

[1] Solomon, E.I. et.al., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4719–4733.

[2] Roelfes, G. et al. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1723–1733.

抗 EpCAM アプタマー修飾金フィルターを用いた CTC の捕捉

○林 榛菜[1], 北村 裕介[1], 中島 雄太[1], 安田 敬一郎[2], 岩槻 政晃[3],熊本 清太郎[2], 勝田 陽介[1], 中西 義孝[1], 馬場 秀夫[3], 井原 敏博[1] ([1]熊本大院先端, [2]株式会社オジックテクノロジーズ, [3]熊本大院生命)

Specific capture of circulating tumor cells by anti-EpCAM aptamer-modified filters. (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University[1]; OGIC technologies Co., Ltd[2]; Faculty of Life Sciences, Kumamoto University[3]) Haruna Hayashi[1]; Yusuke Kitamura[1]; Yuta Nakashima[1]; Keiichiro Yasuda[2]; Masaaki Iwatsuki[3]; Seitaro Kumamoto[2]; Yousuke Katsuda[1]; Yoshitaka Nakanishi[1]; Hideo Baba[3]; Toshihiro Ihara[1]

【緒言】原発腫瘍組織から剥離し、血流に乗って全身を循環している細胞を血中循環腫瘍細胞（Circulating tumor cell, CTC）と呼ぶ。CTC は、簡易検査では判断が難しい微小癌などのがん患者においても確認されており、新たながん診断マーカーとして注目を集めている。しかしながら、血液 1 mL あたりにおよそ 50 億個の血球細胞が存在するのに対し、CTC はわずか数個～数十個しか存在しない。このため、その検出は容易ではなく、前処理として選択的に CTC を濃縮する工程を必要とする。本研究では、がん患者の全血中から CTC の選択的捕捉を試みた。細胞捕捉用の基体としてスリットの入った金フィルターを用いた（Fig. 1）。このフィルターは流体圧力に応じて開口する仕組みとなっており、開口度によっては血球細胞より大きいがん細胞の方がフィルター上に残存し易いことが期待される。また、多くの固形癌種の細胞膜上には EpCAM という膜タンパク質が高発現している。同フィルターに抗 EpCAM アプタマーを修飾させることで、サイズ選択的な物理的選別と標的特異的な結合親和性に基づいた化学的選別の二つの要素により腫瘍細胞が選択的に捕捉されることを期待した。

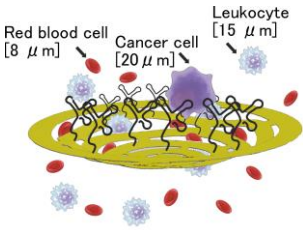


Fig. 1. 抗 EpCAM アプタマー修飾金フィルターによる細胞捕捉の概要図。

【実験】SAM 膜形成分子である 6-Mercapto1-hexanol と 5’末端抗チオール化 EpCAM アプタマーを、様々な割合で混合した。調製した混合溶液を、ピラニア溶液にて洗浄したフィルター表面に滴下し、25°C で 16 時間静置することで SAM 膜形成およびアプタマー修飾を行った。アプタマーの修飾密度はクロノクーロメトリーで測定した。続いて、あらかじめ細胞核を Hoechst33342 にて染色した MDA-MB-453（ヒト乳癌細胞）と HEK-293T 細胞（ヒト胎児腎細胞）をフィルターに通液し、洗浄後、フィルター表面を蛍光顕微鏡で観察した。がん患者の血液からも同様な手順にて CTC の捕捉を試みた。CTC の検出は免疫染色にて行なった。

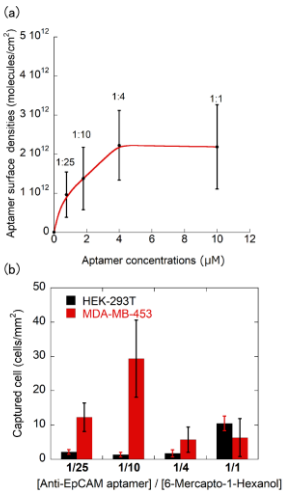


Fig. 2. (a)チオール化抗 EpCAM アプタマーと、6-Mercapto-1-Hexanol を様々な混合比率で修飾した時のアプタマーの修飾密度。両者の合計濃度を 20 μM に固定し、混合比率を変化させた。(b)アプタマー修飾金フィルターでの細胞捕捉の結果。

【結果および考察】アプタマーの修飾密度は、その混合比率と比例した（Fig. 2a）。細胞懸濁液 1 mL を流速 0.5 mL/h にてフィルターに通液したところ、SAM とアプタマーの割合が 10 : 1 であるフィルターにおいて最も多くの MDA-MB-453 が確認され、HEK-293T はほとんど観察されなかった（Fig. 2b）。これより、腫瘍細胞の捕捉数は適切なアプタマー修飾密度において最も多くなることが示唆された。続いて食道胃接合部がん患者の血液 1 mL を用いて実験を行ったところ、4 個の CTC が確認された。抗がん剤治療後に再度実験を行ったところ、CTC の捕捉数は 1 個に減少し、患者の病態との相関が確認された。一方健常者の血液を通液したフィルターからは、腫瘍細胞は確認されなかった。

3 種の酵素を用いたクレアチニン検出用バイオ電極の作製

○原口真綺[1]・中村暢文[1]（[1]東京農工大院工）

Preparation of bioelectrodes for creatinine detection using three enzymes (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1]) HARAGUCHI, Maki[1]; NAKAMURA, Nobuhumi[1]

クレアチニンは筋収縮の際にエネルギー源となるクレアチンの代謝産物であり、その 1 日の尿中排出量は筋肉量によりほぼ一定である。随意尿中クレアチニン濃度を尿中成分濃度の補正に利用するため、簡便なクレアチニン測定法が必要とされる。その一例として、酵素電極を用いて電気化学的かつ特異的に尿中クレアチニンを検出するアンペロメトリッククレアチニンバイオセンサがある。アンペロメトリッククレアチニンバイオセンサとしては Creatininase (CRN)、Creatinase (CN), Sarcosine Oxidase (SOx)の 3 段階の酵素反応を利用するものが多い。これによりクレアチニンがクレアチンに、クレアチンがサルコシンに、サルコシンがグリシンに変換され、最後の酸化反応電流を観測する(Fig. 1)。このような複雑な機構からアンペロメトリッククレアチニンバイオセンサの開発には改善すべき点が多くある。SOx は電極と電子の授受が直接にはできないため、SOx と電極間の電子移動反応を仲介する酸化還元物質(メディエータ)が必要となる。SOx のメディエータとしてはフェロセンカルボン酸 (FcCOOH) が有効であることが知られている [1)]。電極への酵素の固定法の一つとしてポリカチオンとポリアニオンの静電的相互作用を利用したポリイオンコンプレックス(PIC)による包括固定が挙げられる。これまでに当研究室では、他の酵素で poly-L-lysine (PLL)および poly-L-glutamic acid (PGA)を組み合わせた PIC による固定化が有効であることを確認している。本研究では、尿中クレアチニン検出用バイオ電極の作製を目的とし、PLL と PGA を組み合わせた PIC による 3 種の酵素の固定化とレドックスポリマー（FcCONH-PLL）によるメディエータの固定化も試みた。



Fig. 1. Schematic illustration of creatinine detection on a bioelectrode using three different enzymes.

グラッシーカーボン電極上に PLL、PGA と酵素の混合液をキャスト、風乾して酵素を固定した。作製した電極を作用極とし、フェロセンカルボン酸をメディエータに用いてサイクリックボルタンメトリー(CV)測定を行った。初めに、電極と電子移動を行う SOx のみについて PIC による電極への固定化を試みた。PIC を形成する PLL および PGA の濃度を変化させた電極を複数作製し、適切な PLL と PGA の濃度について検討した。CV 測定の結果、25 mM の PLL および PGA を用いた場合にサルコシンの酸化反応に由来する触媒電流が明瞭に確認できた。したがって、以後の実験では 25 mM の PLL と PGA を用いて PIC を形成させた。続いて、CRN、CN、SOx の 3 種の酵素の固定化について検討した。電極上へキャストする混合液中の 3 種の酵素の濃度比を決定するため、(CRN : CN : SOx = 0.25 : 1 : 1)、(CRN : CN : SOx = 0.25 : 1.5 : 1)または(CRN : CN : SOx = 0.25 : 2 : 1)に調製した電極を作製し、CV 測定を行った。その結果、(CRN : CN : SOx = 0.25 : 2 : 1)の場合にクレアチニン存在下で触媒電流が確認できた。次に、レドックスポリマーを利用したメディエータの固定を検討した。PLL とフェロセンカルボン酸を EDC、NHS を用いて縮合させてレドックスポリマーFcCONH-PLL を作製した。電極上に PLL、PGA、FcCONH-PLL と SOx の混合液をキャスト、風乾してメディエータと SOx を固定した。CV 測定の結果、サルコシン存在下で触媒電流が確認できた(Fig. 2)。

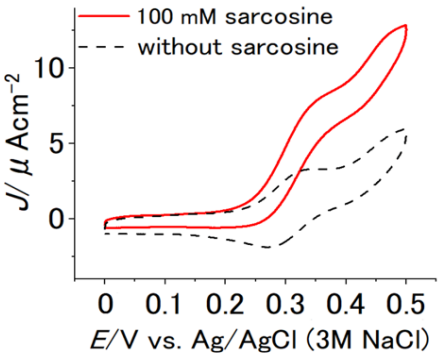


Fig. 2. Cyclic voltammograms of PLL (FcCONH-PLL-SOx) PGA/GCE in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Scan rate 10 mVs^{-1}.

1) U. Lad, G. Kale, and R. Bryaskova, *J. Electrochem. Soc.*, **161**, B98 (2014).

組織イメージングを指向したヘム選択的生体分子修飾化剤の開発

○垣内 亮[1]・平山 祐[1]・辻 翔平[1]・嶋澤 雅光[1]・田村 朋則[2]・浜地 格[2]・
辻 美恵子[1]・永澤 秀子[1]（[1]岐阜薬大院薬、[2]京大院工）

Development of heme-selective biomolecule-labeling probes for tissue imaging (Gifu Pharmaceutical University[1], Graduate School of Engineering, Kyoto University[2]) KAKIUCHI Ryo[1]; HIRAYAMA Tasuku[1]; TSUJI Shohei[1]; SHIMAZAWA Masamitsu[1]; TAMRA Tomonori[2]; HAMACHI Itaru[2]; TSUJI Mieko[1]; NAGASAWA Hideko[1]

【背景】ヘムは二価鉄とポルフィリンの複合体であり、ヘムタンパク質として酸素運搬、電子伝達、酵素反応などの生理的に重要な機能を担う。一方、タンパク質非結合・弱結合型のヘム（遊離ヘム）も存在し、種々のシグナルや、酸化ストレスに関連する。特に、その高い細胞毒性のために、病理学的にも重要な化学種である。しかしながら、ヘムの輸送体やトランスポーター等、ヘムの細胞内・体内動態は現在も不明な点が多く、ヘムの細胞内動態解明のための有用な分析手法も少ない。当研究室ではごく最近、ヘム鉄選択的発蛍光型プローブ H-FluNox を開発した(*J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 3793.)。H-FluNox はヘムに対して高い選択性と応答性を示し、生細胞イメージングで遊離ヘムを検出することに成功している。一方、よりマクロな系である生体組織でヘムを検出しようとした場合、小分子は固定・洗浄操作で流出してしまうため、小分子蛍光プローブを使用するのは困難である。そこで本研究では、遊離ヘムにより活性化され、生体組織に共有結合するプローブ分子を開発し、生体組織でのヘムイメージングを実現することを目指した。

【方法】当研究室でこれまでに開発した二価鉄選択的蛍光プローブにおいて、第三級アミン *N*-オキシドの脱酸素化反応の際、*N*-オキシドを酸素源として鉄オキソ種の生成が示唆されたことと(*Chem. Sci.*, **2017**, *8*, 4858.)、ヘムが遊離の二価鉄よりも鉄オキソ種の生成効率が高いことに着目し(*Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 377)、ヘムによって活性化され生体分子を修飾するフェニレンジアミン-*N*-オキシド(PDANO)構造を開発した(図 1)。PDANO の *N*-オキシドがヘムにより脱酸素化されると、鉄-オキソ種とフェニレンジアミン(PDA)が生成する。フェニレンジアミンは鉄オキソ種により容易に酸化され、ラジカルカチオンとなり、近傍の生体分子と共有結合を形成する。以上の分子設計を基盤とし、*in vitro* 及び細胞・組織イメージング実験用にそれぞれフルオレセインを導入した AANox と、ヘム生合成の場であるミトコンドリアを標的とした MtAANox を合成し、機能を評価した。

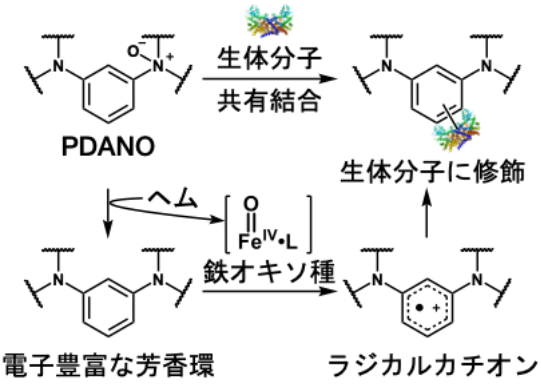


図1. ヘム選択的生体分子修飾化反応の機構

【結果】まず、AANox を用いて、試験管中でウシ血清アルブミンのラベル化実験を行ったところ、ヘム存在下でのみラベル化が進行することがわかった(図 2)。次に、MtAANox を用いて、蛍光イメージングを実施したところ、5-アミノレブリン酸を投与してヘム合成を誘導した場合、強い蛍光シグナルが検出され (図 3)、メタノール固定後でも顕著な蛍光シグナルが検出された。本発表では MtAANox を用いたオミクス解析、組織イメージングの詳細についても述べる。

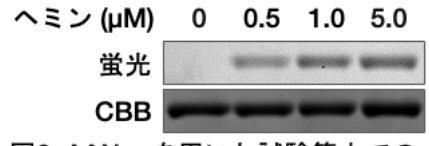


図2. AANoxを用いた試験管中でのヘム選択的生体分子修飾反応の評価

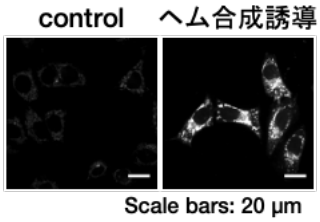


図3. MtAANoxを用いた生細胞でのヘム選択的生体分子修飾反応の評価

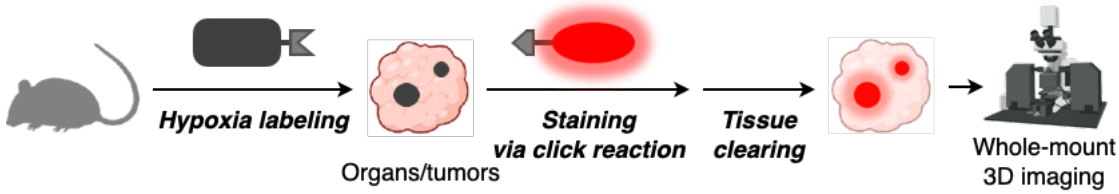
銅触媒クリック反応による低酸素環境の三次元蛍光イメージング法の開発

○田村伊織[1]・坂本大地[1]・伊博[1]・齋藤雄太朗[1]・山田直生[1]・高草木洋一[2]・久保田晋平[3]・田井中一貴[4]・山東信介[1]（[1]東大院工・[2]量子科学技術研究開発機構・[3]北大遺伝子病制御研究所・[4]新大脳研究所）

Development of a three-dimensional fluorescence imaging method for hypoxia utilizing Cu-catalyzed click reaction (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology[2], Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University[3], Brain Research Institute, Niigata University[4]) TAMURA, Iori[1]; SAKAMOTO, Daichi[1]; YI, Bo[1]; SAITO, Yutaro[1]; YAMADA, Naoki[1]; TAKAKUSAGI, Yoichi[2]; KUBOTA, Shimpei[3]; TAINAKA, Kazuki[4]; SANDO, Shinsuke[1]

組織透明化技術は、生体組織を丸ごと深部まで蛍光観察できる技術として近年注目されている。生体組織の構造や生体分子の局在を、全身・臓器スケールかつ一細胞レベルの高い解像度で 3D 解析できる本技術は、医学・生物学研究での活用が広がっている。先行研究では、抗体染色や蛍光タンパク質の遺伝的導入などにより、架橋剤によって固定化可能なタンパク質や核酸といった生体分子を可視化した形態学的な解析が主流である。一方、疾患や生命現象の解明には、形態学的解析に加えて、小分子の濃度や酵素活性といった動的微小環境の解析が重要である。そこで本研究では、動的微小環境の一例として、がんをはじめとする様々な疾患と関連する低酸素を標的として設定し、透明化組織における低酸素環境の蛍光イメージング手法の開発を目的とした。

本研究では、組織摘出とともに失われてしまう低酸素環境を記憶させるために、低酸素に応答して近傍のタンパク質と共有結合を形成する分子プローブを用いることとした。また分子プローブの物性・体内動態や他の標的への応用可能性を考え、低酸素応答・結合部位と蛍光団をクリック反応タグによって分割することで、生体中での低酸素標識と、摘出後組織中でのクリック反応による蛍光標識という 2 ステップにより低酸素領域を可視化する戦略をとった。クリック反応としては生体組織中の安定性や反応特異性を考慮し、反応タグが安定で副反応の少ない銅触媒を用いたアジド–アルキン環化付加反応（CuAAC）を選択した。以上の戦略に従い、従来の低酸素分子プローブを母骨格にアルキンタグを導入した分子プローブと、アジド基を導入した蛍光色素を設計・合成した。実際に、腫瘍・腎・肝組織に対するこれら分子群の低酸素標識能の評価と組織透明化イメージングへの適用を行った。本発表ではその成果について報告する。



©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

コロニーの形態や光学特性を利用したコロニーフィンガープリント法に基づく食中毒菌同定モデルの開発

○多胡光[1]・田中雄介[1]・染谷拓海[1]・前田義昌[1]・林泰圭[2]・原田学[2]・吉野知子[1]・松永是[1]・田中剛[1]（東京農工大学院工[1]、株式会社マルコム[2]）

Development of Identification Model for Foodborne Pathogens Based on Colony Fingerprinting Using Colony Morphology and Optical Properties (Division of Biotechnology and Life Science, Institute of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology[1], Malcom Co., Ltd.[2]) TAGO, Hikaru[1]; TANAKA, Yusuke[1]; SOMEYA, Takumi[1]; MAEDA, Yoshiaki[1]; LIM, Tae-Kyu[2]; HARADA, Manabu[2]; YOSHINO, Tomoko[1]; MATSUNAGA, Tadashi[1]; TANAKA, Tsuyoshi[1]

飲食品製造現場において、病原性微生物の混入は製品の劣化や腐敗、食中毒を引き起こし、公衆衛生上の問題となる。病原性微生物の混入事故を防ぐために、原材料の受入の段階で存在確認が行われている。一般的な検査法である培養法は、信頼性が高い一方で、迅速性や簡便性に欠ける。そのため、培養法は日々検査を行う食品現場には適しておらず、迅速・簡便化が求められてきた。これまで迅速・簡便法として、PCR 法や、MALDI-TOF-MS 法が開発されてきたが、使用機器や試薬が高価なため、中小零細企業が中心である食品製造業に導入することは実態に即していない。したがって、上記の手法と同等に迅速かつ簡便でありながら、より安価な手法が求められている。そこで、当研究室ではコロニーに光を照射し、得られた光学パターンから機械学習によって菌種同定を行うコロニーフィンガープリント法 (colony fingerprinting (CFP)法)を開発してきた[1,2](Fig. 1)。本研究では、コンセプト証明に向けて、9 属 20 菌種からなる CFP ライブラリを構築し、菌種同定を行なった。

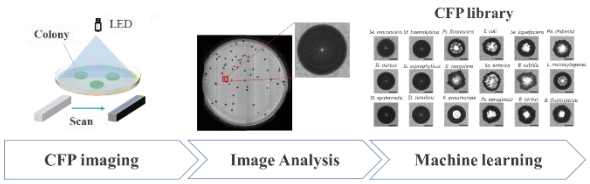


Fig. 1 Overview of bacterial species identification by the CFP methodology.

食品混入微生物として広く知られている真正細菌 20 菌種 (グラム陰性菌 7 種、グラム陽性菌 13 種)を対象として CFP を撮像した。得られた CFP から、形態や光学パターンおよび成長速度を定量する 16 種類の画像特徴量を算出した。続いて、XGBoost を用いて機械学習を行い、菌種を予測した。その結果、判別精度は最高で 95%以上となり、高精度な同定が可能であることが確認された。

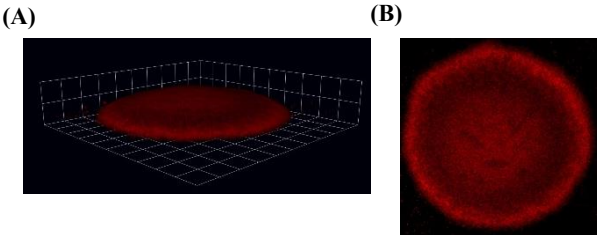


Fig. 2 Fluorescent images of (A) spatial structure and (B) surface structure of *Escherichia coli* colony.

次に、菌特異的な CFP パターンを生じさせる要因の解明にむけ、共焦点顕微鏡を用いてコロニーの 3D 撮像を行った。Nile Red を混合した寒天培地上で GFP を発現した *E. coli* を培養した結果、ドーム状のコロニー形態が認められた (Fig. 2A)。また、コロニー表面において、CFP の中心に表れる輝度値が高い領域と関連する構造は確認されなかった (Fig. 2B)。これより、コロニーが平凸レンズのように、入射光を散乱・集光させた結果、CFP パターンが生じていることが示唆された。

1) Y. Maeda, Y. Sugiyama, A. Kogiso, T. K. Lim, M. Harada, T. Yoshino, T. Matsunaga, T. Tanaka, *Sensors*, 18, 9 (2018).

2) Y. Maeda, Y. Sugiyama, T. K. Lim, M. Harada, T. Yoshino, T. Matsunaga, T. Tanaka, *Biosens Bioelectron* 146, 15 (2019)

フェニルボロン酸含有人工核酸を用いた代謝物解析手法の開発

○本橋優人・西原達哉・田邉一仁（青学大院理工）

Development of system for metabolite analysis using phenylboronic acid-modified artificial oligonucleotides

(Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) MOTOHASHI, Yuto; NISHIHARA, Tatsuya; TANABE, Kazuhito

近年、疾病診断、及び病態の解明に向けて、代謝物が注目されている。とりわけ標的代謝物を単一細胞レベルで解析することは、より詳細な病態の分子メカニズムの解明が期待できることから、広くその手法論の開発が求められている。これまで、代謝物の単一細胞解析には、キャピラリー電気泳動-質量分析法 (CE-MS) などが利用され、アミノ酸を中心に複数成分の代謝物解析が実現されてきた。しかし、CE-MS では 1 細胞ごとの解析が前提とされるため、細胞数をスケールすることは、困難とされてきた。

この課題を解決するため、本研究では次世代シーケンサー (NGS) に着目した。現在、シングルセルトランスクリプトームにおいて、細胞情報を DNA 配列情報に紐づけた後に、NGS による解析を行うことで膨大な数の細胞へ適用可能となっている。すなわち、標的代謝物情報、及び細胞情報を DNA 配列情報へと変換することができれば、NGS による代謝物解析が多数の細胞に対して適用できると考えた。本研究で考案したシステムを **Figure 1** に示した。まず、標的代謝物と反応する官能基を末端に備えた DNA をビーズ上に積載し、標的代謝物と反応後の DNA のみを選択的に回収する。その後、NGS による一斉定量解析を行うことで、代謝物のハイスループット解析の実現を目指した。

本研究では、標的代謝物として乳酸を選択し、代謝物情報を DNA 配列情報へ置き換え可能か検証した (**Figure 1.**)。乳酸の情報を DNA 配列情報へ置き換えるにあたり、フェニルボロン酸を末端に有する人工核酸 (PheBA-ODN)、及び乳酸オキシダーゼ (LOx) を活用した。LOx は、乳酸と反応することにより過酸化水素 (H_2O_2) を産生する。一方、PheBA-ODN は、H_2O_2 との反応でアミノ基末端の人工核酸 (ODN-NH_2) を生成物として与える。このようにして得られた ODN-NH_2 に対して、回収用タグとしてビオチンを付加した後、ストレプトアビジン修飾した磁性ビーズで回収・定量することで乳酸の定量を行うこととした。

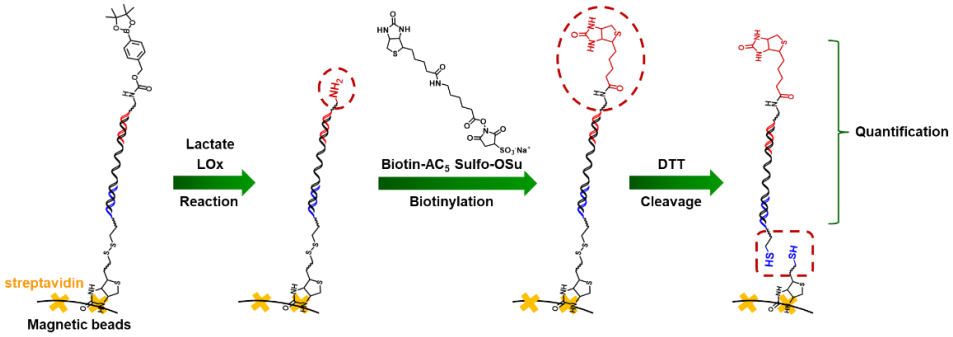


Figure 1. Schematic illustration of lactate quantification using PheBA-ODN on magnetic beads.

まず、乳酸を含む水溶液に対して、LOx、及び PheBA-ODN を添加した後、HPLC にて反応を追跡した。その結果、LOx と乳酸の反応に伴い H_2O_2 が産生し、乳酸濃度に依存して ODN-NH_2 が得られることが確かめられた。次に、磁性ビーズ上に PheBA-ODN を担持し、乳酸の有無に応じて、DNA が回収可能か検証した。具体的には、PheBA-ODN を担持したビーズに対して、乳酸、及び LOx を加え反応させた後、ビオチン化反応試薬 (Biotin-AC_5 Sulfo-OSu) を含む溶液と置換し、ビオチン化した。続いてビーズと DNA の間に設けたジスルフィド結合を DTT によって切断し、上澄を回収した。上澄中に含まれる DNA を定量 PCR により定量した結果、乳酸の存在下で回収 DNA の有意な増加を確認した。本発表では、これら詳細について報告する。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

機能化薄層クロマトグラフィーを用いた組織内グルタチオンイメージング

○西田光輝・西原達哉・田邉一仁（青学大院理工）

Glutathione Imaging in Frozen Tissue Slice Using Functional Thin-Layer Chromatography (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) NISHIDA, Koki; NISHIHARA, Tatsuya; TANABE, Kazuhito

様々な種類の細胞が集まり構成される組織は、その領域ごとに固有の機能を発現している。そのため、組織内に含まれる生体分子の空間分布解析は、生命現象の詳細な理解において有用である。現在、組織内の代謝物は、凍結組織切片に対してイメージング MS を行うことで、その空間分布解析が実現されている。また、豊富な MS スペクトルデータを活用することで多数の代謝物解析も可能である。しかしながら、定量性の乏しさや、解析時間の長さ、装置依存の解析など、多くの課題を抱えている。以上を踏まえ、本研究では、標的代謝物に対する蛍光ラベル化剤をコートした薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いることで、組織内に含まれる代謝物を、簡便かつ、迅速に定量することを目指した。

今回は、グルタチオン (GSH) を標的分子とし、本方法論の実現可能性を検証した。GSH は、酸化還元を担う主要な分子種であり、近年の研究において、がんやアルツハイマー病などの様々な疾病、さらには老化などとの関連が示唆されている重要な分子種である。GSH の検出にあたり、まず初めに、GSH ラベル化剤 (GLA) を設計し、合成した (Fig. 1)。GLA は光解離性リンカー (o-ニトロベンジル) を介して、蛍光色素 (1-ピレンメチルアミン、PMA) 、及び GSH のチオール基と選択的に反応するマレイミド基を備えている。次に、GLA をコートした TLC を用いた代謝物解析を以下に示す。まず、合成した GLA を TLC に塗布する。その後、凍結組織切片を数秒間スタンプし、TLC 上で、組織中の GSH と GLA を反応させる。GSH ラベル化剤 (GLA) と生成物 (GLA-GSH) は極性が大きく異なるため、順相 TLC を用いると生成物を反応部位に保持可能となる。最後に、TLC への紫外光照射によりラベル化剤から蛍光色素 PMA を放出させる。PMA 由来の蛍光発光を定量し、標的分子である GSH の位置、及び量を解析する。

実際に、GSH 入りのアガロースゲルを用いた評価を行ったところ、GSH 添加ゲルを静置した際に、ゲルの形状を保持したまま蛍光が観察された。また、添加する GSH 濃度に応答し蛍光量が線形的に増加した。以上より、GSH の存在位置、及び量を解析可能であることが示唆された。さらに、本方法論を GSH が豊富に含まれる肝臓の凍結切片に対し適用したところ、肝臓由来の GSH と反応し、青色の蛍光発光が検出されることを確かめられた。本発表では、これらの詳細について報告する。

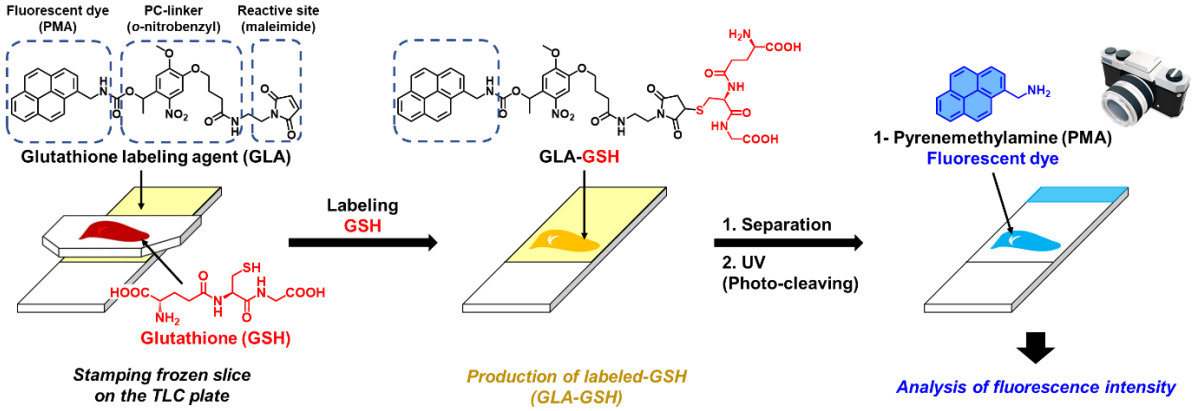


Fig. 1. Schematic illustration of GSH imaging in the frozen slice using functional thin layer chromatography.

「ヒト細胞直交性」の酵素・基質群の開発と細胞のマルチカラー増感分析への適用

○金子諒右[1]・立石宙也[2]・谷戸謙太[2]・山中皓太[2]・神谷典穂[1,4]・竹川薫[5]・新居輝樹[1]・岸村顕広[1,3]・森健[1]・片山佳樹[1,3]（[1]九大院工・[2]九大シス生・[3]九大分子CMS・[4]九大 未来化学創造センター・[5]九大院農）

Development of a group of enzymes and substrates of "human cell orthogonal" and its application to multiple colored sensitization analysis of cells (Graduate School of Engineering, Kyushu University [1], Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University [2], Center for Molecular Systems, Kyushu University [3], Kyushu University Center of Future Chemistry [4], Graduate School of Agriculture, Kyushu University [5]) RYOSUKE, Kaneko[1]; CHUYA, Tateishi[2]; KENTA; Tanito[2]; KOTA, Yamanaka[2]; NORIHO, Kamiya[1,4]; KAORU, Takekawa[5]; TERUKI, Nii[1]; AKIHIRO, Kishimura[1,3]; TAKESHI, Mori[1], YOSHIKI, Katayama[1,3]

【緒言】細胞や組織などの生体サンプルにおけるバイオ分析において、検出感度の向上のために酵素増感反応が用いられる。従来広く用いられてきた増感酵素は西洋わさび由来ペルオキシダーゼ（HRP）やアルカリホスファターゼ（ALP）、β-ガラクトシダーゼ（β-gal）である。しかし、これらの酵素を細胞上のタンパク質検出に用いる際は、細胞に内在する酵素活性が問題となる[1]。加えてこれらの酵素は反応条件が異なるため、同時の利用に適していない。そこで我々は、新しいバイオ分析用の酵素として、ヒト細胞に内在せず、同一の条件下で反応し、互いに交差反応しないものを探索した。見出した酵素のうち α-L-アラビノフラノシダーゼ（α-araf）[2]、α-L-ラムノシダーゼ（α-rha）、β-キシロシダーゼ（β-xyl）の分析酵素としての特性を調べた。これらに対応する turn-on 型の蛍光波長の異なる 3 つの基質を用意したのち、これまでに報告のない試みとして、In cell ELISA での細胞のタンパク質分析を試みた（Fig. 1）。

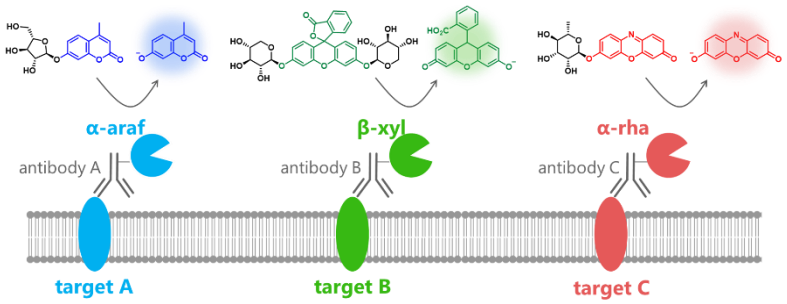


図 1 In cell ELISA での多色分析の概念図

【実験】ビオチン化した酵素及び抗体を、ストレプトアビシン(SA)によって架橋させた。酵素：SA：抗体 ＝3:15:3 μg/mL となるように混合し、18 時間 4℃で架橋させた。酵素がおよそ 1.0 μg/mL となるように 2.0×104 個の SK-BR3 細胞に添加し 4 ℃で 1 時間反応させた。洗浄の後、クマリンの α-アラビノフラノシド基質、レゾルフィンの α-ラムノピラノシド基質、フルオレセインの β-キシロピラノシド基質 100 μM を添加して室温で 1 時間反応させ、蛍光強度を測定した。

【結果と考察】生体サンプルでの低バックグラウンドな分析に有効な増感酵素として α-araf、α-rha、β-xyl を見出した。これらを SK-BR3 細胞上の 3 種の抗原（EGFR、HER2、EpCAM）の同時検出に適用した。これにより 3 種の抗原を同時に増感検出できたことが示された。薬剤や抗体のスクリーニングに有用な In cell ELISA において初となる同時 3 標的分析を達成した。

1) Z. Liu, et. al. J. Immunol. Methods 2000, 234, 153.
2) R. Kaneko, et. al. Chem. Lett. 2021, 50, 1493.

乳酸応答タンパク質内包固定化不織布の開発

○加藤柚奈・水野稔久（名工大院工）

Development of electrospun fibermats, encapsulating the lactate-respondent protein (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) KATO, Yuna; MIZUNO, Toshihisa

これまで当研究室では、蛋白質や機能性核酸などの生体高分子を不織布繊維内部に内包固定化する手法を検討してきており、紡糸途中に架橋反応が進行する後架橋可能な水溶性高分子を利用する SCES（In ***S***itu ***C***rosslinking during ***E***lectro-***S***pinning）法を確立することで、これらの変性を抑えた内包固定化に成功している。これまでに、この手法が適応可能な後架橋可能な親水性高分子の１つとして、生体適合性の高いメタクリルアミド系モノマー2-Hydroxylpropyl-methacrylamide（HPMA）とケトン基を側鎖に持つ Diacetone methacrylamide（DAMA）からなるコポリマーPoly (HPMA/DAMA)、この架橋剤として adipic dihydrazide (ADH)、また表面コートする疎水性高分子として Nylon 6 を用いた検討を行ってきており、これらを電界紡糸することで、均一な繊維径、コアシェル構造を持つ水に不溶な不織布の作製に成功している。本研究ではこちらを用いた蛍光センサー蛋白質内包固定化コアシェル不織布の作製を行なった。内包する蛋白質として、L-乳酸応答性の緑色蛍光バイオセンサーとして知られる eLACCO1.1（**Fig.1**）(*Nature Communications 2021*)を選択し、大腸菌発現系にて発現精製行ったものを不織布の繊維内部に内包固定化した状態にて機能評価を行なった。

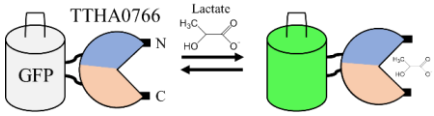


Fig. 1 Schematic diagram of the lactate sensor eLACCO1.1. Conformational changes associated with lactate binding to the TTHA0766 protein are converted to changes in GFP fluorescence intensity.

eLacco1.1 の蛋白質発現は大腸菌 DH10B 株を用いて行い、L-arabinose による発現誘導後 16 ℃で 18 時間培養することにより行った。集菌後、菌体を超音波破砕し、遠心分離後の上清画分を His-Tag カラムにて精製することにより、文献での報告通りに eLacco1.1 を可溶性蛋白質として得た。その後、アミコンによるバッファー交換と濃縮を行なった。eLacco1.1 を繊維内部に内包固定化した不織布作製は、コア繊維成分として Poly (HPMA/DAMA)/ADH、シェル成分として Nylon 6 用いた SCES 法により行なった。コア繊維の前駆体水溶液に、緑色蛍光蛋白質 eLacco1.1 を添加することで、繊維内部への eLacco1.1 の内包固定化は行なった。得られた不織布に対する SEM 測定から、均一な繊維径からなる繊維積層構造の形成、TEM 測定からはコア-シェル構造を持つナノ繊維の形成が確認され（**Fig. 2**）、eLacco1.1 を内包したとしても、不織布ナノ繊維の構造形成は維持されることがわかった。eLacco1.1 を内包固定化したコア-シェル不織布のセンサー機能の評価は、30 mM MOPS バッファー（pH 7.0）、100 mM KCl、1 mM $CaCl_2$ に浸漬後、0~1.0 mM の L-lactate を不織布に添加し、共焦点顕微鏡観察を行うことによりに行なった（**Fig. 3**）。その結果、添加される乳酸濃度と蛍光発光強度に正の相関が得られ、不織布の繊維内部に内包固定化されていても、蛍光センサー蛋白質 eLacco1.1 は必要な構造変化が可能であり、機能を維持できることが分かった。

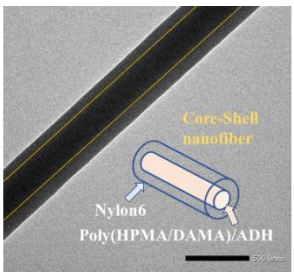


Fig. 2 TEM images of nanofibers in the eLacco1.1-encapsulated core-shell fibermat, consisting of Poly(HPMA/DAMA)/ADH (for core fibers) and Nylon 6 (for shell unit). To get brightness contrast for core and shell portion, phosphotungstic salt was added to the precursor solution of core unit (D = 411.5 ± 16.9 nm).

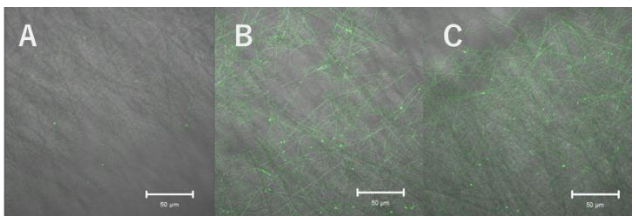


Fig. 3 Confocal microscope images of the core-shell fibermats, encapsulating eLacco1.1, after addition of lactic acid with different concentrations (**A:** 0 mM, **B:** 0.5 mM, **C:** 1.0 mM).

コルチゾール認識ナノ抗体の蛍光免疫センサー化

○井上暁人 [1]・鈴木大凱 [1]・Yinghui Yang[1]・安田貴信 [2]・朱 博 [2]・北口哲也 [2]・上田宏 [2]（[1]東工大生命理工、[2]東工大化生研）

Structure-based design of fluorescent immunosensor using anti-cortisol nanobody (School of Life Science and Technology, Tokyo Tech[1], Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Tech[2]) INOUE, Akihito[1]; SUZIKI, Taiga[1]; YANG, Yinghui[1]; YASUDA, Takanobu[2]; ZHU, Bo[2]; KITAGUCHI, Tetsuya[2]; UEDA, Hiroshi[2]

ナノ抗体はラクダ科動物に由来する重鎖抗体の可変部位であり、安定性が高く、大腸菌等での発現が容易であることから、免疫測定法の新たな結合素子として注目を集めている。我々は以前、抗がん剤・免疫抑制剤であるメトトレキサートを認識するナノ抗体(NbMTX)を用いて、蛍光免疫センサーQuenchbody (nano Q-body)を構築することに成功した [1)]。Q-body は、抗体断片の抗原結合部位近傍に修飾した蛍光色素が近くの Trp 残基によってクエンチされ、それが抗原結合に伴う構造変化により解消されることで蛍光応答を示す。ナノ抗体も Trp 残基が保存されているため Q-body となりうるが、抗体ごとに抗原の結合様式がかなり異なるため、nano Q-body の設計はより難しい問題があった。そこで今回、NbMTX と比べて Trp 残基の位置と抗原の結合する部位が少しだけ異なる、構造既知のコルチゾール認識ナノ抗体 (NbCor) [2)] (Fig. 1)をモデルとし、立体構造に基づく nano Q-body の合理的な設計を試みた。

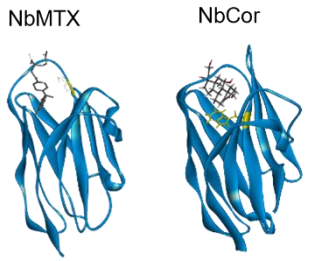


Fig. 1 Comparison of X-ray structure between NbMTX and NbCor. The gray molecule represents antigen and yellow amino acid represents Trp residue.

まず NbMTX と同様の設計で野生型 NbCor (WT)の N 末端に蛍光色素 5-TAMRA を修飾したが、クエンチが確認されなかった。そこで構造上、色素が Trp と相互作用しにくいと考え、N 末端に近い Thr28 を Trp にした変異体(T28W)を作製した。さらに色素としてより抗原結合ポケットに入りやすいと考えられる BDP TMR を使用し、蛍光偏光測定を行った。その結果、5-TAMRA で標識した T28W が約 2 倍の抗原への蛍光応答を示すようになった。一方 BDP TMR 標識体は WT と T28W の両方が抗原依存的蛍光偏光解消を示した(Fig. 2)。

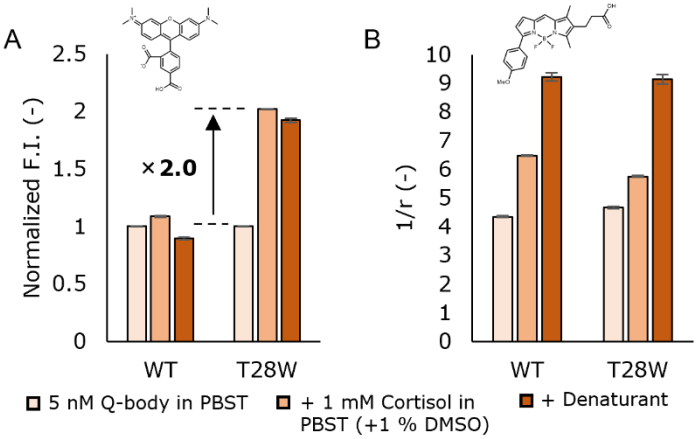


Fig. 2 (A) Normalized fluorescence intensity of 5-TAMRA labeled WT and T28W NbCor. The intensities were normalized by the mean fluorescence intensity of 1 nM Q-body in PBST. (B) Fluorescence polarization assay of BDP TMR labeled WT and T28W NbCor. 1/r shows the dye mobility. The dye structures of 5-TAMRA and BDP TMR are depicted on the top of each graph. The signal upon addition of denaturant indicates maximum response. Error bars represent ± 1 SD (n = 3)

以上の結果から、コルチゾールを認識するナノ抗体の認識部位を立体構造に基づいて改変することで、蛍光免疫センサー化できることが示された。今後変異導入によりこれらのナノ抗体の親和性向上と特異性改変を行うことで、他の低分子に対する高性能な nano Q-body 構築の指針としたい。

1) Inoue, A., Ohmuro-Matsuyama, Y., Kitaguchi, T., Ueda, H., *ACS Sensors* **5**, 3457–3464 (2020).
2) Ding, L. *et al., FEBS Lett.* **593**, 1248–1256 (2019).

イヌ尿路上皮がん由来 CTC 検出に向けたプロトコル確立

○三浦遼[1]・臼井達哉[2]・山本晴[2]・皆上大吾[2]・田中剛[1]・吉野知子[1]（[1]東京農工大院工、[2]東京農工大院農）

Establishment of a protocol for detection of circulating tumor cells from the blood in canine urothelial carcinoma (Graduate School of Technology, Tokyo university of agriculture and technology[1], Graduate School of Agriculture, Tokyo University of agriculture and technology[2]) MIURA, Ryo[1]; USUI, Tatsuya[2]; YAMAMOTO, Haru[2]; AZAKAMI, Daigo[2]; TANAKA, Tsuyoshi[1]; YOSHINO, Tomoko[1]

イヌ尿路上皮がん (Urothelial Carcinoma: UC)は早期発見が困難であり、診断時には高悪性度かつ遠隔転移を伴い、現在の治療法による完全奏功が困難な疾患である。また、イヌが伴侶動物であることや、イヌ UC がヒト UC と類似していることによる動物モデルとしての利点をもつことからイヌ UC のさらなる解析が求められている。近年、低侵襲に得られる組織生検代替試料として、血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC) を用いた診断応用が期待されているが、イヌにおける CTC 研究は殆ど報告がない。当研究室では、末梢血からの CTC 回収に向けてサイズ及び変形能の違いにより CTC を回収可能な Microcavity array (MCA)法を開発し、ヒト臨床試験を進めている [1,2]。本研究ではイヌ末梢血における MCA 法の有効性の評価およびイヌ尿路上皮がん由来 CTC 検出への有用性を検討した。

CTC の回収には、微細貫通孔が配置された Ni 製の丸孔型 MCA (孔径: 8 μm、孔数: 4,000 または 1 万孔)または、長孔型 MCA (孔径: 8-30 μm、孔数: 4,000 孔)を用いた。健常犬血液にイヌ UC 由来細胞株を混合することで作製した罹患犬モデル全血を MCA で補足後、回収効率を算出した。その結果、1 万孔の MCA においては 94%の回収効率であり、4,000 孔の MCA では丸孔型及び長孔型において約 70%であることが確認された。

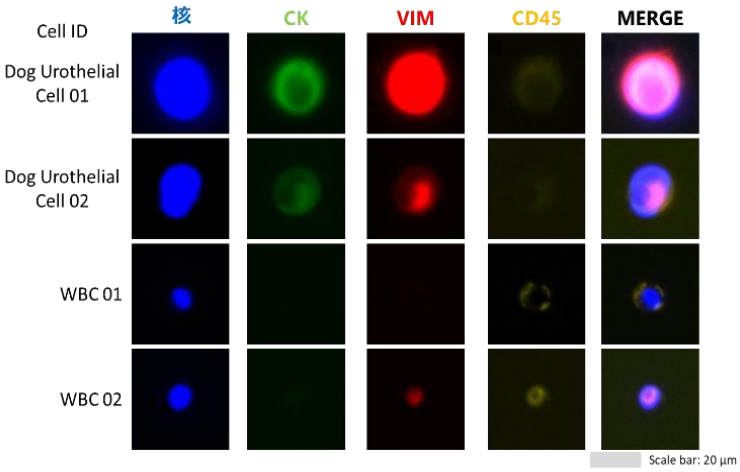


Fig. 2 Fluorescent images of a single dog UC cell or dog while blood cell (WBC) stained by DAPI, cytokeratin (CK), vimentin (VIM), CD45 entrapped on the MCA.

次に PBS 中にてイヌ UC 由来細胞株および健常犬由来白血球細胞(WBC)を混合して作製した罹患犬モデル全血を MCA (孔径 8 μm, 孔数 10,000 孔)を用いたフィルトレーションを行った。抗 CD45 抗体による WBC 染色後に、固定化、透過処理を行い、抗 Vimentin 抗体、抗 Cytokeratin 抗体、DAPI による染色を行った。蛍光観察を行うことで細胞株と白血球の識別を試みた結果、イヌ尿路上皮がん細胞株を DAPI+/Cytokeratin+/Vimentin+/CD45-で、WBC を DAPI+/Cytokeratin-/Vimentin±/CD45+で識別可能であることが確認された。これらの検討をもとに尿路上皮がん罹患犬に対しも、CTC 検出試験を実施している。以上より、本プロトコルを用いたイヌ尿路上皮がん由来 CTC の検出が可能であることが示唆された。

1) R. Negishi et al., *Biosens. Bioelectron*., 67, 438-442 (2015)
2) R. Negishi et al., *Commun. Biol.*, 5(1):20 (2022)

細胞内グルタチオン濃度変化のリアルタイム追跡を可能にするオルガネラ選択的近赤外蛍光プローブの創製

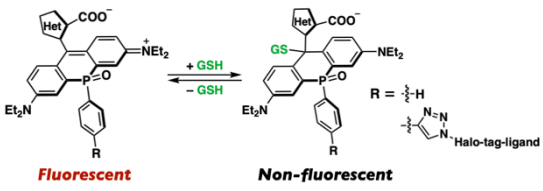
○師悠季[1]・Wu Qian[2]・多喜正泰[2]・山口茂弘[1,2]（[1]名大院理、[2]名大 ITbM）

Organelle-targeted NIR Fluorescent Probe for Real-time Monitoring of Glutathione (Graduate School of Science, Nagoya University[1], ITbM, Nagoya University [2]) MORO, Yuki[1]; WU, Qian[2]; TAKI, Masayasu[2]; YAMAGUCHI, Shigehiro[1,2]

細胞内抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) レベルの変化は、多様な細胞機能や疾病と関連することから、その生体内における動態を低侵襲で長時間にわたり観察可能な蛍光プローブの開発が望まれている。本研究では、近赤外蛍光色素であるホスファローダミンの高い求電子性を利用し、GSH の付加反応によって蛍光応答を示すプローブの開発に取り組んだ。

まず、GSH との親和性を制御するため、ローダミン骨格の 9 位に様々なヘテロアリール基を導入した一連の化合物 (**1**–**4**)を合成し、GSH との解離定数 $K_{d,GSH}$ を調べた。カルボキシフラン置換体 (**1**,**2**) とカルボキシチオフェン置換体 (**3**,**4**) を比較すると、より電子供与性が大きいカルボキシチオフェン置換体ではローダミン骨格 9 位の求電子性が低下し、大きな $K_{d,GSH}$ 値が得られた。また、構造異性体間で比較すると、ヘテロアリール基の 2 位で置換した化合物(**1**,**3**)の方が、3 位で置換した化合物 (**2**,**4**) に比べて小さな $K_{d,GSH}$ 値が得られた。これは、3 位で置換した化合物 (**2**,**4**) では、ヘテロアリール環 4 位の水素原子の立体的な効果により、ローダミン骨格 9 位の炭素原子に対する GSH の求核性が低下したためである。以上、ヘテロアリール基の電子的および立体的な効果により、GSH との親和性を制御することに成功した。化合物 **2** と **3** は、いずれも細胞内 GSH 濃度範囲に適した $K_{d,GSH}$ 値を示したが、化合物の安定性および細胞膜透過性の観点から、3-カルボキシチエニル基を導入した化合物 **3** を GSH プローブとして採用した。

Table 1. Photophysical Properties and $K_{d,GSH}$ Value of synthesized compounds [a].



		R	λ_{abs} /nm	λ_{fl} /nm [b]	ϕ_F [b]	$K_{d,GSH}$ / mM [c]
1		H	736	760	0.03	0.08
2		H	715	740	0.13	2.59
3		H	727	748	0.12	1.12
4		H	711	734	0.16	10.1

a) Measured in 200 mM HEPES buffer (pH 7.4 containing 0.03% DMSO); b) λ_{fl} = 670; c) Determined from absorption spectra.

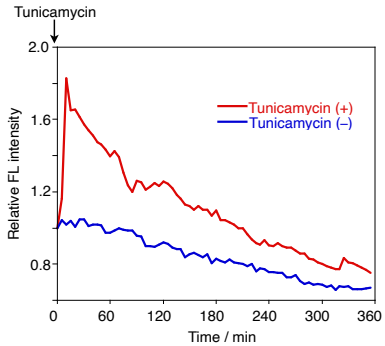


Figure 1. Relative FL intensity in ER stress induced by 1 μg mL^{-1} Tunicamycin.

次に、プローブの細胞内局在を制御するため、化合物 **3** に HaloTag リガンドを導入したプローブ **5** を合成した。HaloTag 融合タンパク質を発現した細胞に対してプローブ **5** を添加し、GSH の捕捉剤である NEM で処理したところ、標的オルガネラからの蛍光シグナルが認められた。以上のことから、プローブ **5** は細胞膜透過性を有し、オルガネラ選択的に GSH 濃度変化を追跡できるといえる。

そこで、プローブ **5** を用いて、小胞体ストレスに対する小胞体内腔の GSH 濃度変化を追跡した。KDEL-Halo を発現させた細胞をプローブ 5 で染色し、その培地にツニカマイシンを添加した。その結果、GSH 濃度の減少に伴う急激な蛍光強度の上昇、および GSH の回復による蛍光シグナルの緩やかな減少が認められた (Figure 1)。このような変化は細胞質中では確認されなかったことから、本プローブは小胞体ストレス研究において有用なツールであることが示唆された。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

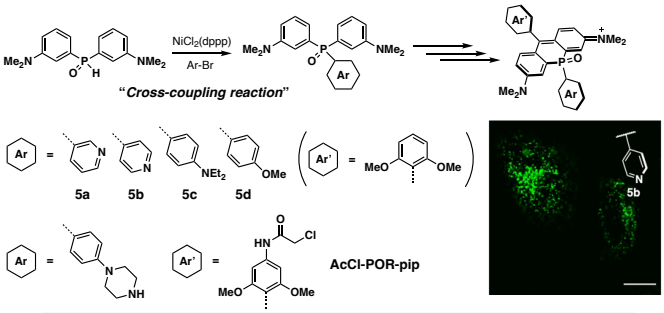
クロスカップリング反応によるホスファローダミン色素の多機能化

○浅田雄一[1]・多喜正泰[2]・山口茂弘[1,2]（[1]名大院理、[2]名大 ITbM）

Multi-functionalization of Phospha-rhodamine Dyes Using a Cross-Coupling Reaction (Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University[1], Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University[2]) ASADA, Yuichi[1]; TAKI, Masayasu[2]; YAMAGUCHI, Shigehiro[1,2]

蛍光イメージングは，細胞内で起こる複雑な生命現象を理解するうえで強力な手法である．有機蛍光色素は有用なツールであり，構造修飾によってオルガネラ局在能やセンシング能を付与することにより，細胞内の局所的なイベントをリアルタイムに可視化することができる．細胞動態を長時間にわたり観測するためには，光毒性の影響が小さい赤色～近赤外域で励起可能な高耐光性の蛍光色素が求められる．この課題に対し，当研究室ではローダミン色素の 10 位の架橋酸素原子を電子求引性のホスホリル基 (P=O) で置換した一連のホスファローダミン色素 (POR) を開発してきた．これらは，700 nm 以上の吸収・蛍光極大波長をもち，かつ高い耐光性を有する優れた近赤外蛍光色素群である．また，最近では，リン原子上のベンゼン環が POR の共役系に含まれていないことに着目し，エチニル基を導入した誘導体を開発し，合成最終段階での色素の機能化に成功している．リン原子上の修飾は POR 色素の高機能化において有用な手法であるが，その多様性を広げるためには合成法の煩雑さが課題であった．そこで本研究では，炭素–リン結合を形成するクロスカップリング反応を利用して，POR 色素に種々の官能基を導入する合成法の開発を行った．これらを用いて生細胞の蛍光イメージングに取り組んだ．

ジアリールホスフィンオキシドに対して，$NiCl_2$(dppp)を触媒として用いて各種 Ar-Br を反応させることにより，種々の置換基が導入されたトリアリールホスフィンオキシドを 51~90%の収率で得た．続く Vilsmeier-Haack 反応，DDQ による酸化，およびアリールリチウムとの反応により，9 位と 10 位に異なる置換基を有する一連の POR 色素を得ることに成功した．



クロスカップリング反応による POR 色素の機能化．
5b を用いた生細胞イメージング．

Ar’として 2,6-ジメトキシフェニル基を有する化合物 **5a**–**5d** は，いずれも 704–711 nm に吸収極大波長を有しており，置換基の影響はそれほど認められなかった．また，細胞膜透過性を有しており，リソソームへの局在が認められた，一方，**5c** については，pH 7.4 の緩衝溶液中における蛍光量子収率はΦ_F = 0.003 であり，他の POR に比べて (Φ_F = 0.09~0.12) 著しく蛍光消光していた．この化合物を pH XX の酸性水溶液中では測定したところ，Φ_F = 0.11 となり，約 37 倍もの蛍光増大が観測された．これらの結果は，化合物 **5c** の蛍光消光は，光誘起電子移動 (PeT) に起因することを示している．本手法を用いることにより，キサンテン色素の 10 位においても PeT の蛍光スイッチング部位を導入できるようになったことから，より複雑な細胞内イベントの可視化に向けた高機能なツール分子創製が可能になる．本合成法の有用性を示すため，9 位にタンパク質結合部位であるクロロアセトアミド基，10 位に pH 感受性官能基としてピペラジンを導入した AcCl-POR-pip を合成した．本発表では合成法の詳細に加え，本 pH プローブを用いた細胞イメージングの結果の詳細についても述べる．

1) M. Taki, S. Yamaguchi et al, *Angew. Chem. Int. Ed*., **2018**, *57*, 32.
2) M. Taki, S. Yamaguchi et al, *Chem. Sci*., **2021**, *12*, 7902.

細胞内部の膜タンパク質の定量的 1 細胞解析法の開発

○梅田侑生[1]・山口哲志[1]・山平真也[2]・中村元直[3]・岡本晃充[1]（[1]東大院工、[2]聖路加国際大、[3]岡山大理）

Quantitative single-cell analysis of membrane proteins inside the cells (School of Engineering, The University of Tokyo[1], Center for Medical Sciences, St. Luke's International University[2], School of science, Okayama University of Science[3]) Umeda, Yuki[1]; Yamaguchi, Satoshi[1]; Yamahira, Shinya[2]; Nakamura, Motonao[3]; Okamoto, Akimitsu[1]

ここから本文を書き始めてください。このテンプレートに直接上書きできます。

細胞内の膜タンパク質は様々な分子ネットワークを形成して幅広い生命現象や疾患に関わるが、細胞内膜上の分子や細胞表層膜上の分子の細胞質側に対して、抗体や阻害剤を作用させて可視化したり機能制御したりすることは困難である。そこで、超音波処理などによって細胞上面の細胞膜を破壊し、底面膜の細胞質側表面を露出させる方法が開発されてきた 1)。我々もマイクロ流体のせん断応力を用いて瞬時に細胞を切断してシート状の細胞底面膜に変換し、露出した細胞質側表面を解析する技術を開発した（図 1）2)。本研究では、光活性化 PEG 脂質表面を用いて並べた 1 細胞アレイにマイクロ流体を作用させ、細胞膜シートアレイを開発した。円形光（直径 14 μm）のアレイパターンを照射してマウス白血球 BaF3 細胞を並べ、高速で生理緩衝液を流すと、均一な円形状の細胞膜シートのアレイを高い変換効率で高密度に調製できた（図 2A）。そして、1 細胞ごとに解析を行うことによって、集団の平均と比べて高い運動性を示した細胞群を検出することに成功している（図 2B）また、電子顕微鏡(SEM)観察などから細胞膜シート上において、アクチン繊維や被服小胞などの細胞内構造を損なわずに観察できることが確認された（図 2C)。また同時に、細胞内膜を含むオルガネラ構造が残されることも示唆され（図 3)、本アレイ上で細胞内部での膜タンパク質の翻訳後修飾と細胞機能との相関を網羅的に 1 細胞定量解析できると期待される。

1) Saka, et al., Nat. Commun. 2014, 5, 4509;
2) Izuta, et al., Sci. Rep. 2017, 7, 14962.

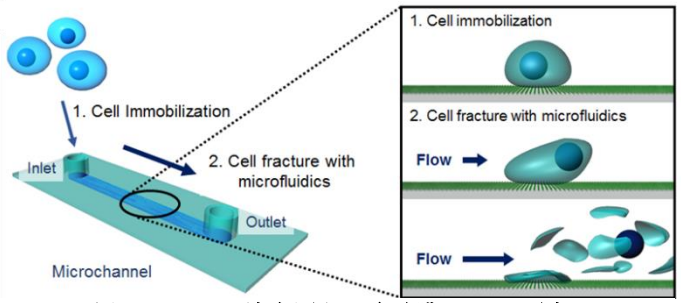


図 1　マイクロ流路を用いた細胞膜シートの形成

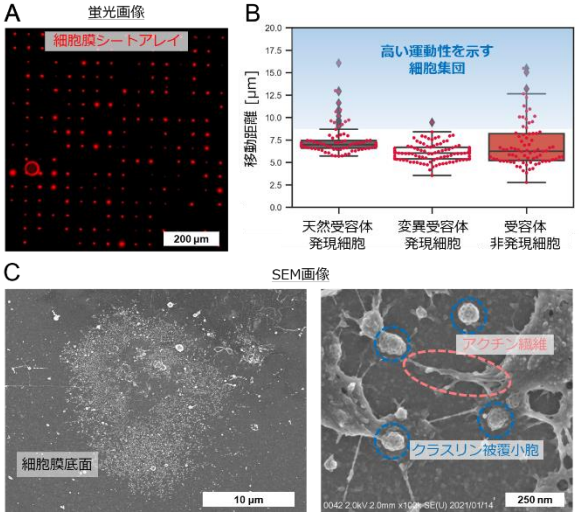


図 2　(A) 均一に並んだ細胞膜シートアレイ、(B) 細胞膜シート上での抗体染色、(C) SEM 観察画像

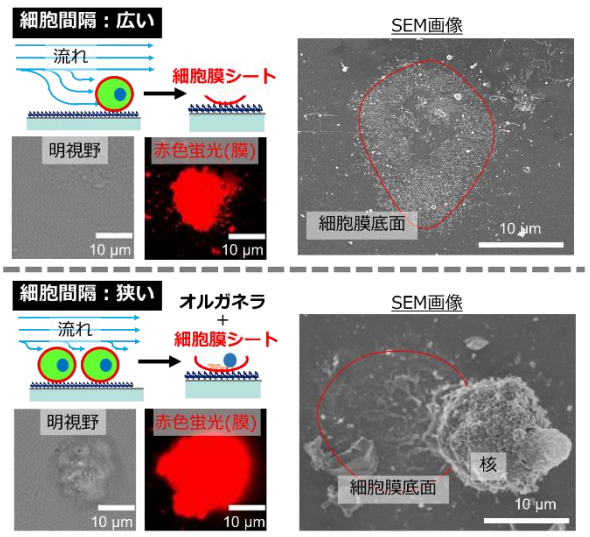


図 3　細胞間隔による細胞破砕後の顕微鏡観察画像の差異

ヘム酵素活性サイトモデル錯体によるシクロヘキサン水酸化における軸配位子効果

○東 俊哉[1]・森本祐麻[1]・藤井 浩[2]・伊東 忍[1]（[1]阪大院工、[2]奈良女大）

Effects of Axial Ligand on Cyclohexane Hydroxylation by Compound I Model Complex

(Graduate School of Engineering, Osaka University[1], Graduate School of Science, Nara Women's University [2])
HIGASHI, Toshiya[1]; MORIMOTO, Yuma[1]; FUJII, Hiroshi[2]; ITOH, Shinobu[1]

生体内の脂溶性基質の代謝過程において中心的な役割を担うヘム酵素は、鉄(IV)オキソポルフィリン-π-カチオンラジカル種 (Compound I) を酸化活性種として利用している。これまでの Compound I 研究で、Compound I のオキソ配位子のトランス位に位置する軸配位子はその酸化活性に大きな影響を与えることが知られている。例えば、Compound I モデル錯体によるエポキシ化反応、水素移動反応、脱メチル化反応において軸配位子に依存して大きく反応速度定数が変わることが確認されている。[1] しかし、Compound I は極めて不安定であるために、反応性に乏しいアルカンの水酸化における軸配位子効果は精密な検討を行うことが不可能であった。我々は既に、α,α,α-trifluorotoluene (TFT) を溶媒として用いた場合、Compound I モデル錯体の寿命が著しく長寿命化することを見出している。[2] 本研究では、この溶媒系を利用してシクロヘキサン水酸化反応に及ぼす軸配位子効果を系統的に検討した。

TFT と 1,3-bis(trifluoromethyl)benzene (HFX) の混合溶媒中で様々な軸配位子 **L** (**L**: NO_3^-, CF_3COO^-, Cl^-, AcO^-, BzO^-, F^-)を持つ鉄三価錯体 Fe^{III}(TMP)(**L**) (**1**$^{\mathbf{L}}$, 28 μM)を調製し、紫外可視分光光度計を用いてその生成を確認した。得られた **1**$^{\mathbf{L}}$ をオゾン酸化することで、対応する Compound I モデル錯体 Fe^{IV}(O)(TMP)(**L**) (**2**$^{\mathbf{L}}$) を生成させた。この錯体溶液に過剰量のシクロヘキサン (25–400 mM) を加えて酸化反応を開始し、紫外可視吸収スペクトルの経時変化を追跡した。反応は一次の速度式に従って進行し、ここから得られた擬一次速度定数 (k_{obs}) の基質濃度依存性から、シクロヘキサン水酸化反応の二次反応速度定数 (k) を決定した (Figure 1a) 。反応後の溶液の GC-FID による分析より生成したシクロヘキサノールの量を定量し、シクロヘキサンの水酸化反応が、**2**$^{\mathbf{L}}$ の量に対してほぼ定量的に進行していることを確認した。

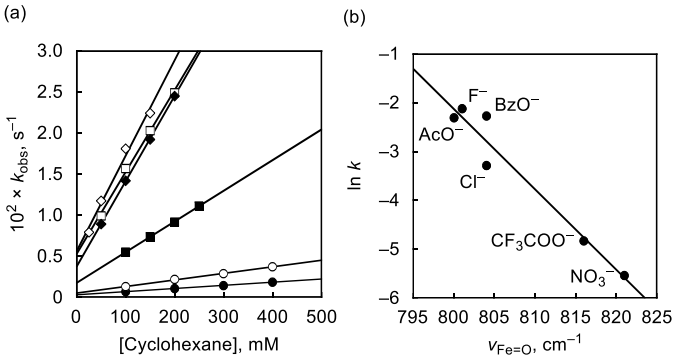


Figure 1. (a) k_{obs} vs cyclohexane concentration obtained for cyclohexane oxidation reaction by **2**$^{\mathbf{L}}$ (**L** = NO_3^-: closed circle, CF_3COO^-: open circle, Cl^-: closed square, AcO^-: open square, BzO^-: closed diamond, F^-: open diamond) (b) Dependence of logalism of k (ln k) on Raman band of **2**$^{\mathbf{L}}$ for Fe–O bond streching vibration ($\nu_{Fe=O}$).

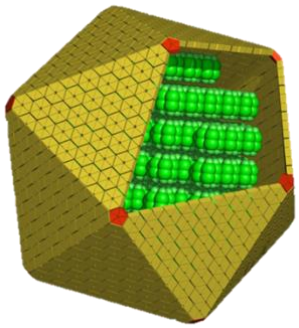
軸配位子に応じて明瞭な反応速度の違いが見られ、最も活性の高かった **2**$^{\mathbf{F}}$ と、最も活性の低かった **2**$^{\mathbf{NO3}}$ は、31 倍の速度差を与えた (Figure 1b)。この二次反応速度定位数 (k) は **2**$^{\mathbf{L}}$ の還元電位[1] や軸配位子アニオンの塩基性度とは相関関係を示さなかった一方で、**2**$^{\mathbf{L}}$ の鉄－酸素結合の伸縮振動の波数 ($\nu_{Fe=O}$) [3] との間には強い相関が見られた。本発表ではこの詳細について議論する。

[1] H. Fujii, and co-workers, *Inorg. Chem*. **2012**, *51*, 7296–7305.
[2] Y. Morimoto, H. Fujii, S. Itoh, and co-workers, *Angew. Chem., Int. Ed*. **2019**, *58*, 10863–10866
[3] Z. Gross, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 368–371.

新規ナノ材料開発を志向したタンパク質超分子カルボキシソームの外殻タンパク質 CcmO の生化学的特性解析

○大久保 詠一郎[1]・杉山 由花[1]・大畠 昌也[1]・中村 隆太郎[1]・松村 洋寿[1]・野口恵一[2]・養王田 正文[2]・尾高 雅文[1]（[1]秋田大院・理工，[2]農工大院・工）

Characterization of biochemical property of β-carboxysome shell protein CcmO toward the development of novel nanomaterials (Graduate School of Engineering and Science, Akita University[1], Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology [2]) OKUBO, Eiichiro[1]; SUGIYAMA, Yuka[1]; OHATA, Masaya[1]; NAKAMURA, Ryutaro[1]; MATSUMURA, Hirotoshi[1]; NOGUCHI, Keiichi[2]; YOHDA, Masafumi[2]; ODAKA, Masafumi[1]


カルボキシソームの構造モデル

【 Introduction 】　近年，ウイルスキャプシドや Bacterial microcompartments (BMCs)のようなナノ粒子への薬物およびゲストタンパク質導入による，薬物送達システムや新規ナノ材料の開発研究が盛んに行われている。しかし，上記の分子はサイズが小さく(<50 nm)，大きすぎるゲスト物質の導入は困難である。カルボキシソームはシアノバクテリアがもつ直径 150 nm のタンパク質超分子構造体であり，正二十面体の外殻構造内に約 1 万分子もの炭素固定酵素 ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)を，炭酸脱水素酵素活性をもつ足場タンパク質とともに内包することで，シアノバクテリアの光合成効率を高めている。外殻は 5 または 6 角形のタイル状構造を単位構造とした，7 種類のタンパク質サブユニットが自己集合して形成される。当該分子は従来のタンパク質粒子と比較して非常に大きい内部スペースをもつことから，より多くのゲスト物質を導入可能な生体分子への応用が期待されている。しかし，組換え体として発現させた各外殻タンパク質サブユニットの単位構造間に明確な相互作用が確認できず，単位構造から外殻超分子構造が形成されるメカニズムが不明であるため，本分子の生物工学的な応用は半ば停滞している。我々はこれまでに，好熱菌 *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 由来カルボキシソームの全外殻タンパク質の発現と精製を行い，唯一，機能および構造が未知な外殻成分 CcmO がハイドロゲル状の凝集体を形成することを明らかにした。本発表では，カルボキシソーム外殻の自己集合機構に重要であると推測される外殻タンパク質 CcmO の生化学的特性解析について報告する。

【Procedure】　*Haliangium ochraceum* 由来 BMCs の構造解析より，6 角形の外殻タンパク質は単位構造界面に PRPH モチーフをもち，Arg が隣接するサブユニットの疎水性ポケットに入り込むように相互作用することが報告されている。当該モチーフは CcmO の 85 番目および 190 番目の Arg の 2 箇所に保存されているため，各 Arg を Ala に置換した変異体 CcmOR85A, CcmOR190A および二重変異体 $CcmO_{DM}$ を作製した。また，CcmO は天然変性領域を多く含むと推定される 38 残基の C 末端テール(C_{tail})をもつ。C_{tail} のさらに C 末端 10 残基は Pro を 4 つ含む Pro リッチな配列であり，他の外殻タンパク質には見られない特徴である。C_{tail} 欠損変異体 CcmOΔC_{tail} および C_{tail} の末端 10 残基の Pro を Ala に置換した変異体 CcmOala を作製した。作製した各 CcmO 変異体について，サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による多量体状態の検討，円偏光二色性スペクトル(CD)による二次構造状態の検討を行った。

【Results & Discussion】　各 CcmO 変異体は見かけの凝集体を形成しなかったことから，PRPH モチーフの Arg および C_{tail} の Pro が CcmO の集合体形成能に関与していると考えられる。SEC 解析より，CcmOR85A，CcmOR190A，$CcmO_{DM}$ はそれぞれ同じ移動度であったことから，いずれも同じ多量体構造をとると考えられる。CD スペクトル解析より，$CcmO_{DM}$ および CcmOala は 209 nm および 222 nm の負のピークを示したことから，CcmO はαヘリックスを多く含む構造をとると考えられる。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

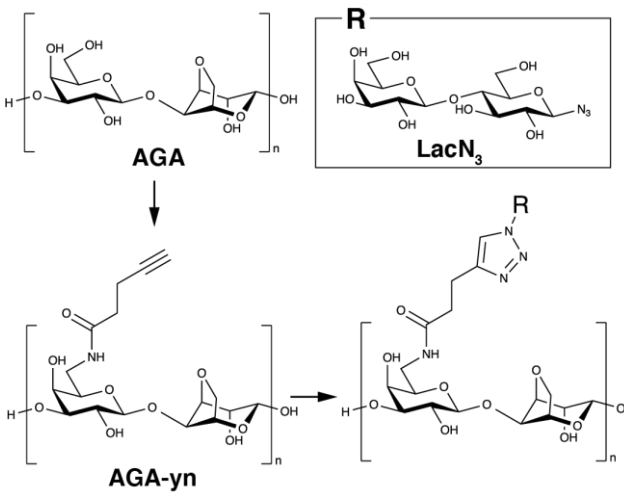
糖を側鎖に有するアガロースゲルビーズの調製とその応用

○吉田圭佑[1]・飛渡瑞希[1]・神田百花[2]・長谷川輝明[2,3]（[1]東洋大院生命、[2]東洋大生命、[3]東洋大バイオナノ）

Preparation and applications of agarose gel beads carrying carbohydrate-appendages (Graduate School of Life Sciences, Toyo University[1], Faculty of Life Sciences, Toyo University[2], Bio-Nanoelectric Research Centre, Toyo University[3]) YOSHIDA, Keisuke[1]; TOBITO, Mizuki[1]; KANDA, Momoka[2]; HASEGAWA, Teruaki[2,3]

スフィンゴ糖脂質（GSL）は細胞膜の主要構成成分であり、親水性の糖鎖部位および疎水性のセラミド部位から構成されている。これらが、隣り合う細胞間において糖鎖間相互作用（CCIs）することが、細胞接着の初期駆動力であるが、そのメカニズムや糖鎖選択性、イオン選択性などは未だ一部しか解明されていない。我々は、これまでにバクテリアセルロースを成分とするヒドロゲルであるナタデココ（NDC）を化学修飾することで糖鎖を導入し、これら糖修飾 NDC の水中における会合を基に可視レベルにて CCIs を評価する方法を確立した。[1)]

一方、本研究では糖を側鎖として有するアガロースゲルビーズを、GSL にて内部コーティングしたマイクロ流路に流し、その通過速度を基に CCIs を評価する新たなシステムの開発に取り組んでいる。まず、アガロース（AGA）をトシルクロライド処理することで、トシル化アガロース（AGA-OTs）を合成し、さらに NaN_3 処理することによって、アジド化アガロース（AGA-N_3）を合成した（Scheme 1）。AGA-N_3 に対する元素分析によって二糖繰り返し単位あたり 13.4%の割合でアジド基が導入されていることが分かった。次いで、AGA-N_3 を $NaBH_4$ で還元することでアミノ化アガロース（AGA-NH_2）を合成した。次いで、90℃のトルエンと界面活性剤の混合液に高温の AGA-NH_2 水溶液を滴下して激しく磁気攪拌したのち、反応液を氷浴中で急冷することで、直径 100 μm ほどの AGA-NH_2 ゲルビーズの調製に成功した。そののち、別途合成しておいたペンチン酸活性エステルを使用して AGA-NH_2 ゲルビーズに対して末端アルキンを導入することで、末端アルキン導入アガロース（AGA-yn）ゲルビーズの調製にも成功した。尚、AGA-yn ゲルビーズ調製の確認は、アジド基を持つローダミンを、クリック反応を利用して AGA-yn ゲルビーズと反応させ、ゲルビーズを赤色に着色させることで行った（Fig. 1）。今後は、別途合成したアジド化ラクトース（$LacN_3$）を、クリック反応を利用して AGA-yn ゲルビーズに導入するとともに、マイクロ流路を使った CCIs 評価に着手する予定である。



Scheme 1. Synthetic scheme to access carrying carbohydrate-appendages

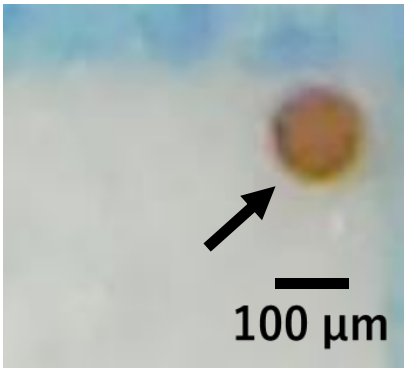


Fig. 1. Optical microscopic image of the agarose gel beads

1) K. Yoshida, et. al., *Carbohydr. Polym*, **223** (2019) 115062-115070.

脂質固定化ビーズを用いた脂質特異的結合タンパク質の網羅的解析

○森藤将之[1]・木下祥尚[1]・川井隆之[1]・松森信明[1]（[1]九州大院理）

A comprehensive analysis of lipid-specific proteins with lipid-immobilized beads (Graduate School of Science, Kyushu University[1]) MORITO, Masayuki[1]; KINOSHITA, Masanao[1]; KAWAI, Takayuki[1]; MATSUMORI, Nobuaki[1]

生体膜は、数万種類に及ぶ多様な脂質からなる脂質二重膜とそこに存在する多種の膜タンパク質から構成される。生体膜は膜輸送や情報伝達など多岐にわたる重要な生理機能を有しており、これら膜機能の多くは膜タンパク質が担っている。近年、脂質が特異的に膜タンパク質と相互作用することが報告され、脂質と膜タンパク質の相互作用が膜タンパク質の機能を制御することが明らかになりつつある（*Nature* **2012**, *481*, 525）。脂質-タンパク質相互作用を明らかにすべく脂質結合タンパク質のスクリーニングが行われているが（*Biochem. J.* **1990**, *265*, 849; *Proteomics* **2012**, *12*, 2179）、従来の手法では界面活性剤存在下で使用できなかったり、脂質分子が膜構造をとっていなかったりと、膜タンパク質に適する条件でのスクリーニングは実現されていなかった。そこで本研究では、磁性ビーズ上に共有結合を介して脂質を高密度に固定化した「脂質固定化ビーズ」を作製し、脂質特異的結合タンパク質の網羅的解析を行った（Fig. 1）。このビーズは表面に脂質膜を模した構造を持ち、界面活性剤存在下でも構造を維持できるため、従来では困難であった膜タンパク質のスクリーニングが可能である。

今回、アポトーシス誘導など重要な生理機能に関与する脂質として知られるセラミド(Cer)やスフィンゴミエリン(SM)およびこれらの誘導体を固定化したビーズを調製した。各種の脂質のアシル鎖末端にアミノ基を導入した脂質誘導体を合成し、ビーズ表面のカルボキシ基と結合させることでビーズへの固定化を行った。このビーズと細胞溶解液などを混合し、4 °C にて 4 時間静置した後にバッファーで洗浄を行い、その後 90 °C にて熱溶出を行った。その後 SDS-PAGE によるバンド確認と LC-MS/MS によるショットガンプロテオーム解析を実施した。同定された候補タンパク質について、表面プラズモン共鳴法（SPR）による相互作用解析を行った。

まず既知の SM 認識タンパク質であるライセニンを用いて実験を行った結果、従来のリポソームを用いた手法よりも効率的かつ選択的にライセニンを回収できることを確認した。続いてマウス神経芽腫細胞抽出液のスクリーニングを行ったところ、脂質毎に特異的なバンドが観察され、続くプロテオーム解析によって 50 種類を超える脂質特異的結合タンパク質を同定した。その中で、SM 特異的結合タンパク質として同定された Tumor Protein D54（TPD54）に注目し、SPR によって脂質膜との相互作用を検証したところ、TPD54 と同じファミリーに属する Tumor Protein D53 において SM 特異的な結合を確認した。TPD54 との相互作用についても現在解析を行っており、その結果についても併せて報告する予定である。

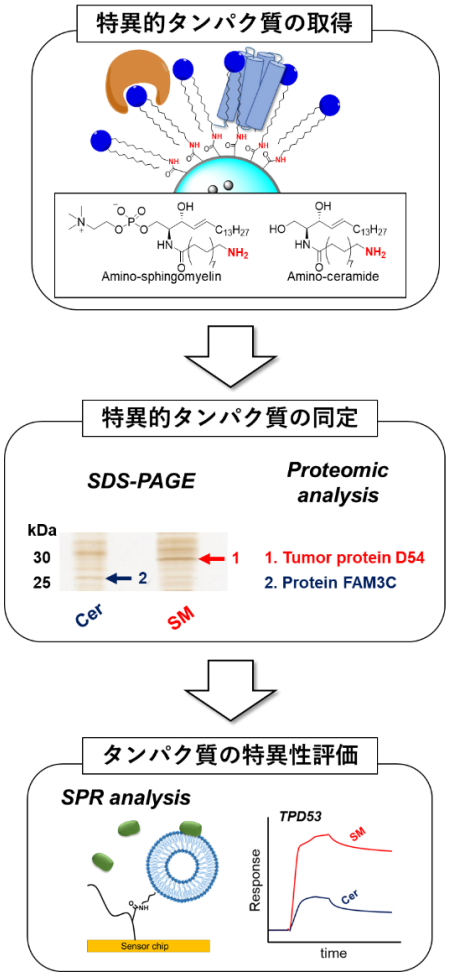


Fig. 1　脂質固定化ビーズを用いた脂質特異的結合タンパク質の網羅的解析の概要。

糖を側鎖に有するバクテリアセルロースヒドロゲルの合成と応用

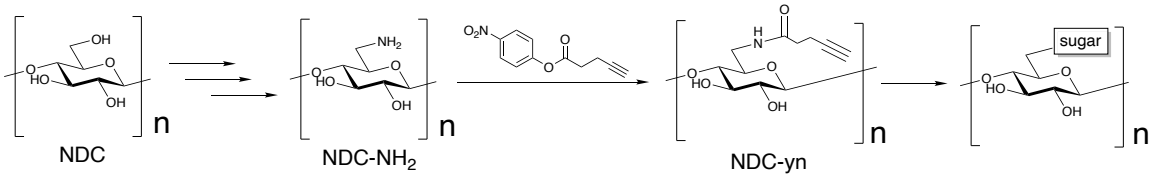
○飛渡瑞希[1]・長谷川輝明[2]（[1]東洋大院生命、[2]東洋大生命）

Synthesis and applications of bacteria cellulose hydrogels having pendent carbohydrates sugar units

(Graduate School of Life Sciences, Toyo University[1], Faculty of Life Sciences, Toyo University [2]) TOBITO, Mizuki[1]; HASEGAWA, Teruaki[2]

隣り合う細胞表面のスフィンゴ糖脂質（GSLs）が糖鎖間相互作用（CCIs）することで、各種の細胞接着が誘導されている。しかしそのメカニズム（糖鎖選択性やイオン選択性など）はあまり解明されていない。CCIs のメカニズム解析を目指した先行研究には、糖鎖高分子や糖修飾金ナノ粒子などを用いたモデル系が存在するが、これらの先行研究において CCIs による接着・会合を評価するためには、表面プラズモン共鳴装置（SPR）や透過型電子顕微鏡（TEM）などの高価かつ専門知識を要する測定機器が必須であった。一方で CCIs による会合を目視にて評価できれば、高価な装置を使用することなく CCIs が解析でき、この分野の研究の進展に大きく寄与できると考えられる。このような考えのもと、本研究室ではバクテリアセルロースから構成された可視サイズのヒドロゲルであるナタデココ（NDC）を用いた CCIs の評価・検出方法を確立させた。[1)] 具体的には、洗浄して不純物を取り除いた市販の NDC に、過ヨウ素酸酸化によるホルミル基の導入、還元アミノ化による末端アルキンの導入、さらにはアジド化糖とのクリック反応を行って各種の糖修飾 NDC を合成し、これら糖修飾 NDC の各種イオンを含む水溶液中での会合を基に、CCIs の検出を行うことができた。しかしこの合成方法では、過ヨウ素酸酸化によってセルロースが部分的に分解されるためか NDC が脆くなってしまい、高密度での糖鎖の導入が困難であった。実際に、本合成方法では繰り返し単位あたり 5〜7%ほどの糖鎖しか導入できていない。

本研究では、前述の欠点を改善するため過ヨウ素酸酸化ではなくブロモ化を介した糖修飾 NDC の合成を試みた。このことで、より高密度に糖鎖を導入することができれば、CCIs を介した NDC との会合をより明確に観察できるはずである。



Scheme 1. Synthetic root to NDC-sugar

NDC をトリフェニルホスフィンおよび四臭化炭素を用いてブロモ化を行った後、アジ化ナトリウムによるアジド基の導入を行った。その後、テトラヒドロホウ酸ナトリウムを用いた還元を行い、ペンチン酸活性エステルを用いて NDC に末端アルキンを導入した（**Scheme 1**）。次に別途合成しておいたアジド化糖をクリック反応にて NDC に導入し糖修飾 NDC を合成した。今後は、この糖修飾 NDC を用いて CCIs の会合評価を行なっていく予定である。

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

細胞間情報伝達分子の捕捉を原理とする黄色ブドウ球菌のクオラムセンシング阻害

○稲垣瑠妃・立見尚也・奈須野恵理・加藤紀弘（宇都宮大工）

Inhibition of quorum sensing by capturing *Staphylococcus aureus* intercellular communication molecules

(School of Engineering, Utsunomiya University) INAGAKI, Ruki; TATSUMI, Naoya; NASUNO, Eri; KATO, Norihiro

薬剤耐性を獲得した細菌による感染症が深刻化している。メチシリン耐性を獲得した Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)の出現により、黄色ブドウ球菌感染症のリスクは高くなっている。本研究では、抗生物質などの薬剤を投与せずに細菌感染症を予防する新手法として、*S. aureus* の細胞間情報伝達機構 Quorum Sensing (QS)の抑制法を試験した。*S. aureus* は細胞間情報伝達分子である Autoinducing Peptide (AIP)を介して、集団として複数の病原性因子の発現を制御している。菌体外に放出された AIP を培養液中で捕捉するのに適した高分子膜をスクリーニングし、その QS 阻害効果を評価した。

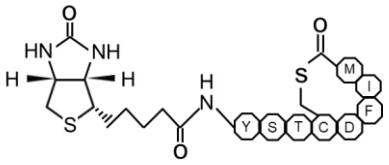


Fig. 1 Biotinylated-autoinducing peptide (AIP-I).

アミノ酸 8 残基の環状ペプチドである AIP が、タンパク質吸着能に優れるニトロセルロース (NC) 膜に捕捉される効果をビオチン修飾した Biotin-AIP-I で試験した (Fig. 1)。所定濃度の Biotin-AIP-I 水溶液に 6 mg (surface area: 2.0 cm^2) の NC 膜を浸漬し 25 °C で吸着平衡とした後に、溶液中に残存する Biotin-AIP-I 量を、共振周波数 27 MHz の水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法により定量した。QCM バッチセルの Au 電極上に形成した COOH 末端の SAM を NHS 活性化エステルとし、更に NeutrAvidin を固定化した (Fig. 2)。Langmuir 吸着等温解析するとプロットは直線上に集中し吸着平衡定数は $K = 3\times10^5$ M^{-1}、飽和吸着量は 0.34 μmol/g-membrane と高い値を示した。

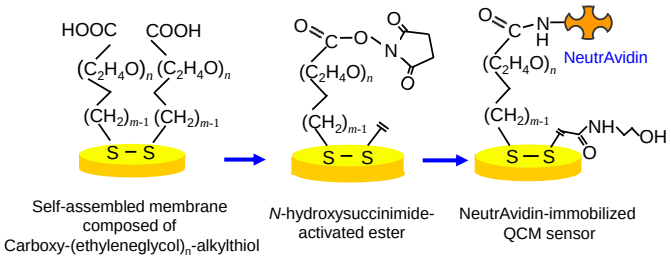


Fig. 2 Avidin-immobilized QCM sensor electrode.

S. aureus が QS により発現する毒素の一つに溶血素 α-hemolysin がある。α-hemolysin は宿主の細胞膜上に 7 量体として集積し、細胞膜を破砕する。α-hemolysin 発現量をヒツジ赤血球 (SRBC)の溶血活性で試験し、溶出したヘモグロビン量で評価した。AIP が捕捉されれば QS 不活性となり α-hemolysin 生産は抑制される。AIP-I を発現する *S. aureus*ATCC12600 を NC 膜を 0.6 wt% Luria-Bertani 培地に植菌し培養した (37 °C, 10 h)。Negative Control としてタンパク質吸着能を持たないポリエーテルスルホン (PES) 膜を用いた。培養上清と SRBC を混合し、37 °C , 1 h のインキュベートで溶血を促した。その後、溶出したヘモグロビンを極大吸収波長である 543 nm の吸光度として測定し、界面活性剤である TritonX-100 を 100 %溶血 Control として溶血率を算出した (Fig. 3)。NC 膜、PES 膜添加条件の両方で菌体増殖阻害が観察されなかったが、NC 膜添加条件では溶血率が大きく減少した。これらの結果は、AIP-I が NC 膜に吸着され QS 不活性状態の維持により α-hemolysin 生産が抑制されたことを示唆している。

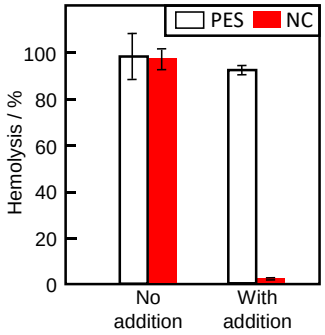


Fig. 3 Inhibitory effect of the membrane addition on the SRBC hemolysis.

ミュータンス連鎖球菌が形成するバイオフィルムの安定性に対する不溶性グルカンの寄与

○牛島成実[1]・奈須野恵理[1]・泉福英信[2]・加藤紀弘[1]（[1]宇都宮大工、[2]日本大松戸歯）

Contribution of water-insoluble glucan to the stability of biofilms formed by *Streptococcus mutans* (School of Engineering, Utsunomiya University[1], School of Department of Dentistry, Dentistry at Matsudo, Nihon University[2]) USHIJIMA, Narumi[1]; NASUNO, Eri[1]; SENPUKU, Hidenobu[2]; KATO, Norihiro[1]

Streptococcus mutans は歯表面におけるバイオフィルム (BF) の形成に関与しう蝕を誘導する。スクロースを基質としてグルカンを生産する 3 種の Glucosyltransferase を保有しており、GtfB と GtfC からは不溶性グルカンが、GtfD からは可溶性グルカンが生産され菌体の接着に寄与する。GtfC と GtfD に由来するグルカンは協働して歯表面と菌体の相互作用を強化する付着性グルカンとして作用し、GtfB に由来するグルカンは菌体表面に存在し菌体同士の付着を促進することでミクロコロニーを誘導する。本研究では、*S. mutans* UA159 野生株と、不溶性グルカン生産に関与する Gtf 欠損株 (Δ*gtfB*, Δ*gtfC*, Δ*gtfBC*)の培養及び BF 形成試験を行い、培養液中の菌体フロック径に及ぼす不溶性グルカンの影響をレーザー回折/散乱法で評価した。更に、BF 形成時の上清画分あるいは BF 画分から抽出したグルカン量を、可溶性及び不溶性グルカン量の指標としてフェノール硫酸法で評価した。

S. mutans を Tryptic Soy Broth (TSB)培地 (0 or 0.25 % スクロース)を用いて静置培養 (37 ºC, 16 h, 5 % CO_2)した。培養液を水で希釈しフロック径分布を評価した(Fig. 1)。UA159 野生株のフロック径を培養時のスクロースの有無で比較すると、TSB 培地においてモード径 (最頻径) 45 μm の分布は、スクロースを添加 (TSBs)することで 3～300 μm まで拡大し生成したグルカンの影響は顕著に現れている(Fig. 1a)。次にスクロース添加条件でΔ*gtfB* 株、Δ*gtfBC* 株について試験すると、ミクロコロニーの形成に関与する不溶性グルカン非生産のΔ*gtfB* 株ではモード径が 30 μm に小さくなり、更に固体表面への付着に関与する GtfC も欠損させたΔ*gtfBC* 株では、浮遊細菌 (1 μm) 及び連鎖球菌特有の菌体の連結構造に由来する 10 μm 付近のピークの二峰性へと変化した(Fig. 1b)。

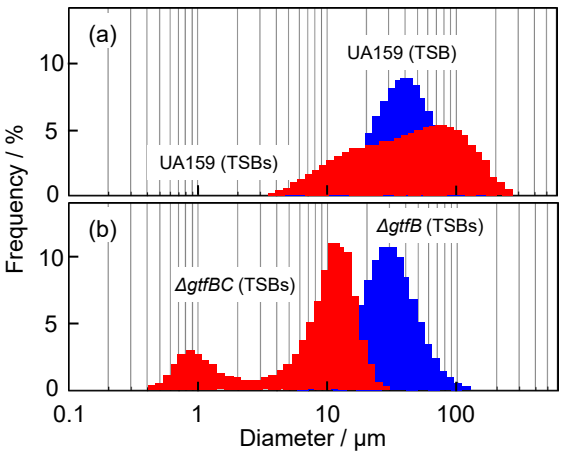


Fig. 1 Distribution analysis of cell floc diameter of *S. mutans* in culture medium. (a) Effect of sucrose added to the medium on floc diameter of UA159. (b) Floc diameter of Δ*gtfB* and Δ*gtfBC* strains in sucrose-added medium.

6 well plate 上で TSBs 培地を用いて BF 形成試験 (37 ºC, 24 h, 5 % CO_2)を行い、回収した BF 画分を 1 M NaOH 水溶液に懸濁させグルカンなどの細胞外高分子物質を菌体から遊離させた。エタノール沈殿させた BF 画分に含まれる多糖をフェノール硫酸法により分析した。また、BF 形成試験時の上清に含まれる多糖をエタノールで不溶化し沈殿させ、遊離の可溶性グルカン量として評価した。BF 画分のグルカン量は野生株に比べ、Δ*gtfC* 株で約 52 %、Δ*gtfB* 株で約 28 %、Δ*gtfBC* 株で約 7 %と求まり、Gtfs を欠損させた効果が観測された。これに対しΔ*gtfC* 株における可溶性グルカン画分は、野生株に比べ約 2.8 倍に増加した。野生株において、可溶性グルカンは GtfC 由来の不溶性グルカンと相互作用し付着性となり BF 内に多く存在する。本試験で測定した野生株の BF 画分には、一部の可溶性グルカンも含まれている。相互作用するペアとなる不溶性グルカンを欠損させたことで、溶液中に遊離した可溶性グルカン量が増大したものと推察される。BF 形成量をクリスタルバイオレット染色法で評価すると、スクロース添加培地における BF 形成量は有意に増大した。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

光感受性オキシムの特異な反応性に着目した新規光環化反応の開発

○岡村秀紀[1,2]・飯田百香[1,2]・金山唯[1,2]・永次史[1,2]（[1]東北大多元研、[2]東北院理）

Development of a novel photo-induced cyclization reaction based on the unique reactivity of photo-sensitive oxime structures (Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University [1], Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University [2]) OKAMURA, Hidenori[1,2]; IIDA, Momoka[1,2]; KANEYAMA, Yui[1,2]; NAGATSUGI, Fumi[1,2]

光によって誘起される化学反応は、有用化合物の効率的な合成法だけでなく、材料科学やケミカルバイオロジーなど幅広い分野への応用が期待される。特に、光の高い時空間分解能に着目した分子レベルにおける薬理活性の光制御は、疾患部位を狙い撃ちする高精度かつ副作用の少ない薬物療法への応用が期待される[1]。薬剤の光制御を可能とする化学的アプローチとして、標的分子との相互作用を物理的に妨げる光切断性保護基を薬剤分子と結合させ、光照射で薬理活性を OFF-ON 制御する光ケージド法が活発に研究されてきた[2]。しかし、光切断性保護基を用いる本法では、保護基を導入しても結合活性が完全に消失しない場合があること、また、光保護基を導入できる置換基が限られることといった問題点がある。このような背景のもと、様々な化合物の光制御を可能とするために、生体応用可能な光化学反応のレパートリーを拡張することが強く望まれている。

そこで本研究では、生体適用可能な新たな光化学反応として、薬物分子に多く見られる含窒素芳香環を与える光誘起型環化反応の開発を目指した。当研究室の先行研究にて、光感受性基を付与したオキシム構造に光を照射すると、想定外の N-O 結合切断が進行することを見出している。この特異な反応性に着想を得て、光照射のみでフェナントリジン骨格を与える分子内環化反応を設計した（図 1）。本反応を詳細に検証したところ、含水溶媒系で効率良く反応が進行し、フェナントリジン化合物を与えることを見出した。また、本光反応の基質適用範囲を調べた結果、種々の置換フェナントリジン化合物を良好な収率で与えることを見出した。そこで、本反応が細胞内で進行するかを検証した。環化後に強い蛍光を示す光環化前駆体 A を Hela 細胞とインキュベートし、光照射を行った（図 2）。その後、細胞を蛍光顕微鏡で観察したところ、光照射した場合にのみ、フェナントリジン誘導体 B の生成に由来する蛍光シグナルが確認された。以上の結果より、新たに開発した光誘起型環化反応が、生体適用性を有することを明らかとした。薬物分子に多く含まれる含窒素芳香環を構築する本反応を用いることで、光制御可能な薬物分子の適用範囲を拡張できると期待される。ポスターでは、反応設計と環化反応のメカニズムを中心に詳細を報告する。

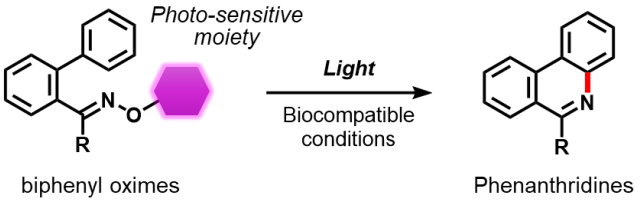


図 1　光誘起型環化反応の設計

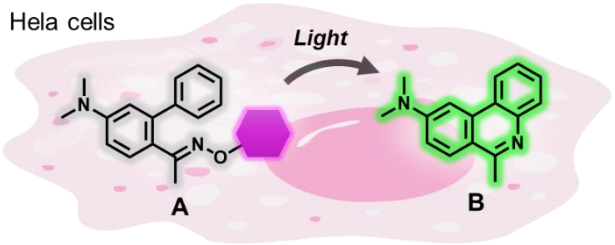


図 2　細胞内における光誘起環化反応の検証

(1) I. M. Welleman, M. W. H. Hoorens, B. L. Feringa, H. H. Boersma, W. Szymański, *Chem. Sci.*, **2020**, *11*, 11672-11691.
(2) G. C. R. Ellis-Davies, *Nat. Methods*., **2007**, *4*, 619-628.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

GSH 応答性 turn-on 型 PAI/PTT 用セラノスティック剤の開発

○菅原嵩弥、野北康平、三木康嗣、大江浩一（京都大院工）

Development of GSH-responsive PAI/PTT Theranostic Agent (Graduate School of Engineering, Kyoto University) Takaya Sugahara, Kohei Nogita, Koji Miki, and Kouichi Ohe

光音響イメージング（PAI）による癌の診断と、光熱療法（PTT）による癌の治療はいずれも低侵襲的な手法として知られており、これらを同時に行うことのできるセラノスティック剤の開発により、がん患者の身体的負担の小さい治療が実現できる。金属フタロシアニン（MPc）は安定性が高く光熱変換効率が高いことから、PAI と PTT 用セラノスティック剤としての応用が期待されているが、π-π スタッキングによる凝集によって水に難溶であることが MPc の生体応用を困難にしている。水溶性 MPc 類の応用例として、水溶性部位が酵素に応答して切断され、凝集することでより強い光音響信号を発する分子が報告されている [1]。しかし、この機構では凝集前の分子が発する光音響信号がバックグラウンドシグナルとなり、コントラスト比が低下する問題があった。したがって、患部でのみ光増感能を発揮する turn-on 型分子の開発により、高コントラストな診断と患部局所的な治療が実現できると考えられるが、そのような MPc 類の例はこれまでにない。

本研究では、肺癌細胞などにおいて過剰発現することが知られている還元性グルタチオン（GSH）に応答する水溶性 NiPc 前駆体として **ox-NiPc-PEG** を合成した。**ox-NiPc-PEG** は、フタロシアニン骨格の π 共役系が切断されているため、NiPc と比較して吸収波長が短波長にシフトしている。そのため、近赤外光を照射しても **ox-NiPc-PEG** は励起されない。今回、我々は **ox-NiPc-PEG** は GSH などの還元剤により二電子還元され、NiPc が生成することを見出した。なお、**ox-NiPc-PEG** の NiPc への還元反応は酸性条件下で促進された（Figure 1a）。**ox-NiPc-PEG** と GSH を作用させた溶液に近赤外光を照射すると、溶液の温度が上昇した（Figure 1b）。また、**ox-NiPc-PEG** に GSH を作用させた溶液の光音響信号強度が増加した（Figure 1c）。さらに、GSH が過剰発現することが知られている肺癌細胞 A549 と通常細胞 HEK293 に **ox-NiPc-PEG** を作用させると、A549 において強い光音響信号が検出された（Figure 1d）。**ox-NiPc-PEG** は GSH が過剰発現する癌細胞において速やかに NiPc に変換されることから、癌組織でのみセラノスティック剤として機能することが予想される（Figure 1e）。

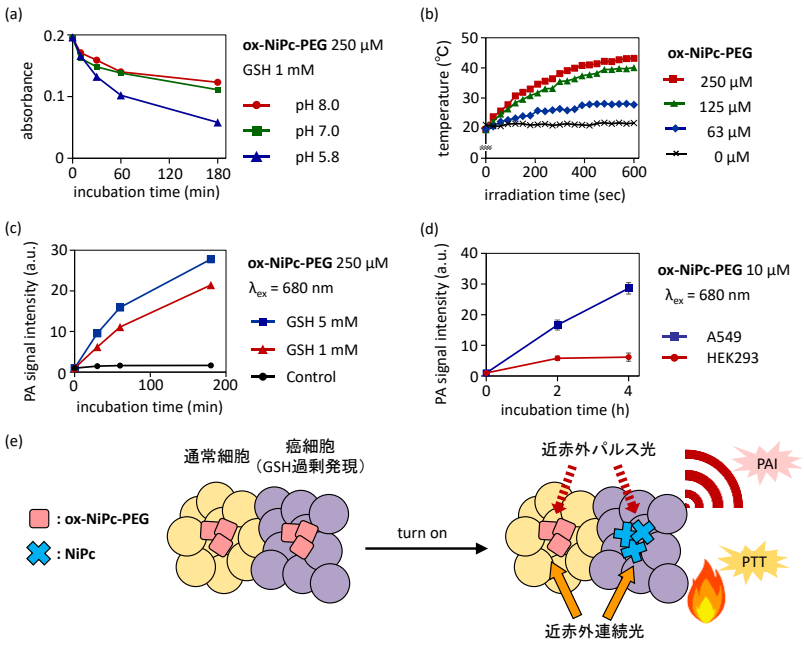


Figure 1. (a) PBS 溶液の pH を変化させた際の **ox-NiPc-PEG** と GSH との反応性. (b) **ox-NiPc-PEG** に GSH を作用させた際の近赤外光照射下における溶液の温度変化. (c) **ox-NiPc-PEG** に GSH を作用させた溶液の光音響信号強度変化. (d) **ox-NiPc-PEG** を細胞に作用させた際の光音響信号強度変化. (e) GSH に応答してセラノスティック剤として機能する **ox-NiPc-PEG** の概念図.

1) Xie, C.; Zhen, X.; Lyu, L.; Pu, K. *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1703693.

人工シデロフォア–鉄錯体修飾基板を利用した微生物探索・分離技術

○杉田 理々香[1]・遠藤 卓[1]・小澤 智宏[1]・増田 秀樹[1,2]・猪股 智彦[1]（[1]名工大院工・[2]愛工大工）

Isolation of Useful Microorganisms Using Artificial Siderophore-iron Complex Modified Substrates

(Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology[1], Faculty of Engineering, Aichi Institute of Technology[2]) SUGITA, Ririka[1]; ENDO, Suguru[1]; OZAWA, Tomohiro[1]; MASUDA, Hideki[1,2]; INOMATA, Tomohiko[1]

地球上には様々な微生物が存在している。微生物の中には抗生物質などの有用物質を産出するものや[1]、代謝の過程でアンモニア[2]やメタン[3]を放出するもの、土中の不要物を窒素に変換するもの[4]など、人類にとって有用な微生物も数多く存在する。しかし、存在が確認されている微生物は地球上の全微生物のごく一部であり、その培養法まで確立されているものは更に少ない。まだ人類にとって未知の微生物を環境中から採集し、単離したうえで最適となる培養法を開発することは、微生物を医学・産業面で有効利用する上で重要な課題である。

これらを達成するため、我々はシデロフォアと呼ばれる物質に着目した。シデロフォアとは微生物が必須金属イオンである鉄イオンを細胞内に取り込むために産出する天然のキレート化合物である。微生物はその生存において鉄イオンを必要としているが、食餌によって鉄イオンを取り込むことができないためシデロフォアを体外に放出する。微生物が産出したシデロフォアは、系中の鉄イオンと結合することで安定な錯体を形成し、微生物の細胞表面に存在するレセプタータンパク質により認識され細胞内へ取り込まれる。我々は天然のシデロフォアと同等の性質・機能を示す、より簡単な構造の人工シデロフォア分子を合成し、その鉄錯体を基板に修飾させることで、微生物の検出が可能な基板を開発してきた[5,6]。

本研究では、この技術を有用微生物の探索・分離に応用した（Fig. 1）。微生物は種によって認識できる人工シデロフォアの構造が異なり、中でも *E.coli* はカテコール型に選択性を示すことが分かっている。作製したカテコール型人工シデロフォア鉄錯体修飾基板を利用し、*E. coli* などの微生物の固定化を試みたところ、基板表面上で目的の微生物の存在が確認できた。また、この微生物固定化基板を寒天培地にスタンプして培養を行ったところ、微生物由来のコロニーが確認された。本技術は、環境中から未知の微生物を分離し、その培養条件を検討する技術に応用可能なツールになると考えられる。

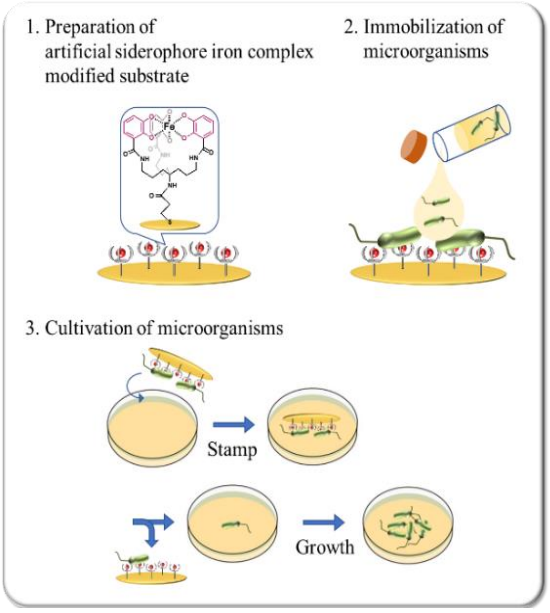


Fig.1 Strategy of this study

1) H. Kang, P. R. Jensen, W. Fenical, *J. Org. Chem*., **61**, 1543–1546 (1996)
2) R. D. Milton, S. D. Minteer, *Acc. Chem. Res*., **52**, 3351 – 3360 (2019)
3) V. Muralidharan, K. D. Rinker, I. S. Hirsh, E. J. Bouwer, R. M. Kelly, *Biotechnol. Bioeng*., **56**, 268-278 (1997)
4) M. J. Smith, M. B. Francis, *ACS Synth. Biol*., **5**, 955–961 (2016).
5) T. Inomata, H. Eguchi, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda, *Langmuir*., **28**, 1611 (2012)
6) T. Inomata, H. Tanabashi, Y. Funahashi, T. Ozawa, H. Masuda, *Dalton Trans.*, **42**, 16043 (2013)

植物の成長を促進する新規機能性分子の開発と標的同定

○四坂勇磨・草野修平・中村咲耶・泉正範・萩原伸也（理化学研究所　環境資源科学研究センター）

Exploring Target Proteins of Novel Plant Growth Promoters (RIKEN Center for Sustainable Resource Science) SHISAKA, Yuma; KUSANO, Shuhei; NAKAMURA, Sakuya; IZUMI, Masanori; HAGIHARA, Shinya

70 億人を突破した世界人口は今後も増加の一途をたどり，2050 年には 97 億人に達すると予想されている．国際連合食糧農業機関（FAO）が発表した推計によると，人口増加に伴う食料需要の増加に応えるためには，食料や飼料等の農業生産量を 2012 年の水準よりも 50%以上向上する必要がある．しかし，世界全体の収穫面積の増加率は過去 50 年でわずか 8%にとどまっており，需要に対して供給が追いついていない現状の食料生産システムの改善が急務である．栽培から収穫までのサイクルの迅速化や生産性の向上によって，単位面積当たりの農作物の収穫量を増やすことができれば，持続可能な農業を実現する食料生産システムの確立に大きく貢献する．そこで，分子で植物機能を人工的に制御することで，植物の成長や着果を促進させる技術の開発に取り組んだ．本発表では，我々が開発した植物の成長を促進する新しい機能性分子について報告する．さらに，機能性分子の作用機序を明らかにするために，標的蛋白質の探索にも取り組んだので併せて発表する．

核移行シグナルを修飾したペプチドを鋳型とするナノサイズのリボン型金結晶の合成と細胞送達

○石田憲稔[1]・今井崇人[1]・山﨑正幸[2]・富﨑欣也[1]（[1]龍谷大院先端理工、[2]龍谷大院農）

Synthesis and Cellular Delivery of Nano-Sized Ribbon-Shaped Gold Crystals Using Nuclear Localization Signal-Tethering Peptide as A Template

([1]Graduate School of Advanced Science and Technology, [2]Graduate School of Food Sciences and Human Nutrition, Ryukoku University) ISHIDA, Kazutoshi[1]; IMAI, Takahito[1]; YAMASAKI, Masayuki[2]; TOMIZAKI, Kin-ya[1]

金ナノロッド特有の近赤外光を熱に変換するフォトサーマル効果は、医療分野における新たな治療方法として期待されている。従来の金ナノロッドの合成法では、細胞毒性をもつ界面活性剤 CTAB を用いる方法が一般的であるが、金ナノロッドを医療分野に応用するためには CTAB の除去等、多段階の合成工程を経る必要がある。そこで当研究室では、CTAB を用いることなく、薬剤送達のキャリアである Cap-p (Ac-AIAKA2NafKIA-NH_2, 2Naf＝L-2-naphthylalanine) の集合体内部に金イオンを取り込み還元することで、リボン状金ナノ結晶の合成に成功している [1]。これらのメカニズムを細胞内で実行するためには、Cap-p のみでは細胞膜透過能が低いことが挙げられることから、Cap-p の N 末端に細胞膜透過能を有する核移行シグナル (NLS) を修飾した NLS-p (Ac-PKKKRKVGGGAIAKA2NafKIA-NH_2) を金ナノ結晶合成の鋳型とすることで、細胞膜透過能の向上に期待した。本研究では、細胞膜透過能を向上させた Cap-p/NLS-p 集合体を鋳型ペプチドとする、リボン状金ナノ結晶の合成評価及び近赤外光照射による光熱変換特性評価を行い、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞への送達を試みた。

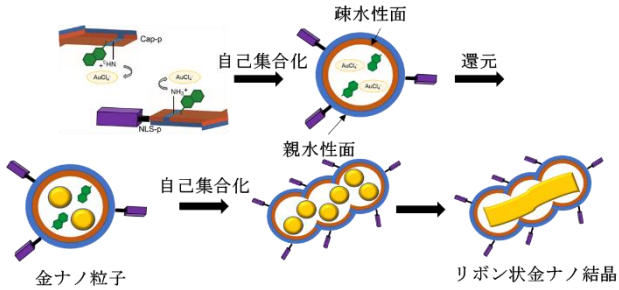


Fig.1 リボン状金ナノ結晶の合成スキーム

金ナノ結晶の吸収スペクトルでは、表面プラズモン共鳴に由来する 520 nm 付近に吸収ピークが確認されたが、Cap-p に対する NLS-p 含有率を大きく上昇させたところ吸収ピークは顕著に減少した。これは、NLS-p は豊富にカチオンをもつ塩基性のペプチドであることから、$AuCl_4^-$がペプチド複合体内に濃縮されにくいためであると考えられる。そこで、NLS-p を 1%含有する金結晶複合体について TEM による形態観察を行ったところ、徐々に金結晶同士が結合し、4 時間後には 500 nm 長のリボン状金ナノ結晶を形成することが確認された (Fig. 2A)。

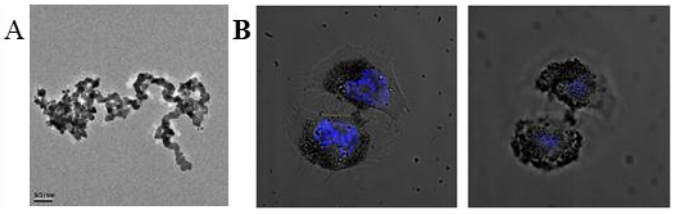


Fig. 2 (A) インキュベーション 4 時間におけるリボン状金ナノ結晶の TEM 画像 (スケールバー = 0.5 μm) (B) HeLa 細胞におけるリボン状金ナノ結晶の付着の様子 (左図) 細胞中面 (右図) 細胞上面

共焦点レーザー顕微鏡による観察を行ったところ、細胞の表面に金結晶が付着することが分かった (Fig. 2B)。このことから、リボン状金ナノ結晶はカチオン性のペプチドが、負電荷をもつ細胞膜への静電相互作用により、送達されたのではないかと考えられる。今後は、近赤外光照射によるリボン状金ナノ結晶の光熱変換特性を検証する。

本研究の一部は、科研費 (基盤 C : 20K05713) の支援により実施された。

1) K.-Y. Tomizaki, et. aL. *Langmuir* **2014**, *30*, 846−856.

細胞内へのホウ素送達を指向したペプチドの合成

○栢下　昂大・富﨑　欣也（龍谷大先端理工）

Synthesis of Cationic Peptides Toward Boron Delivery into Cells (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) KAYASHITA Takahiro; TOMIZAKI Kin-ya

近年、様々なガン治療法が確立されるなかで、ガンの種類に応じた治療法の開発が急務となっている。現在、体表面付近のガンの治療法として、ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) が注目されている。この治療法はホウ素に熱中性子線を照射することによって生じる核分裂反応のエネルギーを利用し、腫瘍細胞を破壊するといったものであり、細胞内にホウ素を効率よく送達する方法が重要となる。

本研究では、生体内へのホウ素の送達剤の開発を目的として、様々な機能を付与できるペプチドとホウ素源である窒化ホウ素 (BN) との複合体の構築を行った。まず、SV40 T 抗原由来の核移行シグナルペプチド (NLS)、膜透過性を持つオクタアルギニン (R8)、HIV-TAT (47-60) 由来の膜透過性ペプチド (TAT) をキャリア形成ペプチドである Cap-p (Ac-AIAKA2NafKIA-NH_2)[1] の N 末端に連結したペプチドを設計した(Fig. 1.)。これらのペプチドを Fmoc 固相合成し、HPLC で精製、MALDI-TOF-MS で同定を行った。

NLS-p：Ac-PKKKRKV-GGG-AIAKA2NafKIA-NH_2
R8-p：RRRRRRRR-GG-AIACA2NafKIA-NH_2
TAT-p：Ac-YGRKKRRQRRRPPQ-GGG-AIAKA2NafKIA-NH_2

Fig. 1. ペプチドの配列

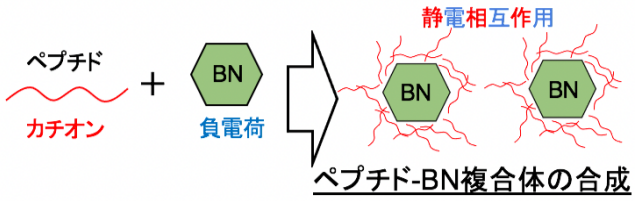


Fig. 2. 複合化のイメージ図

複合体のζ電位測定の結果、ペプチドの濃度依存的に負から正へと表面電荷が変化した(Fig. 2.and 3.)。このことから複合化に成功したと考えられる。R8-p や TAT-p が NLS-p と比較して複合体のカチオン性が高いのは、ペプチド 1 分子あたりの塩基性アミノ酸残基が多いことが要因と考えられる。

今後は、ペプチド-BN 複合体の形態を電子顕微鏡 (TEM) で評価し、細胞毒性および細胞への取り込み量を評価をしていく予定である。

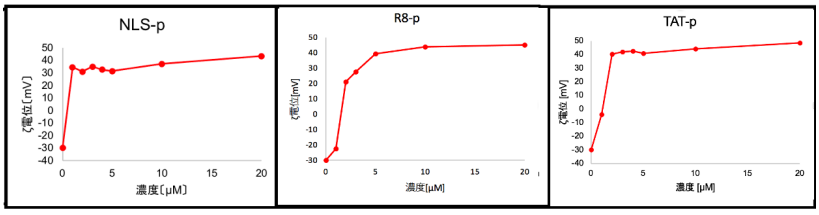


Fig. 3. ペプチド-BN 複合体のζ電位 ([BN] = 0.05wt% / H_20 mL)

1) Tomizaki, K.-Y. et al. *Molecules* **2017**, *22*, 1916

新規 DDS リガンド修飾 siRNA による筋肉・中枢組織での遺伝子発現制御

○多幾山 敬[1]、横田 慎一[1]、澤村 元気[1]、若林 圭作[1] 、中嶋 麻童[1]、黒田 典一[1]、中村 貴史[2]、森野 寛子[2]、藤原 孝博[1]、粕谷 武史[1]、佐々木 康夫[1]、堀 真一郎[1]、釘宮 啓[1]（[1]塩野義製薬株式会社、[2]シオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社）

Efficient Gene Suppression by the Novel Ligand Conjugated siRNA in the Skeletal Muscle and Central Nervous System (Shionogi & Co., Ltd.[1], Shionogi TechnoAdvance Research Co., Ltd.[2]) TAKIYAMA, Kei[1]; YOKOTA, Shinnichi[1]; SAWAMURA, Motoki[1]; WAKABAYASHI, Keisaku[1]; NAKAJIMA, Mado[1]; KURODA, Norikazu[1]; NAKAMURA, Takashi[2]; MORINO, Hiroko Morino[2]; FUJIWARA, Takahiro[1]; KASUYA, Takeshi[1]; HORI, Shin-ichiro[1]; KUGIMIYA, Akira[1]

siRNA は、疾患の原因遺伝子の発現を直接的に抑制可能なモダリティである。そのため、低分子創薬において“Undruggable target”とされているタンパク質であっても、その遺伝子を標的にできる。一方で、siRNA 医薬創出を実現するためには、siRNA を望みの組織へ送達させる DDS 技術開発が課題となる。近年、肝臓を標的とした複数の siRNA 医薬品が上市されている。一方で、肝臓以外の末梢組織については、全身投与によって siRNA を送達させる技術開発は行われているものの、未だ実用化には至っていない。また、中枢組織については、神経難治性疾患治療のために siRNA の局所投与（髄腔内投与）が検討されているが、こちらも未だ実用化には至っていない。

我々は、siRNA を独自の DDS リガンドで修飾することで、末梢組織である筋肉と中枢組織に創薬応用可能な新規 siRNA_DDS 技術を開発した。本 DDS リガンド修飾 siRNA は、マウスのみならず霊長類であるカニクイザルにおいても、全身投与（静脈内投与）によって、骨格筋の標的遺伝子発現を抑制できた。さらに、遺伝子発現抑制活性が 3 か月持続すること、顕著な異常が認められないことも確認した。また、同様のリガンド修飾 siRNA は、カニクイザルへの髄腔内投与によって各中枢組織で標的遺伝子発現を抑制した。以上のように、本 DDS リガンド修飾 siRNA は霊長類で機能することが確認されていることから、神経筋疾患治療等への創薬応用が期待される。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

pre-miR-664a 搭載ラクトソームを用いた光依存的なアポトーシス誘導法の開発

○宮本麻衣[1]・大槻高史[1]・松浦栄次[2, 3]・渡邉和則[1]（[1]岡大院統合科学・[2]中性子医療研究センター、[3]岡大院医歯薬）

Light-dependent induction of apoptosis using pre-miR-664a-loaded lactsomes (Grad. Sch. of Interdiscip. Sci. and Eng. in Health. Sys., Okayama Univ.[1], Nutron Therapy Research Cener, Okayama Univ.[2], Grad. Sch. of Medicine, Dentistry and Pharma. Sci., Okayama Univ.[3]) MIYAMOTO Mai[1]; OHTSUKI Takashi[1]; MATSUURA Eiji[2, 3]; WATANABE Kazunori[1]

miRNA は、核酸医薬品として注目されている 19~25 ヌクレオチドの低分子非翻訳 RNA である。miRNA は mRNA の 3'非翻訳領域に結合することで遺伝子の発現を抑制し、細胞周期の調節、分化、増殖、アポトーシス、ストレス耐性、免疫応答などの様々な生体機能を制御している [1]。そのため、miRNA は疾患治療薬として注目を浴びており、特にアポトーシス誘導する miRNA は癌治療薬として期待されている。これまでにアポトーシスを誘導する miRNA として、miR-664a-5p の前駆体である pre-miR-664a などが報告されている。

miRNA を医薬品と用いるためには miRNA を細胞質内へと輸送する必要がある。そのため、数多くの RNA 輸送法が開発されている。我々はこれまでに、光と光増感剤を結合させた RNA キャリアを用いることで光照射した細胞のみに RNA を輸送することができる Photoinduced cytosolic Dispersion of RNA（PCDR）を開発した。また、PCDR と pre-miR-664a を組み合わせることで、光照射部位特異的にアポトーシスを誘導できることを報告した [2]。しかし、PCDR は RNA キャリアとしてタンパク質を用いているため、生体内で分解されるという問題がある。

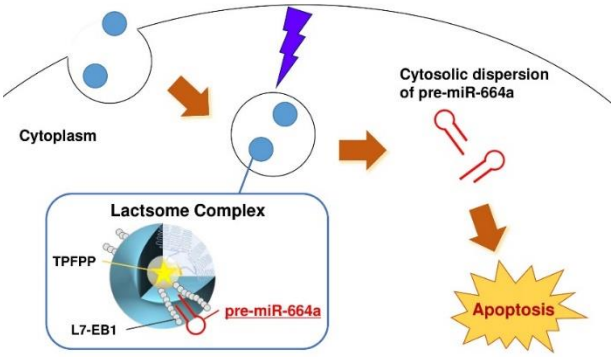


Fig.1 Structure of the lactsome complex and induction of apoptosis by pre-miR-664a mediated by the lactsome complex.

この問題を解決するために、本研究では RNA キャリアとしてラクトソームに着目した。ラクトソームは Enhanced permeability and retention 効果により細胞内に集積する性質を持つ生分解性高分子ミセルである。我々はこれまでに、ラクトソームに細胞への取り込みを促進する細胞膜透過性ペプチド（CPP）と光増感剤を担持させたラクトソーム複合体は siRNA を細胞内に送達し、RNA 干渉を誘導できることを報告した [3]。

本研究では、in vivo での光依存的なアポトーシス誘導法を開発するために、pre-miR-664a、CPP として L7-EB1、光増感剤として TPFPP を担持したラクトソーム複合体の開発を試みる（Fig. 1）。

まず、pre-miR-664a、L7-EB1、TPFPP を担持したラクトソームを用いて依存的なアポトーシス誘導を試みた。その結果、pre-miR-664a を担持したラクトソームで処理した細胞において、光照射をしない細胞ではアポトーシスが誘導されないが、光照射した細胞ではアポトーシスが誘導された。また、非標的 pre-miRNA を担持したラクトソーム複合体では光照射した細胞でもアポトーシスが誘導されなかった。このことから pre-miR-664a を担持したラクトソーム複合体は光依存的にアポトーシスを誘導できることが明らかになった。現在、pre-miR-664a 担持ラクトソーム複合体の粒径やゼータ電位などの特性について検証を行っているため、本学会にてこれらについても報告する。

1) K. Watanabe, R. Yamaji, T, Ohtsuki., 2018, Genes of Cells., 23(3), 225-233.
2) K. Watanabe, T. Nawachi, R. Okutani, T, Ohtsuki., 2021, Sci. Rep., 14936.
3) Melissa Siaw Han Lim, Yuki Nishiyama, Takashi Ohtsuki, et al., 2021, J. Pharm. Sci., 110(4), 1788-1798

イミノボロネート修飾デンドリマーを利用した pDNA デリバリー

○松本彬[1]・南豪[1]（[1]東大生研）

pDNA delivery by an iminoboronate-functionalized dendrimer (Institute of industrial science, The University of Tokyo[1]) Akira Matsumoto[1]; Tsuyoshi Minami[1]

核酸医薬品を体内の標的部位に送達する遺伝子デリバリーにおいて、非ウイルス性ベクターは、発がん性及び免疫原性が低いことから、精力的に研究されている。代表的な非ウイルス性ベクターであるポリアミドアミンデンドリマー (PAMAM) は、末端に化学修飾を加えることで、物性の改変や標的指向化が可能である [1)]。特定の細胞は糖類を認識する受容体 [2)]及びトランスポーターを有することから、PAMAM に糖類を修飾することで遺伝子発現効率の向上が期待される。イミノボロネートは各種糖類と可逆的に結合することから、イミノボロネート修飾したデンドリマー (PAMAM-IB) は、動的共有結合を介して、糖類を容易に修飾することが可能である。さらに、エンドソーム内酸性環境下でイミノボロネートが分解することによる効果的な核酸放出が実現され得る。

上記項目を鑑みて、自己組織化を活用して PAMAM-IB を合成した **(Fig. 1a)**。PAMAM-IB のプラスミド DNA (pDNA) との複合化能を動的光散乱法 (DLS)、電気泳動光散乱法 (ELS) 及びゲルシフトアッセイにより評価した。その結果、PAMAM-IB は (PAMAM-IB 末端基) / (pDNA リン酸基) =T/P =16 以上で核酸と安定的に複合化し、粒径は約 200 nm 程度であることが分かった **(Fig. 1b, 1c)**。これは細胞内取り込みが期待される大きさである。また、PAMAM-IB の動的共有結合による糖類との複合化をジオール色素との競合的な置換に基づく試験法 [3)] (Indicator displacement assay) により評価した結果、ボロネートエステル形成により各種糖類と複合化することが判明した。肝実質細胞は、フルクトースを認識するトランスポーター (GLUT2) を有するため、この結果から、フルクトース修飾 PAMAM-IB の肝細胞への効果的なデリバリーが期待される。以上の結果を踏まえ、フルクトース修飾 PAMAM-IB の核酸送達能を評価した。蛍光標識した pDNA、PAMAM-IB、及びフルクトースを混合し、Hep G2 細胞に投与した後にフローサイトメトリーで測定した。その結果、PAMAM-IB に結合したフルクトースの影響によるものと考えられる取り込み効率の増加が確認された **(Fig. 1d)**。現在、詳細な細胞内動態を調査中である。

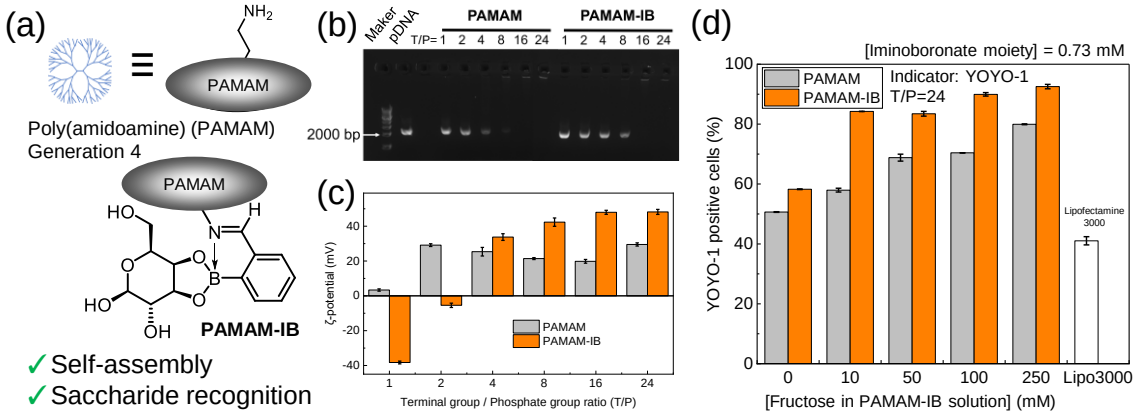


Fig. 1 (a) Schematic illustration of PAMAM-IB. (b) The results of gel shift assay. (c) ζ-Potentials of the complexes of pDNA and PAMAM derivatives. (d) Cellular uptake of the labeled pDNA by PAMAM-IB at various fructose concentrations. YOYO-1/base pair (bp) of pDNA = 1/60, pDNA: 100 ng/well, incubation time: 6 h.

1) V. Yellepeddi *et al*., *Expert Opin. Drug Deliv*. **2009**, 6, 835., 2) A. D'Souza *et al*., *J. Control. Release*, **2015**, 203, 126., 3) T. Minami *et al*., *Chem. Lett*. **2021**, 50, 987. (Highlight Review)

チタン結合部位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による金属チタン表面修飾

○田中駿・青井芳史・富﨑欣也（龍谷大院先端理工）

Modification of Titanium Surface with Collagen Model Peptides Containing both Titanium Binding and Cell Recognition Sites (Graduate School of Advanced Science and Technology, Ryukoku University) TANAKA, Shun; AOI, Yoshifumi; TOMIZAKI, Kin-ya

近年の世界的な高齢化にともなうインプラント需要の増加により、高性能なインプラント材料の開発が求められている。チタンは耐腐食性および生体適合性が高いことから、インプラントの材料として注目され、すでに実用化されている。しかし、チタン表面への初期細胞接着量が少ないことによる細菌感染のリスクが課題として挙げられる。その対応策として、チタン表面の化学エッチングや高分子・骨形成タンパク質などによる表面修飾により、初期細胞接着量を増大させるなど種々取り組まれているが、完全な問題解決には至っていない。例えば、天然コラーゲンの採用に当たり、機能制御が困難なこと、人獣共通感染症のリスクや変性温度の低さが挙げられるなど課題は多い。しかし、化学合成されたコラーゲンモデルペプチド (CMP) を用いることでこれらの課題を改善できるのではないかと考える。そこで本研究では、チタンと特異的に結合するチタン表面認識配列であるヒスチジン、リシン、ヒスチジン (HKH) [1] と、細胞表面のインテグリンと特異的に結合する細胞接着配列であるグリシン、フェニルアラニン、ヒドロキシプロリン、グリシン、グルタミン酸、アルギニン (GFOGER) [2]の二種の配列を典型的なコラーゲン配列に取り込んだ CMP-8 を設計・合成し、チタン表面の CMP による修飾を目指した (Fig.1)。

CMP-8 : Ac-His-Lys-His-Ape(5)-$(Gly-Pro-Hyp)_4$-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-$(Gly-Pro-Hyp)_4$-Gly-NH_2

Fig. 1. CMP-8 のアミノ酸配列

まず、液相合成法によりジペプチド (Fmoc-Gly-Pro-OH) を合成し、次いで、固相合成法によりトリペプチド (Fmoc-Gly-Pro-Hyp(tBu) -OH) を合成した。得られたトリペプチドをビルディングブロックとして固相合成法により CMP-8 を合成し、逆相 HPLC により精製、MALDI-TOF-MS にて同定した。得られたペプチドを 20 mM リン酸緩衝液 (pH＝7.5) に 200 μM の濃度で溶かし、4 ℃で 24 時間集合化させ、CD スペクトル測定により二次構造を評価した。さらに波長を 225 nm に固定し、水溶液温度を 0.5 K / min で変化させ、CMP-8 のトリプルヘリックス構造の熱変性温度の測定を行った。その後、水溶液をチタン薄膜上に添加した。24 時間後、基板を回収し AFM と XPS 測定を行った (Fig.2)。

AFM の結果から、CMP-8 を加えることで大幅な平均表面粗さの上昇が確認された。XPS の結果から、リン酸緩衝液のみと比較して基板最表面の窒素が増加し、チタンが減少していることが確認された。以上の結果から、CMP-8 によるチタンの表面修飾に成功したと考えられる。

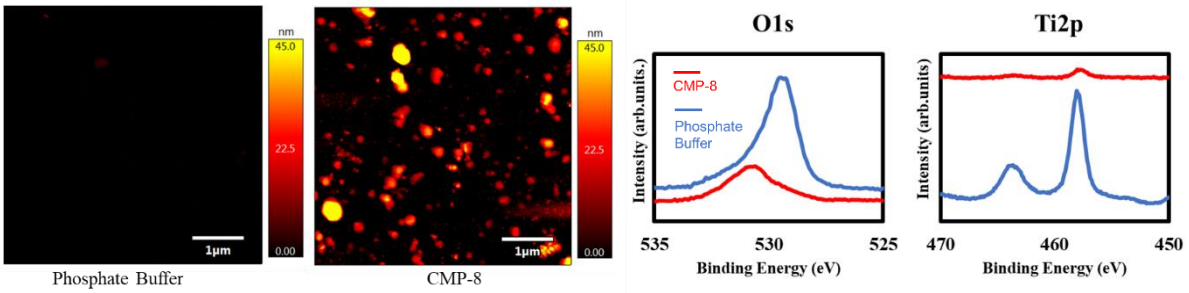


Fig. 2. 表面修飾後の AFM および XPS

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

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

カルボキシ基を有するコラーゲンモデルペプチドの構造安定性とカルシウムイオン応答性

○竹村直記・富﨑欣也（龍谷大先端理工）

Structural stability and calcium ion responsibility of a collagen model peptide with a carboxy group

(Graduate School of Advanced Science and Technology) TAKEMURA, Naoki; TOMIZAKI, Kin-ya

近年、ヒドロキシアパタイト（HA）を人工骨の材料として利用する試みが推進されている。しかし、HA は無機物故に硬くて脆い。さらに、HA 移植後自家骨置換に長時間を要することが知られている。そこで、コラーゲンなどの有機物と HA を複合化させることにより自家骨置換の期間短縮を図る方法が注目されている[1]。しかし、天然のコラーゲン利用では一般的に機能制御が困難であることなど解決すべき課題は多い。そこで、当研究室では、化学合成されたコラーゲンモデルペプチド（CMP）を用いることで天然コラーゲンの問題点を改善する方法に注目している。本研究では、カルシウムイオンに応答して集合体を形成し、HA 形成を促進することを期待して配列の中央部にアスパラギン酸を配置したコラーゲン分子（Fig.1, CMP-6）の獲得及びカルシウムイオンによる影響を考察するためカルボキシ基をもたない対照ペプチド（Fig.1, CMP-7）の合成も行った。そして、新規ペプチドの二次構造評価、カルシウム応答性の評価を行った。

CMP-6 : Ac-$(GPO)_5$-GPD-$(GPO)_4$-G-NH_2
CMP-7 : Ac-$(GPO)_{10}$-G-NH_2　　O = hydroxyproline

Fig.1. コラーゲンモデルペプチドのアミノ酸配列

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(^{t}Bu)-OH) を合成した。得られたトリペプチドをビルディングブロックとして固相合成法により CMP-6 及び CMP-7 を合成し、逆相 HPLC 及び MALDI-TOF-MS で目的ペプチドを精製・同定した。また、二次構造、熱変性温度及びカルシウムイオン応答性を評価するため CD スペクトル測定を行った。

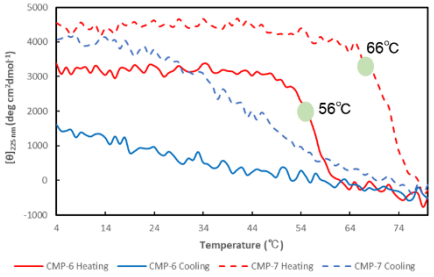


Fig.2. CMP の熱変性温度測定結果

CD スペクトル測定の結果、熱変性温度は CMP-6 では 56℃であり、CMP-7 では 66℃であった(Fig.2) 。これにより、カルボキシ基の存在により CMP のトリプルヘリックス構造の安定性が若干損なわれることが分かった。また CMP-7 は冷却時のスペクトル変化より、トリプルヘリックスへの巻き戻り速度が CMP-6 よりも速いことが分かった。さらに、カルシウムイオン存在下において CMP-6 はトリプルヘリックスの特異的ピークである 200 nm における残基楕円率において有意な変化があった。対照ペプチドである CMP-7 では残基楕円率に変化が小さかったことから、カルシウムイオンの存在はカルボキシ基に作用し CMP の構造を若干変化させることが分かった(Fig.3)。今後は、カルシウム応答性によるリン酸カルシウムの形成能力を評価したいと考えている。

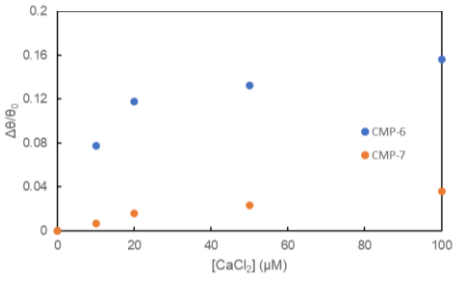


Fig.3. CMP のカルシウムイオン応答性評価

[1] Murphy M. B. et. al. Biomacromolecules **2007,** 8, 2237-2243

Poster Session

Mon. Sep 12, 2022 2:10 PM - 3:10 PM JST | Mon. Sep 12, 2022 5:10 AM - 6:10 AM UTC | Online Site B Online Streaming

Poster Session (P135-P168)

[P135] Synthesis of tandem homodimers that inhibit structural transition of their monomer peptide

*Naoki Takemura[1], Tomomi Iori[1], Hideyasu Fukushima[1], Yasuhiro Nakabayashi[1], Yoshiki Matsumoto[1], Masayuki Yamasaki[2], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Department of Materials Chemistry, Ryukoku University, 2. Food Science and Human Nutrition, Ryukoku University)

[P136] Development of peptide carriers suitable for intracellular delivery

*Rika Fujisawa[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Ryukoku university graduate school)

[P137] Secondary structure of Peptides Conjugated with a Mitochondria Localization Signal Sequence

*Katsuya Kishine[1] (1. Department of Material Chemistry, Ryukoku University)

[P138] Synthesis of Aromatic Compounds with Selective Gold Recovery Mechanism

*Ryo Okuda[1], Takahito Imai[1], Masahiro Asano[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Advanced Science and Technology)

[P139] Surface modification of gold nanorods with mitochondria – targeting peptide.

*Shoya Nakamura[1], Takahito Imai[1], Masayuki Yamasaki[1], Kin-ya Tomizaki[1] (1. Ryukoku University)

[P140] Chemical synthesis and functional evaluation of monobody by one-pot peptide ligation reaction

*Eichi Ozawa[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P141] Directed evolution to produce an improved chemigenetic Photoactive Yellow Protein (PYP)-based Ca^{2+} biosensor

*Takuya Terai[1], Marcio Marinho[1], Hayato Kadoya[1], Saaya Hario[1], Yusuke Nasu[1], Robert E. Campbell[1,2] (1. Department of Chemistry, The University of Tokyo, 2. Department of Chemistry, The University of Alberta)

[P142] Chemical Oxidation and Photo-oxidation of Bacteriochlorophyll *a* in LH2 Protein from the Purple Photosynthetic Bacterium *Thermochromatium tepidum*

*Haruna Hirao[1], Yukihiro Kimura[2], Zheng-Yu Wang-Otomo[3], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Agriculture, Kobe University, 3. Faculty of Science, Ibaraki University)

[P143] Effects of oxidation of B800 bacteriochlorophyll *a* in the LH3 protein of the purple photosynthetic bacterium on excitation energy transfer

*Kohei Hamanishi[1], Yusuke Takashima[1], Tetsuya Yamamoto[2], Kazuki Hinago[2], Yutaka Nagasawa[2], Yoshitaka Saga[1] (1. Graduate School of Science and Engineering, Kindai University, 2. Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University)

[P144] Mirror Image Selection for Anti-MCP-1 Artificial Antibody

*Sayaka Miura[1], Taishi Kondo[1], Yusuke Usui[2], Shinya Ooishi[3], Tomoshige Fujino[1], Gosuke Hayashi[1], Hiroshi Murakami[1,4] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 3. Kyoto Pharmaceutical University, 4. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society)

[P145] Development of a fluorescent probe for visualizing phase-separated cellular bodies in DNA repair processes

*Airi Watanabe[1], Risako Fukata[1], Yuki Tashiro[1], Hidenori Kaneoka[1], Shigeki Kiyonaka[1] (1. Graduate School of Engineering)

[P146] Structural analysis of pH-responsive piston protein assembly

*Koki DATE[1], Thuc Toan PHAM[1], Takayuki UCHIHASHI[2], Hironari KAMIKUBO[3], Chihong SONG[4], Kazuyoshi MURATA[4], Takafumi UENO[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Graduate School of Science, Nagoya University, 3. School of Science and Technology, NAIST, MS, 4. ExCELLS/NIPS)

[P147] Observation of protein structure network involved in modulation of cytokine activity of macrophage migration inhibitory factor by neutron crystallography

*Toshinori Ezawa[1], Yumi Kariya[2], Yu Hirano[3], Katsuhiro Kusaka[4], Taro Tamada[3], Hideki Wakui[1], Masafumi Odaka[1], Hirotoshi Matsumura[1] (1. Graduate School of Engineering Science, Akita University, 2. Cooperative Research Center, Akita University, 3. Institute for Quantum Life Science, National Institutes for Quantum Science and Technology, 4. Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University)

[P148] Shell-type microdroplets containing proteins generated within aqueous two-phase systems

*Yumeno Hayashi[1], Yusuke Fujise[1], Yuki Suzuki[1], Kanta Tsumoto[1] (1. Division of Chemistry for Materials, Graduate School of Engineering, Mie University)

[P149] Covalent inhibitors for drug-resistant BTK mutant using novel electrophilic warhead

*Masaharu Kawano[1], Tomonori Tamura[1], Shunsuke Murakawa[1], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. ERATO JST)

[P150] Development of the Detection for the Interaction between Lectins and Saccharides using Fluorescent Magnetic Nanoparticles

*Yoshio Suzuki[1] (1. AIST)

[P151] Structure activity relationship of new NASA derivative warhead for *in vivo* application

*Shunsuke Murakawa[1], Masaharu Kawano[1], Tomonori Tamura[1], Itaru Hamachi[1,2] (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University, 2. JST ERATO)

[P152] Full-length structure analysis of Cry1Aa from Bt bacteria for designing in-cell protein crystal template.

*Junko Tanaka[1], Satoshi Abe[1], Tohru Hayakawa[2], Takafumi Ueno[1] (1. Life-Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama University)

[P153] Fluorescent detection of peroxisomal fatty acid degradation activity in cultured cells using a chemical probe

*Yuya Matsuo[1], Shohei Uchinomiya[1], Tomoki Nagaura[1], Akio Ojida[1] (1. Pharmaceutical sciense, Kyushu University)

[P154] Rapid Photoaffinity Labeling of Receptor Proteins on Cell Surface and Its Application of Interactome Analysis

*Haruka Suetsugu[1], Takuya Imamura[1], Naoki Zenmyo[1], Kaori Tabata[1], Shohei Uchinomiya[1], Akio Ojida[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical sciences, Kyushu University)

[P155] Catalytic photochirogenesis mediated by serum albumins: Mechanistic studies on enantiodifferentiating hetero-photocyclodimerization of anthracene derivatives

*Masaki Nishijima[1], Misaki Kawai[1], Sota Toyooka[1], Yuya Fujishiro[1], Yasuyuki Araki[1], Tadashi Mori[2], Yoshihisa Inoue[2], Takehiko Wada[1] (1. IMRAM, Tohoku University, 2. Osaka University)

[P156] Research on enzyme activity of Peroxidase on clay nanosheets

*Katsuya Sato[1], Yuta Oiwake[1], Kyosuke Arakawa[1], Tetsuya Shimada[1], Tamao Ishida[1,2], Shinsuke Takagi[1,2] (1. Graduate School of Urban Environmental Sciences, Tokyo Metropolitan University, 2. ReHES of Tokyo Metropolitan University)

[P157] DNA-modified FRET-based cathepsin probes for simultaneous detection of cathepsin B and D activities

*Yuya Shibano[1], Zhengxiao Zhang[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of advanced energy, Kyoto University)

[P158] Discovery of a 14-3-3 Inhibitor and Chemical Regulation of Stomatal Movement

*Kotaro Nishiyama[1], Yusuke Aihara[2], Sakuya Nakamura[1], Takehiro Suzuki[1], Koji Takahashi[2,3], Toshinori Kinoshita[2,3], Naoshi Dohmae[1], Ayato Sato[3], Shinya Hagihara[1,3] (1. RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 2. Graduate School of Science, Nagoya University, 3. WPI-ITbM, Nagoya University)

[P159] Highly Sensitive Detection and Identification of SARS-CoV-2 Variants by A Novel Quantitative PCR Completely Discriminating Single Point Mutation of *KRAS*

*Masayuki Fujii[1], Ryosuke Fujita[1], Mai Ohishi[1] (1. Kindai University)

[P160] Membrane permeable oligonucleotide (MPON) modified with disulfide units induces efficient exon skipping through enhanced membrane permeability and nucleus transfer

*Haruka Hiraoka[1], Zhaoma Shu[1], Bao Tri Le[2], Keiko Masuda[3], Kosuke Nakamoto[1], Kotaro Hayashi[4], Naoko Abe[1], Yasuaki Kimura[1], Rakesh N. Veedu[2], Yoshihiro Shimizu[3], Satoshi Uchida[5], Hiroshi Abe[1,3,6] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Murdoch University, 3. RIKEN, 4. Innovation Center of NanoMedicine, 5. Graduate School of Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine, 6. iGCORE)

[P161] Development of a coupled *in vitro* transcription/translation system for highly efficient eukaryotic gene expression in supergiant artificial cells

*Hajime TAKAHASHI[1], Atsushi OGAWA[1] (1. Proteo-Science Center, Ehime University)

[P162] Development of ribosomal RNA imaging probe based on cationic oligo peptides

*Michiyuki Suzuki[1], Yusuke Sato[1], Nao Togashi[1], Seiichi Nishizawa[1] (1. Graduate school of science, Tohoku university)

[P163] Photo-Labeling of Nucleic Acid by Photo-Catalyst Tethered DNA Probe

*Yuuhei Yamano[1], Kazumitsu Onizuka[1,2], Madoka Sasaki[2], Shinichi Sato[3], Fumi Nagatsugi[1,2] (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Graduate School of Science, Tohoku University, 3. Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University)

[P164] Validity evaluation of nearest-neighbor model in stem region of RNA pseudoknots

*Tamaki Endoh[1], Sagar Satpathi[1], Naoki Sugimoto[1] (1. Konan University)

[P165] Effect of guanine quadruplex and its regulation in replication reaction of RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2

*Shuntaro Takahashi[1], Saki Matsumoto[1], Hisae Tateishi-Karimata[1], Byeang Hyean Kim[2], Naoki Sugimoto[1,3] (1. FIBER, Konan University, 2. POSTECH, 3. FIRST, Konan University)

[P166] Development of lumazine derivative-cyanine dye conjugates for detection of thymine glycol containing DNA duplex.

*Yoshihide Takaku[1], Yusuke Sato[1], Ken Akamatsu[2], Seiiti Nishizawa[1] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. National Institutes for Quantum Science and Technology)

[P167] Development of long dsDNA penetration method using oligodeoxynucleotide containing ultrafast photo-cross-linking nucleoside for genome manipulation.

*Ami Shimabara[1], Yasuha Watanabe[1], Siddhant Sethi[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. Bioscience, Biotechnology, and Biomedical Engineering Research Area , Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P168] Development of novel artificial nucleic acids specifically recognizing and sequencing the oxidatively damaged base 2-oxoadenine in DNA

*Ryo Miyahara[1], Yosuke Taniguchi[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University)

タンデム二量化ペプチドによるモノマー分子の線維化阻害におけるリンカー依存性

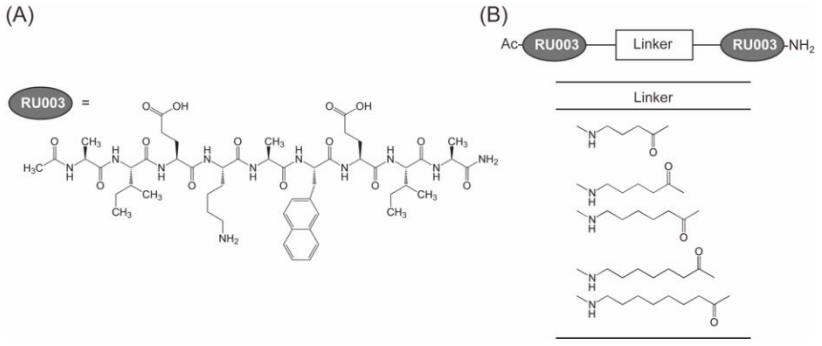
○竹村直記[1]・庵友美[1]・福島秀康[1]・中林靖博[1]・松本祥輝[1]・山﨑正幸[2]・富﨑欣也[1]（[1]龍谷大先端理工、[2]龍谷大農）

Synthesis of tandem homodimers that inhibit structural transition of their monomer peptide (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University[1], Food Science and Human Nutrition, Ryukoku University[2]) TAKEMURA Naoki[1]; IORI, Tomomi[1]; FUKUSHIMA, Hideyasu[1]; NAKABAYASHI, Yasuhiro[1]; MATSUMOTO, Yoshiki[1]; YAMASAKI, Masayuki[2], TOMIZAKI, Kin-ya[1]

神経変性疾患の 1 つであるアルツハイマー病は、患者の脳内が著しく萎縮することによって記憶や認知などに障害をもたらすものとされる。発病過程には、脳細胞中に存在するアミロイド前駆体タンパク質 がβおよびγセクレターゼによって切断されることで生じるアミロイドβ（Aβ）が凝集し、神経細胞死を招き、アルツハイマー病を発病すると考えられている。そのため、治療には Aβ の凝集阻害剤が検討されている。これまでに報告された凝集阻害剤の分子設計は、Aβ の部分配列を基にアミノ酸を置換したものや水素結合ネットワーク切断のために *N*-メチル化されたものが多く、シンプルな設計原理に基づく繊維化阻害剤の分子設計が望まれる。

当研究室では RU003（Fig. 1）が自己集合化することで、アミロイド様線維形態をとることが確認されており、RU003 を Aβ モデルペプチドとして RU003 配列を N 末端から C 末端方向へリンカーを介して単純に 2 回繰り返したタンデム二量体をモノマーペプチドの線維化阻害剤として用いることを検討している。本研究では、タンデム二量体のリンカー長がペプチド線維形成に及ぼす影響について検討した。

今回の実験では、Aβ モデルペプチドとして RU003、阻害剤として RU003 を 4-アミノブタン酸（4Abu）、5-アミノペンタン酸（5Ape）、6-アミノヘキサン酸（6Ahx）7、-アミノヘプタン酸（7Ahp）および 8-アミノオクタン酸（8Aoc）をリンカーとし、それぞれタンデム二量化した 6 種類のペプチドを用いた（Fig. 1）。RU003 の濃度を 100 μM に固定し、線維化阻害剤の濃度を 0、5.0、10、20 μM と変化させた水溶液をそれぞれ 5 日間自己集合化させ、CD スペクトルにより二次構造評価した。



(Fig. 1.) (A) Amino acid sequence of RU003, (B) Design of tandem homodimers with different linkers.

CD スペクトルによる二次構造評価より、RU003 は反応開始後 2 日目までにランダム構造からβシート構造へと二次構造転移した。最もβシート構造への転移遅延効果が高かったのは 5Ape をリンカートするペプチドであり、5 日目においても半分程度ランダム性を維持していた[1]。反対に、βシート構造への転移遅延効果が最も弱かったのは 8Aoc をリンカートするペプチドであり、ほとんど効果は得られなかった。以上より、タンデム二量化におけるリンカーとしては 5Ape が最適であり、βシート性ペプチドのタンデム二量化は、モノマーペプチドの線維化阻害剤設計において新たな可能性を示した。

本研究は、龍谷大学科学技術共同研究センタープロジェクト 2022 の支援を受けて実施されたものである。

[1] Tomizaki, K.-Y.; Iori, T.; Fukushima, H.; Nakabayashi, Y.; Matsumoto, M.; Imai, T. *Processes* **2020**, *8*, 1421.

細胞への物質送達のためのペプチドキャリアの開発

○藤澤梨花[1]・富﨑欣也[1]・山﨑正幸[2]（[1]龍谷大先端理工、[2]龍谷大農）

Development of peptide carriers suitable for intracellular delivery (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University[1], Department of Food Science and Human Nutrition, Ryukoku University [2]) FUJISAWA, Rika[1]; YAMASAKI, Masayuki[2]; TOMIZAKI, Kin-ya[1]

現在、薬物の効能をより安全に効率的に発揮させるために薬物投与過程の制御を可能にするドラッグデリバリーシステム (DDS) が関心を集めている。特に、遺伝子治療ではガン細胞等が有する異常な遺伝子の欠陥を修復・修正することや、アポトーシスを誘導する治療法として期待されている。しかし、核酸分子は細胞膜と電荷反発により核酸分子単体では細胞内への送達が困難である。本研究では、ペプチドの自己集合化能に着目し、非ウイルス性ベクターであるペプチド集合体を核酸キャリアとし、生体適合性の高いペプチドと二本鎖DNA (dsDNA) の複合体の形成と核酸の細胞内送達の評価を行った。

核酸キャリアとして、ディスク型集合体を形成するペプチド（Cap-p）を用いた（Fig. 1）。また、細胞核移行性を有する核移行シグナルペプチド (NLS-p)、膜透過性を有するオクタアルギニンペプチド (R8-p)、HIV-1 由来の TAT 配列を有する細胞膜透過性 TAT ペプチド(TAT-p) をそれぞれ Cap-p の N 末端に連結したペプチドを設計し、固相合成法により合成した（Fig. 1）。核酸の細胞内送達活性評価のために、ペプチド濃度 5-100 μM のキャリアペプチドに二本鎖 DNA（dsDNA）7 nM を加え、25℃で 20 分間インキュベートし、ペプチド/dsDNA 複合体を合成した。DLS 測定および Zeta 電位測定により、複合体形成を確認したところ、ペプチド濃度が 75 μM の時、異なる 3 つのシグナルペプチド NLS-p、R8-p、TAT-p の複合体の表面電荷は中性からやや正の値を示し、600 nm 程度の径の粒子を形成していることがわかった。また、TEM 観察により、ペプチド/dsDNA 複合体は帯状集合体を形成していた。次に、ペプチド濃度が 75 μM で FITC 修飾された dsDNA 濃度 7 nM で調製したペプチド/FITC-dsDNA 複合体をそれぞれ HeLa 細胞に添加し、Hoechst33342 で核を染色、共焦点レーザー走査顕微鏡によってペプチド/FITC-dsDNA の細胞内局在を評価した。Cap-p の複合体ではわずかに細胞質に送達したものの、ほとんどは細胞膜表面に分配された。一方、NLS-p の複合体では細胞質に、R8-p の複合体では細胞膜表面に、TAT-p の複合体では細胞質および細胞膜表面の両方に FITC-dsDNA 分子が送達されることがわかった (Fig. 2)。しかし、R8-p および TAT-p の複合体は細胞膜を大きく乱しており、細胞毒性が高いのではないかと考えられ、3 つのシグナルペプチドのうち NLS-p が遺伝子導入において生体適合性に優れた核酸キャリアであると考えられる。今後の展望として、細胞毒性評価を行い、ペプチドを用いる遺伝子導入への応用に取り組む。

Cap-p：Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH_2
NLS-p：Ac-P-K-K-K-R-K-V-G-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH_2
R8-p：NH_2-R-R-R-R-R-R-R-R-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH_2
TAT-p：Ac-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R-P-P-Q-G-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH_2

Fig. 1. キャリアペプチドのアミノ酸配列

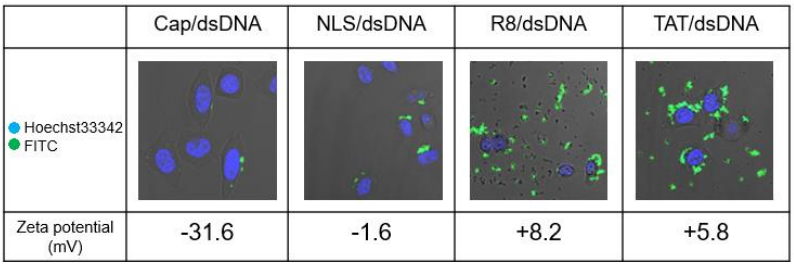


Fig. 2. 共焦点レーザー顕微鏡による HeLa 細胞でのペプチド/FITC-dsDNA 局在評価、インキュベーション 4 h, 37℃, 5% CO_2, ペプチド濃度 ＝ 75 μM, dsDNA = 7 nM

ミトコンドリア移行シグナル誘導体ペプチドの二次構造評価

○岸根克弥、富﨑欣也（龍谷大先端理工）

Secondary structure of Peptides Conjugated with a Mitochondria Localization Signal Sequence

(Department of Materials Chemistry, Ryukoku University) ○KISHINE, Katsuya; TOMIZAKI, Kin-ya;

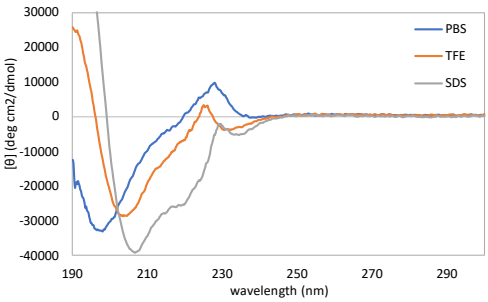
ミトコンドリアは ATP 産生やアポトーシスに関与する細胞小器官である。近年では、ミトコンドリアを標的化したドラッグデリバリーシステムの開発が盛んに行われている。先行研究では、薬物キャリアペプチド (Cap-p) の N 末端にミトコンドリア移行シグナル (MTS) を結合した新規キャリアペプチド (MTS-p) と Cap-p の濃度割合を変化させたところ、ガン細胞への優先的毒性が確認された。この原因として、ガン細胞に多く発現し、側鎖の大きいアミノ酸を選択的に取り込む膜タンパク質 (LAT1) の作用にあるのではないかと考えた。本研究では、LAT1 仮説の検証のため、MTS 結合ペプチドのアミノ酸配列に着目し、Cap-p 部分の側鎖大きなアミノ酸を側鎖の小さなアミノ酸に変更または Cap-p 部分を欠損したペプチドを設計、合成し、それらの二次構造について評価した。薬物キャリアペプチドとして Cap-p を用い、MTS-p の Cap-p 部分に含まれる大きい側鎖を有するアミノ酸であるイソロイシン (I) を全て小さい側鎖を有するアラニン (A) に変更した MTS-pA と Cap-p 部分のアミノ酸配列をナフチルアラニン (Naf) のみにした MTS-Naf を新規設計、合成した (Fig. 1)。ペプチド濃度を 100 μM とし、PBS 緩衝液 (pH7.4)、トリフルオロエタノール (TFE) 及び 20 mM SDS 含有 PBS 緩衝液の 3 種類の溶媒を用いて、CD スペクトルによる二次構造評価を行った。

Cap-p Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH_2 (2Naf = L-2-naphtylalanine)
MTS-p Ac-M-L-R-A-A-L-S-T-A-R-R-G-P-R-L-S-R-L-L-G-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH_2
MTS-pA Ac-M-L-R-A-A-L-S-T-A-R-R-G-P-R-L-S-R-L-L-G-G-G-A-A-A-K-A-2Naf-K-A-A-NH_2
MTS-Naf Ac-M-L-R-A-A-L-S-T-A-R-R-G-P-R-L-S-R-L-L-G-G-G-2Naf-NH_2

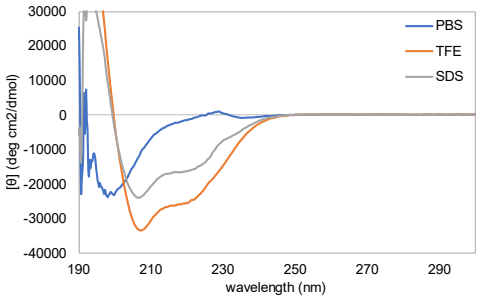
(Fig. 1) ペプチドの配列

CD 測定の結果、Cap-p は PBS 緩衝液中ではランダムコイル構造をとったが、TFE 中及び 20 mM SDS 含有 PBS 緩衝液中では顕著な α ヘリックス構造を示唆するスペクトルが得られた (Fig. 2)。一方、MTS-p、MTS-pA 及び MTS-Naf はいずれも、PBS 緩衝液中ではランダムコイル構造であるが、TFE 中及び 20 mM SDS 含有 PBS 緩衝液中では安定に α ヘリックス構造を形成した(Figs. 3-5)。

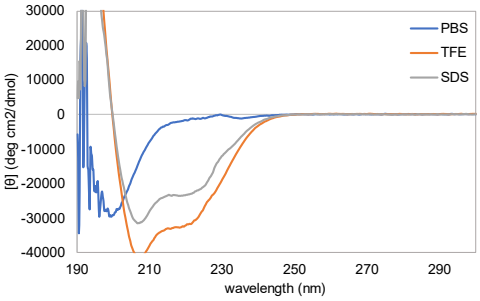
今後は、MTS 結合ペプチドの細胞毒性及び集合体の形態について評価する予定である。



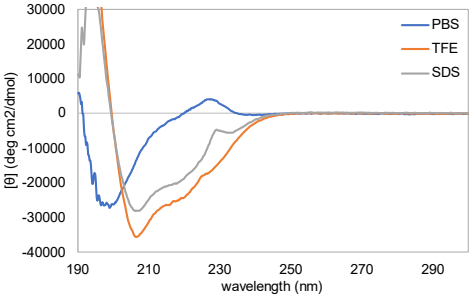
(Fig. 2) Cap-pのCDスペクトル



(Fig. 3) MTS-pのCDスペクトル



(Fig. 4) MTS-pAのCDスペクトル



(Fig. 5) MTS-NafのCDスペクトル

金選択的回収機能を有する芳香族化合物の合成

○奥田 龍[1]•今井 崇人[1]•浅野 昌弘[2]•富﨑 欣也[1]（龍谷大先端理工）

Synthesis of Aromatic Compounds with Selective Gold Recovery Mechanism ([1]Department of Materials Chemistry, [2]Ecology and Environmental Engineering Course, Ryukoku University) OKUDA, Ryo; IMAI, Takahito; ASANO, Masahiro; TOMIZAKI, Kin-ya

貴金属は、化学的安定性、電気伝導性、触媒能を有することから、工業的に広く用いられており、現代社会において欠かせないものとなっている。しかし、生産量が少なく、埋蔵量も限られているため、廃電子部品や工業廃液などの産業廃棄物からの貴金属回収の重要性が高まっている。貴金属の回収方法として、種々産業化されているものの、均一・低濃度溶液からの貴金属回収については更なる技術開発が必要である。当研究室では、貴金属回収方法として、自己集合化能を有するペプチドを利用して、貴金属イオン濃度を局所的に高め、希薄貴金属混合水溶液からの選択的回収が可能であると考えた [1, 2, 3, 4]。これまでに当研究室では、$HAuCl_4$ と H_2PtCl_6 の希薄混合水溶液から金イオンをより優位に還元鉱物化する最小ペプチド ($RU065_{4\text{-}8}$: Ac-K-A-2Ant-K-I-NH_2) (Fig. 1) を得ている。本研究では、産業応用を指向して、$RU065_{4\text{-}8}$ の構造を基に、非ペプチド性の芳香族化合物 (diAntED, monoAntED) を設計・化学合成し、金選択的回収機能の評価を行った。本研究で用いる芳香族化合物は $RU065_{4\text{-}8}$ の構造を基に、金イオンに電子を与えるためのアントラセン環を含み、$AuCl_4^-$取り込みのためのカチオンを含む構造とした (Fig. 2) 。合成した芳香族化合物を ^{1}H-NMR、^{13}C-NMR および MALDI-TOF-MS にて同定した。芳香族化合物を低濃度の塩酸に溶解させた溶液と、$HAuCl_4$ と H_2PtCl_6 の希薄混合水溶液を混合し、40℃、24 時間反応 ([HCl] = 0~1mM, [$HAuCl_4$] = 50 μM, [H_2PtCl_6] = 50 μM, [Aromatic Compound] = 200 μM) させた。反応溶液の UV-vis スペクトルを測定したところ、すべての反応溶液にて 550 nm 付近に金ナノ粒子特有のピークが得られた。次いで、遠心分離によって得た上澄み液を ICP-OES を用いて残存イオン濃度を定量したところ、いずれの塩酸濃度条件においても金イオン還元率は 90%を超えていた。

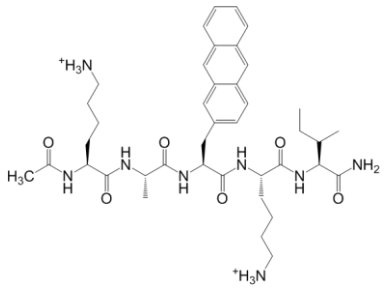


Fig. 1. $RU065_{4\text{-}8}$ ペプチドの構造

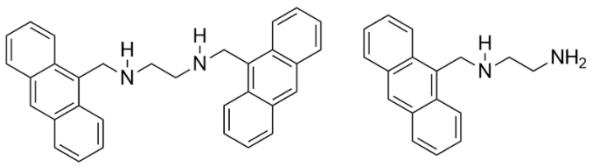


Fig. 2. (左) diAntED (右) monoAntED

1) Tomizaki, K.-Y. et al. *Langmuir* **2014**, 30, 846-856.
2) Tomizaki, K.-Y. et al. *Bioorg. Med. Chem*. **2015**, 23, 7282-7291.
3) Tomizaki, K.-Y. et al. *Int J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 5060.
4) Tomizaki K.-Y. et al. *Processes* **2021**, 9 2010.

ペプチドで修飾した金ナノロッドの表面電位変化

○中村翔也[1]・今井崇人[1]・山﨑正幸[2]・富﨑欣也[1]（龍谷大先端理工[1]・龍谷大農[2]）

Surface modification of gold nanorods with mitochondria – targeting peptide

(Department of Materials Chemistry, Ryukoku University [1], Department of Food Science and Human Nutrition, Ryukoku University [2])
NAKAMURA, Shoya[1] ; IMAI, Takahito[1] ; YAMASAKI, Masayuki[2] ; TOMIZAKI, Kin-ya[1]

細胞透過性の高い近赤外線を吸収し熱に変換する光熱変換特性をもつ金ナノロッドを用いた DDS (ドラックデリバリーシステム) が近年注目されている。薬剤をガン細胞に投与すると、薬剤の一部は ABC トランスポーターとよばれる膜タンパク質の働きにより細胞外に放出されるものの、その多くは細胞内に滞留し、薬効を発揮する。しかしながら、ABC トランスポーターが過剰発現した多剤耐性ガン細胞に薬剤を投与すると、大部分の薬剤は細胞外に放出され、薬効が十分に発揮されないという課題が指摘されている。この課題の解決策として、金ナノロッドの近赤外光に対する光熱効果により ABC トランスポーターのエネルギー源であるアデノシン 3 リン酸(ATP)を産生するミトコンドリアに損傷を与え、薬剤耐性を克服する方法が挙げられる。そこで本研究では、金ナノロッドをミトコンドリアに送達したのち近赤外光照射による金ナノロッドの発熱によってミトコンドリアに損傷を与え、ミトコンドリアの ATP 産生量を低下させることにより薬剤耐性ガンの克服を目指した。

まず、CTAB (ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド) 法を用いて金ナノロッドを合成し、次いで PEG (ポリエチレングリコール) で CTAB を置換した。そこにミトコンドリアへの移行能力を示す $(ChaDArg)_3$ ペプチド(Fig.1)を用いて表面修飾した。

Ac - Cha - D-Arg - Cha - D-Arg - Cha - D-Arg - AEEA - AEEA - Aoc(8) - Cys - NH_2

Fig. 1. $(ChaDArg)_3$ の配列

CTAB の分子膜が形成している金ナノロッド、PEG で CTAB を置換した金ナノロッドおよびペプチドを表面修飾した金ナノロッドを UV-vis 測定した結果、金ナノロッドの表面環境の変化に由来する吸収スペクトルのシフトが確認された(Fig.2)。また、CTAB、PEG およびペプチドで表面修飾した金ナノロッド表面のゼータ電位は以下の通りであった。CTAB の分子膜が形成している金ナノロッドは CTAB 分子膜由来の正のゼータ電位が得られ、その後 PEG で表面を置換することにより中性付近のゼータ電位が得られた。そこに$(ChaDArg)_3$ ペプチドを表面修飾すると再び正のゼータ電位が得られた(Fig.3)。これにより、金ナノロッド表面がカチオン性ペプチドにより修飾されたと考えられる。今後は表面修飾するペプチドの濃度を変化した際の金ナノロッドの UV-vis 測定およびゼータ電位を測定する予定である。

本研究の一部は、科研費(基盤 C : jp20K05713) の支援により実施された。

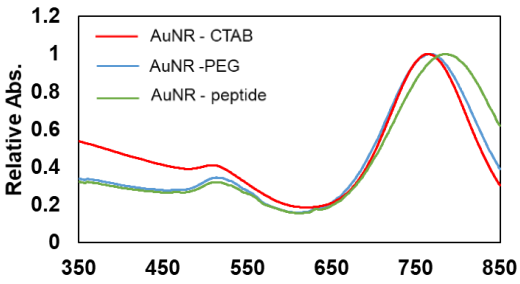


Fig. 2. UV-vis 測定

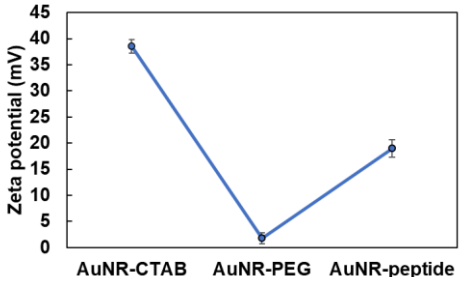


Fig. 3. ゼータ電位測定

ワンポットペプチド連結反応を駆使したモノボディの化学合成と機能評価

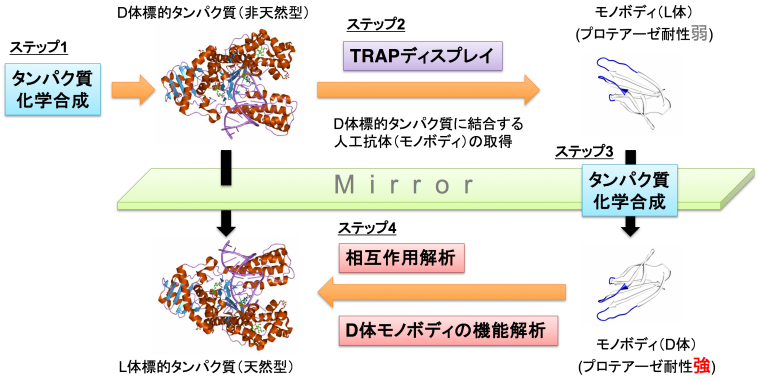
○小澤英知[1]・林剛介[1]・村上裕[1]（[1]名大院工）

Chemical synthesis and evaluation of monobody via one-pot peptide ligation (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1]) OZAWA, Eichi[1]; HAYASHI, Gosuke[1]; MURAKAMI Hiroshi[1]

モノボディは人工抗体の一種であり、IgG 抗体のように特定のタンパク質に特異的に結合する人工タンパク質である。IgG 抗体よりも分子サイズが 1/10 程度と小さいため、生体内において組織浸潤性が高い、試験管内分子進化法により取得が可能、大腸菌による発現が容易、化学的な改良がしやすい、といった利点を有する。現在、モノボディを含む人工抗体群は大腸菌発現によって合成されたものが研究に用いられているが、大腸菌発現では導入できるアミノ酸が 20 種類のアミノ酸に限定されるため、タンパク質の機能化を行う際に改良の範囲が制限されてしまう。そこで、我々の研究グループでは有機化学的にタンパク質を作製する「タンパク質化学合成法」を用いることで、非天然アミノ酸によって強化された「高機能性人工抗体」の創製が可能になると考え研究を推進している。

タンパク質化学合成法は、固相合成で作製したペプチド断片を順次ペプチド連結反応によってつなぎ合わせることでタンパク質を得る方法であり、非天然アミノ酸を部位特異的に導入することができる。しかし、連結する断片の数が多くなるほど精製過程に由来する収率の低下が問題となる。そこで本研究では、我々のグループで開発した有機金属錯体を用いた効率的ペプチド連結反応[2,3]を利用したモノボディの化学合成を行うこととした。標的モノボディとして、当研究室で取得されたコロナウイルス S タンパク質結合モノボディ[1]を選択し、108 アミノ酸からなるモノボディを 3 つのペプチド断片に分け、それぞれ固相合成で作製した。ペプチド 1 の C 末端 Asp の側鎖カルボン酸およびペプチド 2 の N 末端アミノ基には、それぞれ Pd 錯体で脱保護可能な Allyl 基および Alloc 基を導入した。ペプチド 2 と 3 の連結反応の後に Pd 錯体を加えることで連結したペプチドの N 末端が脱保護され、次の反応点が形成される。その後、新たにペプチド断片を加えることで 3 断片を精製せずに連結させることに成功し、さらに Asp 側鎖の Allyl 基も Pd 錯体によりワンポットで脱保護反応を行った。その後、HPLC 精製を行ってから連結部位のシステインを脱硫反応によってアラニンに変換し、モノボディを単離することに成功した。合成したモノボディの S タンパク質への結合能を評価したところ、10 nM 以下の Kd で結合することが明らかとなった。

次に機能化の例として、D 体アミノ酸で構成された「鏡像異性体モノボディ」の作製を試みた。鏡像異性体モノボディは、化学合成した D 体の標的タンパク質に対してモノボディを取得し、そのモノボディ配列を D 体アミノ酸で合成することで得ることができる（図）。本発表では D 体モノボディの合成と評価についても発表したい。



1) T. Kondo, Y. Iwatani, K. Matsuoka, T. Fujino, S. Umemoto, K. Ishizaki, S. Kito, T. Sezaki, G. Hayashi, H. Murakami *Sci. Adv.* 2020, 6, eabd3916. 2) N. Kamo, G. Hayashi, A. Okamoto *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, 57, 16533-16537. 3) N. Kamo, G. Hayashi, A. Okamoto *Chem. Commun.* 2018, 54, 4337-4340.

Photoactive Yellow Protein （PYP）タグを用いた化学遺伝学蛍光カルシウムイオンセンサーの改良

○寺井琢也[1]・Marcio Marinho[1]・門屋颯人[1]・針尾紗彩[1]・那須雄介[1]・Robert E. Campbell[1,2]（[1]東大院理、[2]アルバータ大化学）

Directed evolution to produce an improved chemigenetic Photoactive Yellow Protein (PYP)-based Ca^{2+} biosensor (Graduate School of Science, The University of Tokyo[1], Department of Chemistry, The University of Alberta[2]) TERAI, Takuya[1]; MARINHO, Marcio[1]; KADOYA, Hayato[1]; HARIO, Saaya[1]; NASU, Yusuke[1]; CAMPBELL, Robert E.[1,2]

タンパク質を基盤とする蛍光センサーは、現代の生物学研究において広く利用されている極めて有用な研究ツールである。しかし、遺伝子工学的手法により開発された蛍光タンパク質センサーには、光退色耐性や輝度、タンパク質サイズ等に課題も指摘されている。この限界を克服するためのアプローチの一つとして近年、細胞内に発現させた特定のタンパク質（タグタンパク質）と、それに共有結合するように設計された発蛍光合成色素を併用する化学遺伝学（chemigenetic）蛍光タンパク質を利用する方法[1)]が注目されている。しかし chemigenetic 蛍光センサーに関する既存の研究のほとんどは HaloTag[2)]を基本骨格に用いており、多パラメータでのイメージングには他のタグタンパク質の活用が求められている。そこで我々は、反応速度やサイズ面で優位性が見込まれる photoactive yellow protein (PYP)[3)]を新たなタグタンパク質として選択し、Ca^{2+}濃度に応答したタンパク質の立体構造変化によって蛍光強度が変化する化学遺伝学蛍光 Ca^{2+}センサーの開発を目的として研究を行っている（Fig. 1）。なお PYP と結合する蛍光色素としては、分子単独では無蛍光と報告されている DMAC-CMK[3)]を用いている。

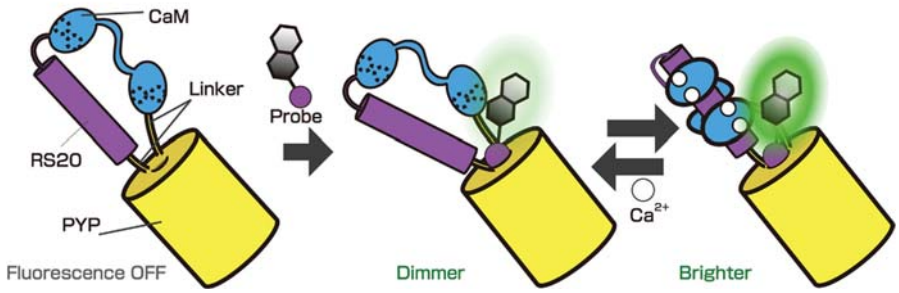


Fig. 1 本研究で開発する化学遺伝学 Ca^{2+}センサーの概念図

昨年度の本シンポジウムにおいて我々は、Ca^{2+}感知ドメインである CaM-RS20 ペプチドを PYP 中の 10 箇所のループにリンカーを介して挿入した変異体についての Ca^{2+}依存性蛍光応答、および有望な変異体に関するリンカーの長さの調整に関して報告した。最も良好な変異体は、Ca^{2+}添加による蛍光強度の変化率が 25%以上であった。更にリンカーの配列についても変異体スクリーニングによる最適化を部分的に行い、蛍光強度の変化率が 250%程度に上昇した事も報告した。

今年度のシンポジウムではその後の進捗として、①指向性進化によるセンサー機能の更なる向上、②最終的な Ca^{2+}センサー（PYCaMP と命名）の in vitro での機能評価、③培養細胞でのイメージング、について報告する。①に関しては、リンカーの残りの部分およびタンパク質全長に対するランダム変異導入を繰り返すことで、蛍光変化の大きさを最終的に約 20 倍にまで向上させることに成功した。②では Ca^{2+}との親和性や pH 感受性、蛍光量子収率などの測定を行った。③は現在進行中であり、当日までに得られた最新の結果について参加者と議論を行いたい。

1) C. Deo, A. S. Abdelfattah, H. K. Bhargava et al., *Nat. Chem. Biol.,* **17,** 718-723 (2021).
2) G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall et al., *ACS Chem. Biol.,* **3,** 373-382 (2008).
3) N. Kumar, Y. Hori, M. Nishiura, K. Kikuchi, *Chem. Sci.,* **11,** 3694-3701 (2020).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

紅色光合成細菌 *Thermochromatium tepidum* の LH2 タンパク質に結合するバクテリオクロロフィル *a* の化学酸化と光酸化

○平尾遥奈[1]・木村行宏[2]・大友征宇[3]・佐賀佳央[1]
（[1]近畿大院総合理工、[2]神戸大院農、[3]茨城大理）

Chemical Oxidation and Photo-oxidation of Bacteriochlorophyll *a* in LH2 Protein from the Purple Photosynthetic Bacterium *Thermochromatium tepidum* (Graduate School of Science and Engineering, Kindai University[1], Graduate School of Agriculture, Kobe University[2], Faculty of Science, Ibaraki University[3]) HIRAO, Haruna[1]; KIMURA, Yukihiro[2]; WANG-OTOMO, Zheng-Yu[3]; SAGA, Yoshitaka[1]

紅色光合成細菌には、光捕集の役割を持つタンパク質として LH2 が存在する。LH2 タンパク質はバクテリオクロロフィル (BChl) *a* (Fig.1) とカロテノイドが 2 種類のポリペプチドに保持され、環状に規則正しく配列した構造を形成している。主要色素である BChl *a* は 2 種類の状態で存在しており、800 nm と 850 nm に Q_y 吸収帯を持つことから B800 BChl *a* と B850 BChl *a* と呼ばれている。紅色光合成細菌 *Thermochromatium* (*Tch.*) *tepidum* の LH2 タンパク質では、B800 BChl *a* の Q_y 吸収帯に 2 種類のスペクトル成分が存在することや、B850 BChl *a* の Q_y 吸収帯が外部要因で変化するなど興味深い特徴を有する。このような *Tch. tepidum* の LH2 タンパク質の特徴の要因に関する知見を得るため、化学酸化と光酸化による LH2 タンパク質の BChl *a* のスペクトル変化を調べた。

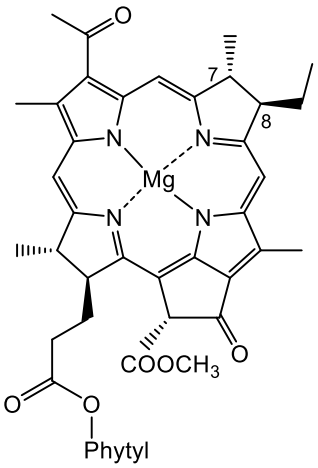


Fig.1: Molecular structure of BChl *a*.

定常光照射下で培養した *Tch. tepidum* を破砕して得られた光合成膜から *N,N*-ジメチルドデシルアミン-*N*-オキシド(LDAO) を用いて LH2 タンパク質の可溶化を行った。その後、ショ糖密度勾配遠心分離と陰イオン交換クロマトグラフィーによって LH2 タンパク質を精製した。精製した LH2 タンパク質に 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) 溶液を加え、35 ℃でインキュベーションを行った。その後、陰イオン交換クロマトグラフィーにて精製を行い、化学酸化 LH2 を得た。また、天然 LH2 と酸化 LH2 それぞれに可視光照射を行い、電子吸収スペクトル変化を調べた。

天然 LH2 の B800 BChl *a* は、長波長側に肩がある Qy 吸収帯を 800 nm 付近に示した。B800 BChl *a* を化学酸化した LH2 の電子吸収スペクトルを測定すると、800 nm 付近の Q_y 吸収帯が減少し 700 nm に新たに酸化色素の Q_y 吸収帯が得られた（Fig.2）。それに対して、B850 BChl *a* の Q_y 吸収帯は若干の短波長シフトにとどまった。この B850 BChl *a* の Q_y 吸収帯のシフトは、DDQ を溶解させている溶媒の影響であると考えられる。また、DDQ 濃度が小さい場合は、B800 BChl *a* の短波長側の Q_y 吸収帯が長波長側よりも先に減少した。天然 LH2 と酸化 LH2 に可視光照射を行うと、B800 BChl *a* の Q_y 吸収帯はあまり変化せず、B850 BChl *a* の Q_y 吸収帯は光酸化によって減少し、短波長シフトした。

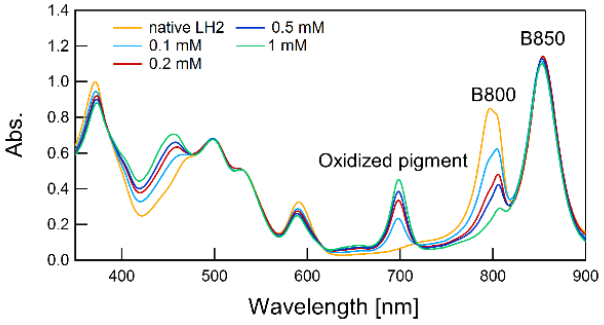


Fig.2: Electronic absorption spectra of native LH2 and chemically oxidized LH2. DDQ concentration was changed from 0.1 mM to 1 mM.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

紅色光合成細菌の LH3 タンパク質の B800 バクテリオクロロフィル *a* の酸化によるエネルギー移動への影響

○濱西浩平[1]・髙島佑介[1]・山本哲也[2]・日名子一起[2]・長澤裕[2]・佐賀佳央[1]
（[1]近畿大院総合理工、[2]立命館大院生命科学）

Effects of oxidation of B800 bacteriochlorophyll *a* in the LH3 protein of the purple photosynthetic bacterium on excitation energy transfer (Graduate School of Science and Engineering, Kindai University[1], Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University[2]) HAMANISHI, Kohei[1]; TAKASHIMA, Yusuke[1]; YAMAMOTO, Tetsuya[2]; HINAGO, Kazuki[2]; NAGASAWA, Yutaka[2]; SAGA, Yoshitaka[1]

紅色光合成細菌の光捕集タンパク質にはバクテリオクロロフィル（BChl）*a* (Fig.1A)が 2 種類の状態で結合しており、それぞれ 800 nm と 850 nm 付近に Q_y 吸収帯をもつため B800 BChl *a* と B850 BChl *a* と呼ばれている。これらの色素はタンパク質内で高速かつ高効率のエネルギー移動を行っており、B800 BChl *a* はエネルギードナーとして、B850 BChl *a* はアクセプターとして働く。ある種の細菌は LH2 タンパク質の代わりに LH3 タンパク質を生合成する。LH3 タンパク質では、B850 BChl *a* の Q_y 吸収帯が 820 nm にシフトしている B820 BChl *a* が存在する。LH3 タンパク質においても LH2 タンパク質と同様に色素間でのエネルギー移動が行われているが、BChl *a* の Q_y 吸収帯のスペクトルの重なりが大きいにも関わらず、そのエネルギー移動速度は類似している。このような LH3 タンパク質のエネルギー移動メカニズムを理解することは LH3 タンパク質の光捕集機能の人工的な制御に繋がる。本研究では、エネルギードナーである B800 BChl *a* を 2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン（DDQ）によって酸化することで改変し、タンパク質構造を変化させずにドナーの Q_y 吸収帯の特性を変化させることを目的とした。

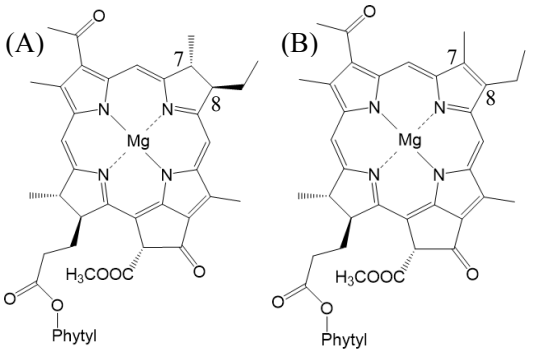


Fig.1: BChl *a* (A)と 3-acetyl-Chl *a* (B)の分子構造

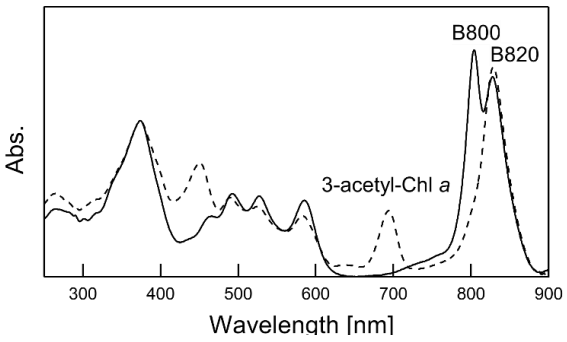


Fig.2: *Rhodoblastus* (*Rbl.*) *acidophilus* DSM137 から単離した天然 LH3（実線）と DDQ で酸化した LH3（点線）の電子吸収スペクトル

弱光を照射して培養した *Rhodoblastus* (*Rbl.*) *acidophilus* DSM137 を細胞破砕し得たクロマトフォアから界面活性剤 LDAO を用いて膜タンパク質を可溶化し、ショ糖密度勾配遠心分離と陰イオン交換クロマトグラフィーで LH3 タンパク質を精製した。得られた LH3 タンパク質を DDQ とインキュベーションした後に、陰イオン交換クロマトグラフィーで精製して酸化 LH3 を得た。

酸化 LH3 タンパク質の電子吸収スペクトルを測定すると、B800 BChl *a* の Q_y 吸収帯が減少し、700 nm 付近に新たに Q_y 吸収帯が現れた(Fig.2)。HPLC での色素分析の結果、BChl *a* および 3-アセチルクロロフィル（3-acetyl-Chl）(Fig.1B)が検出されたことから、DDQ によって B800 BChl *a* が酸化され、3-acetyl-Chl が生成したことから明らかになった。また、酸化 LH3 タンパク質の蛍光スペクトルから 3-acetyl-Chl から B820 BChl *a* へのエネルギー移動が確認され、過渡吸収分光によって酸化 LH3 タンパク質でのエネルギー移動速度とその過程を明らかにした。

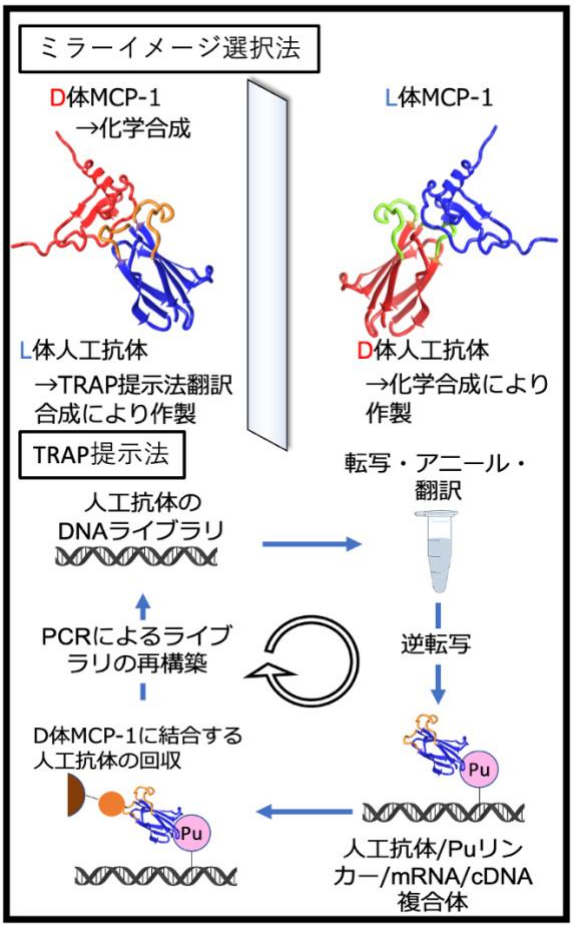
©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

MCP-1 に結合するミラーイメージ人工抗体の創製

○三浦清楓[1]・近藤太志[1]・薄井友輔[2]・大石真也[3]・藤野公茂[1]・林剛介[1]・村上裕[1,4]（名大院工[1]・京大院薬[2]・京都薬大[3]・名大未来ナノ[4]）

Mirror-Image Selection for Anti-MCP-1 Artificial Antibody (Graduate School of Engineering, Nagoya University[1], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University [2], Kyoto Pharmaceutical University [3], Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University [4]) MIURA, Sayaka[1]; KONDO, Taishi[1]; USUI, Yusuke[2]; OOISHI, Shinya[3]; FUJINO, Tomoshige[1]; HAYASI Gosuke[1]; MURAKAMI, Hiroshi[1,4]

D 体のアミノ酸のみで構成されている D 体タンパク質は体内で分解されにくく、また、免疫原性も低いと考えられており、近年、医薬品への応用が期待されている。本研究では、鏡像異性の関係を利用したミラーイメージ選択法を [1]、我々が開発した TRAP 提示法 [2),3)]に応用して、人工抗体のミラーイメージ抗体を作製することを試みた。



まず、慢性炎症などの炎症性疾患の一因となることが知られている MCP-1 を標的とし、これを D 体アミノ酸のみで化学合成した。合成した D 体 MCP-1 を、フィブロネクチンIII型ドメインの 10 番目のユニット [4)]を骨格とし、2 箇所のループ部分をトリヌクレオチド合成によりランダム化して作製した、10^{13} 程度の多様性を持つ人工抗体ライブラリと混合し、TRAP 提示法により、D 体 MCP-1 に結合する人工抗体の濃縮を行った。得られた配列を、次世代シーケンサーによって決定し、人工抗体の候補を大腸菌で発現・精製して、バイオレイヤー干渉法により結合パラメーターを決定した。その結果、D 体 MCP-1 に対して数百 nM の親和性を持つ人工抗体が選択できたことが分かった。さらに、結合親和性を向上するために人工抗体のループ部分の一部を再ランダム化して選択を行うアフィニティマチュレーションを行ったところ、親クローンよりも解離定数が 140 倍改善された人工抗体を創製することができた。今後、本研究で創製した D 体 MCP-1 特異的な人工抗体を基に、化学合成により D 体の人工抗体を作製することで、体内で分解されにくく、免疫原性も低い抗 MCP-1 人工抗体が開発できると期待される。また、本発表では同時に開発を進めた、L 体 MCP-1 に対する人工抗体の選択についても、D 体 MCP-1 と比較して発表を行う。

1）T. N. M. Schumacher, L. M. Mayr, D. L. Minor Jr., M. A. Milhollen, M. W. Burgess, P. S. Kim, *SCIENCE*, **271**, 1854-1857 (1996)

2）T. Ishizawa, T. Kawakami, P. C. Reid, H. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **135,** 5433-5440 (2013)

3）T. Kondo, Y. Iwatani, K. Matsuoka, T. Fujino, S. Umemoto, Y. Yokomaku, K. Ishizaki, S. Kito, T. Sezaki, G. Hayashi, H. Murakami, *Sci Adv.*, **6**, 42 (2020)

4）A. Koide, C. W. Bailey, X. Huang, S. Koide, *J. Mol. Biol.*, **284**, 1141-1151 (1998)

DNA 修復機構における核内相分離構造体を可視化できる新規蛍光プローブの開発

○渡邉　愛梨・深田　梨沙子・田代　有輝・金岡　英徳・清中　茂樹（名大院工）

Development of a fluorescent probe for visualizing phase-separated cellular bodies in DNA repair processes

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) Airi Watanabe, Risako Fukata, Yuki Tashiro, Hidenori Kaneoka, Shigeki Kiyonaka

真核生物の細胞内には様々なオルガネラが存在する。ミトコンドリアなどの脂質二重膜をもつオルガネラとは異なり、膜構造を持たない核小体などのメンブレンレスオルガネラはタンパク質や RNA が相分離によって形成されるダイナミックな挙動を示す。メンブレンレスオルガネラは数十年前から生体機能制御に深く関わっていることが示唆されているが、構造形成に関わる分子間相互作用は非常に弱く、構成因子が動的に変化することから解析が困難であった。そのため生体機能を理解する上でメンブレンレスオルガネラの解析は重要にも関わらず、その形成機構や意義、生体機能への具体的な関与については未だ解明されていない。

そこで本研究ではメンブレンレスオルガネラの蛍光イメージングによる可視化およびラベル化を可能とする新規タンパク質プローブの開発を行った。焦点を当てたのは、DNA 二重鎖切断（DNA double-strand break : DSB）時に損傷部特異的に形成されるタンパク質複合体（foci）である。この DNA 修復 foci は翻訳後修飾因子依存的なタンパク質-タンパク質間相互作用により DNA 修復因子が集積して形成される核内相分離構造体である。Foci 形成には SUMO 化やユビキチン化といった翻訳後修飾が大きく関与している。DSB 初期の修復経路の選択を担う因子 RAP80 も SUMO と相互作用する SIM　(SUMO-interacting motif)を持ち、SUMO-SIM 相互作用によって機能が制御されている。我々は split 型の蛍光タンパク質に RAP80 と SUMO をそれぞれ融合させ、これらのタンパク質間相互作用に基づくプローブを作製し（Fig. 1）、DNA 修復 foci としての解析、評価を行った。我々が作製した split 型の新規蛍光プローブでは、RAP80 に蛍光タンパク質 EGFP を融合したプローブよりもバックグラウンド蛍光が減少し、SUMO-SIM 相互作用依存的な蛍光の検出に成功した。また DNA 損傷マーカーとの局在解析を行った結果、その大半のプローブは損傷マーカーと一致した。一方で、各ドメインを削った RAP80 変異体プローブは野生型 RAP80 を用いたプローブとは異なる動態を示した。

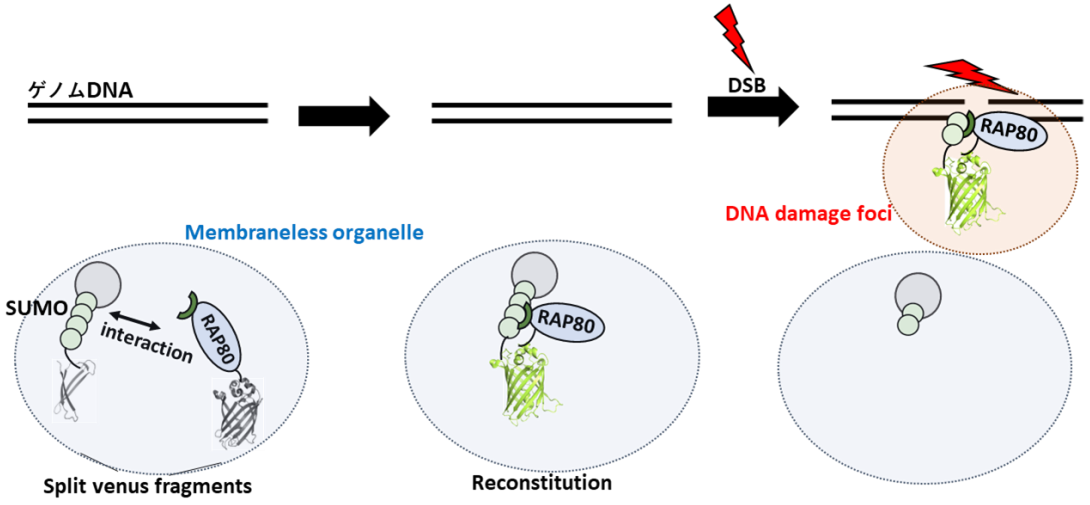


Fig1. SUMO-SIM 相互作用依存的な split 型蛍光プローブ

pH 応答性伸縮タンパク質集合体の構造解析

○伊達弘貴[1]・Thuc Toan PHAM[1]・内橋貴之[2]・上久保裕生[3]・宋致弘[4]・村田和義[4]・上野隆史[1]（[1]東工大生命理工、[2]名大院理、[3]奈良先端大物質、[4]ExCELLS・生理学研究所）

Structural analysis of pH-responsive piston protein assembly (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology [1], Graduate School of Science, Nagoya University[2], School of Science and Technology, NAIST, MS[3], ExCELLS/NIPS[4]) DATE, Koki[1]; Thuc Toan PHAM [1]; UCHIHASHI Takayuki[2]; KAMIKUBO Hironari[3]; SONG, Chihong[4]; MURATA, Kazuyoshi[4]; UENO, Takafumi [1]

【はじめに】自然界では，タンパク質が自己集積したナノメートルからマイクロメートルスケールの構造体形成により，様々な分子機能の制御が行われている．特にタンパク質が集合化することによって形成される固体材料は，その特異な物性や形状から次世代ソフトマテリアルとして注目されている．我々はゾウリムシの細胞共生体内で発現し，伸縮により内側から細胞を破壊する Refractile body（R-body）に注目した [1]．R-body は RebA, RebB, RebC, RebD と呼ばれる 4 種のタンパク質の共発現によって合成される．このうち RebA, RebB が主要構成タンパク質となり，直径 500 nm，高さ 400 nm のバレル構造体が形成される．R-body は，pH 5 と pH 7 の間でバレル構造から，長さ 20 μm のニードル構造へと可逆的な伸縮を行う（Fig. 1a）[2]．この 50 倍ものサイズ形成は，タンパク質の集積パターン変化に伴う集合体の階層構造変化によって生じると考えられるが，その詳細はいまだに不明である．先行研究では，その三次元構造は透過型電子顕微鏡で観察できているものの，詳細な構造決定には至っていない（Fig. 1a）[2]．そこで本研究では，伸縮メカニズムの解明にはタンパク質の集積パターンを解明することが必要と考え，高速原子間力顕微鏡（HS-AFM）測定等を用いた構造解析を行った．

【方法】本研究では，R-body のうち，大腸菌で培養可能な 51 型 R-body を用いた [1]．菌体を超音波破砕したうえで，文献に従い精製し，無色の微粒子状固体を得た [2]．SDS-PAGE によって目的物が単離されたことを確認し，pH 依存の伸縮反応を観察した．この試料を用いて各種測定を行った．

【結果と考察】HS-AFM 測定によって溶液中でチューブの形状をとることを確認した（Fig. 1b）．また，HS-AFM 測定でチューブ状の R-body の内側表面および外側表面の構造を観測した．さらに，全反射赤外分光法（ATR-IR）測定から 1650 cm^{-1} 付近に Amide Ⅰの α ヘリックスに特徴的なピークが観測された．この結果から α ヘリックスが主要二次構造成分となっていることが示された．今後はさらに解析を進め，二次構造と表面構造，R-body の形状の関係を調べていく．

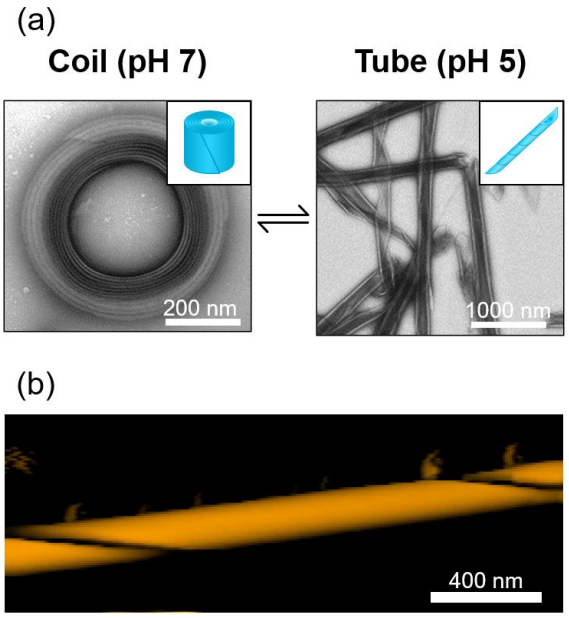


Fig.1 (a) TEM image of R-body.[2] (b) HS-AFM image of R-body in liquid.

【参考文献】(1) Pond, F. R. *et al.*, *Microbiol. Rev.* 53, 25-67, **1989**. (2) Polka, J. K. *et al.*, *ACS Synth. Biol.* 5, 303-311, **2016**.

中性子結晶構造解析によるマクロファージ遊走阻止因子のサイトカイン活性制御に関与するタンパク質構造ネットワークの観測

○江澤理徳[1]・刈屋佑美[2]・平野優[3]・日下勝弘[4]・玉田太郎[3]・涌井秀樹[1]・尾高雅文[1]・松村洋寿[1]（[1]秋大院理工、[2]秋大産連、[3]量研機構量子生命、[4]茨大フロンティア）

Observation of protein structure network involved in modulation of cytokine activity of macrophage migration inhibitory factor by neutron crystallography (Graduate School of Engineering Science, Akita University[1], Cooperative Research Center, Akita University [2], Institute for Quantum Life Science, QST[3], Frontier Research Center for Applied Atomic Sciences, Ibaraki University[4]) EZAWA, Toshinori[1]; KARIYA, Yumi[2]; HIRANO, Yu[3]; KUSAKA, Katsuhiro[4]; TAMADA, Taro[3]; WAKUI, Hideki[1]; ODAKA, Masafumi[1]; MATSUMURA, Hirotoshi[1]

【目的】マクロファージ遊走阻止因子(MIF)は、免疫及び炎症において重要な役割を担うサイトカインであり、関節リウマチや全身性エリテマトーデス等の多くの自己免疫疾患に関与することから、潜在的な治療標的となっている。MIF による炎症反応は、MIF が受容体 CD74 を活性化し、下流にシグナルが伝達され、IL-1β 等の炎症性サイトカインの産生が促進されることで惹起される。これまでに様々な低分子 MIF 阻害剤が開発され、X 線結晶構造解析を含む相互作用解析が行われてきた。しかし、MIF による CD74 活性化の分子機構及びその阻害機構は未だ不明であるため、合理的な MIF 阻害剤の設計法の確立には至っていない。最近、E. Lolis らによって、MIF 構造には、構造表面の CD74 結合部位と構造内部の N 末端 Pro1 を繋ぐ水素結合を介した構造ネットワークが存在し[1)]、その構造ネットワークを介した構造ダイナミクスが CD74 の活性化を制御していると提案された。しかし、現在に至るまで、この構造ネットワークの存在は、実験的な証明がなされていない。そこで本研究では、MIF による CD74 活性化の分子機構及び MIF 阻害剤による阻害機構を明らかにすることを目的とし、中性子結晶構造解析により MIF の水素原子を含む精密構造を決定し、MIF の構造ネットワークを観測することとした。

【実験方法】60 mg/mL MIF 溶液とリザーバー溶液(0.49 M NaD_2PO_4、0.91 M K_2DPO_4)を用いて、sitting drop 法により大型結晶を作成した。iBIX BL-03 (J-PARC)で、得られた結晶に対して室温で 7.5 日間中性子を照射し、中性子回折データを得た。また、Photon Factory BL-5A (KEK)で、同結晶に対して室温で X 線を照射し、X 線回折データを得た。これらの回折データを複合精密化し、MIF 構造を決定した。

【結果及び考察】中性子及び X 線回折データの複合精密化により、MIF の水素原子を含む構造を分解能 2.0 Å で決定した。MIF の中性子結晶構造において、構造表面の CD74 結合部位と構造内部の N 末端 Pro1 を繋ぐ、水素結合を介した構造ネットワークが観測された(Fig. 1)。観測された構造ネットワークは、Lolis らが提唱しているもの比較すると、わずかな差異はみられたものの、MIF の全体構造を横断していることから、構造ダイナミクスに影響を与える可能性が示唆された。代表的な MIF 阻害剤の ISO-1 は、Pro1 近傍に結合することで MIF の CD74 活性化を阻害する。本結果から、ISO-1 の結合により、MIF の N 末端で生じる ISO-1 との相互作用が、構造ネットワークを介して MIF 全体の構造ダイナミクスに影響を与え、その結果、MIF による CD74 の活性化が阻害されると予想される。

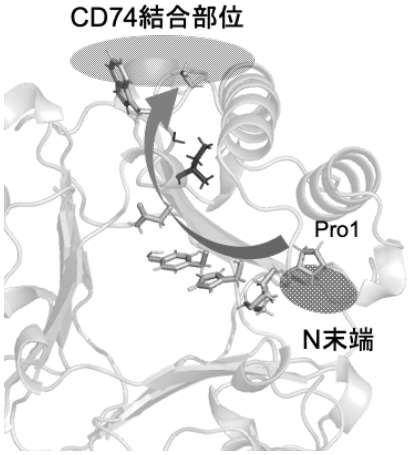


Fig. 1 MIF の中性子結晶構造中で観測された構造ネットワーク.

1) G. Pantouris, *et al*., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 7116-7119 (2018)

水性二相系を用いたシェル型タンパク質液滴の形成条件

○林夢乃・藤瀬優介・鈴木勇輝・湊元幹太（三重大院工）

Shell-type microdroplets containing proteins generated within aqueous two-phase systems (Graduate School of Engineering, Mie University) Yumeno HAYASHI, Yusuke FUJISE, Yuki SUZUKI, Kanta TSUMOTO

近年、細胞質の新しいモデルとして、水性高分子による水性 2 相系によりミクロな相分離状態を調製し、ミクロな液滴区画内へタンパク質や核酸を濃縮したり、その混雑な環境下において生体高分子集合や酵素反応を実現したりするなど、生細胞の特徴的な生化学反応系を試験管内で再構築しようとする研究が盛んとなっている。水性の液-液相分離（LLPS, liquid-liquid phase separation）を引き起こす水性 2 相系（ATPS, Aqueous Two Phase System）は、主鎖構造の異なる水溶性高分子 2 種が相分離し、攪拌後一定時間程度ミクロな相分離状態（液滴構造）が持続するため、細胞モデルとして良く研究されている[1]。

今回、ATPS 溶液の組み合わせとして、代表的な polyethylene glycol(PEG 6,000)と dextran(DEX 20,000)を用い、そこへ球状タンパク質である γ-globulin を加え、顕微鏡観察（位相差、共焦点、および蛍光輝度プロファイル）を行い、その局在性と形態について調べた。ATPS 溶液中の γ-globulin 濃度を上げると、はじめ DEX 液滴に分配されていた γ-globulin は、その濃度に応じて局在性を変化させ、DEX 液滴からも分離した。その形態は、入れ子様または区画内区画型を与えるシェル構造の液滴となり、内部で PEG と DEX がさらに相分離して存在することが分かった（Fig. 1）。γ-globulin は DEX から排除される一方で、PEG とは共存していた。次に、この特徴的な形態がタンパク質や pH 値に依存しているかどうかを調査した。比較対象としてタンパク質には球状タンパク質の Ovalbumin (pI 4.6)と繊維状タンパク質の Lysozyme (pI 10.5-11))、緩衝液には酢酸/酢酸ナトリウムバッファー（Sodium acetate buffer (pH 4)）と 炭酸水素ナトリウムバッファー（$NaHCO_3$ buffer (pH 9.77)）を用い、顕微鏡観察（位相差、共焦点、および蛍光輝度プロファイル）を行った。その結果、Lysozyme や結晶化 Ovalbumin については、シェル液滴は観察出来なかったが、純度の低い Ovalbumin ではシェル液滴が見られ γ-globulin と似た結果が得られた（Fig. 2）。また、酸性条件の時、γ-globulin と Lysozyme による液滴には形態変化は見られなかったが、Ovalbumin は純度によらず、DEX 液滴内での凝集が見られた。塩基性条件においても、Lysozyme では形態変化が観察されなかったのに対して、γ-globulin のシェル液滴は形成されず、γ-globulin と Ovalbumin の液滴については、均一な液滴が観察された。これらのことから、シェル液滴形成はタンパク質溶液の純度や pH 値に依存していると示唆された。

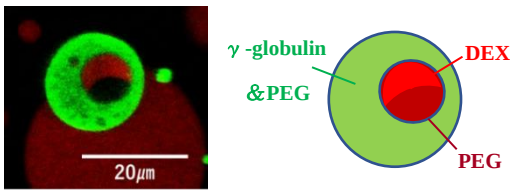


Fig 1. Microdroplets containing subcellular microcompartments of the PEG (dark red, Cy5) / DEX (light red, rhodamine) phase separation surrounded by γ-globulin proteins (green, Alexa Fluor 488) and PEG.

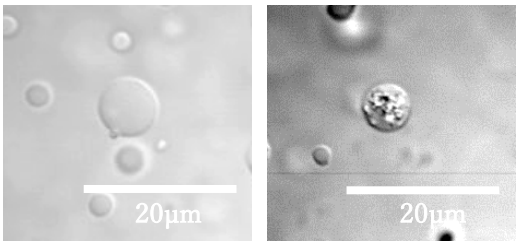


Fig 2. (Left) Phase contrast image with purified (crystalized) ovalbumin. (Right) Phase contrast image of shell-type microdroplets in the presence of ovalbumin with lower purity.

今後、水性ミクロ相分離を用いて生体分子局在が制御された細胞質模倣材料の創製に繋がると期待される。

[1] Sakuta H et al., *ChemBioChem* 2020, 21, 3323; Nakatani N et al., *ChemBioChem* 2018, 19, 1370.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

新規求電子性反応基を用いた薬剤耐性変異 BTK に対する不可逆阻害剤の開発

○河野 正晴[1]・田村 朋則[1]・村川 駿介[1]・浜地 格[1,2]([1]京大院工、[2]JST ERATO)

Covalent inhibitors for drug-resistant BTK mutant using novel electrophilic warhead (Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], *ERATO JST*[2]) KAWANO, Masaharu[1]; TAMURA, Tomonori[1]; MURAKAWA, Shunsuke[1]; HAMACHI, Itaru[1,2]

近年、低分子医薬品の設計戦略として不可逆阻害剤が注目を集めている。不可逆阻害剤は求電子性反応基と標的タンパク質に対するリガンドで構成され、タンパク質上の求核性アミノ酸と共有結合を形成することで、その機能を不可逆的に阻害する。従来の不可逆阻害剤の多くは求核性の高いシステイン残基を標的とし、マイケルアクセプターのようなチオール選択的反応基が採用されてきた。ところが近年、システインが変異することで薬剤耐性を獲得する例が複数報告されており、システイン以外のアミノ酸を修飾可能な反応基の必要性が高まっている。このような背景の中、我々はこれまでに *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide (NASA)基がリジン・チロシン残基を標的とした不可逆阻害剤の反応基として有用であることを実証してきた[1,2]。一方、NASA 基は比較的反応性が高いため、血清存在下ではアルブミンなどへの非特異反応が進行してしまい、*in vivo* への応用が制限されていた。この問題を克服するために、我々は NASA 基の構造最適化を試み、Ar-NASA 基が新たにタンパク質修飾に有用な反応基骨格であることを見出した。本研究では、Ar-NASA 基の反応性評価と、薬剤耐性を獲得したタンパク質に対する不可逆阻害剤への適用を検討した(Fig.1a)。

初めに、従来の NASA 基もしくは Ar-NASA 基を有するアルキンプローブをそれぞれ合成し、HEK293T 細胞プロテオームとの反応性を評価した。その結果、Ar-NASA 型プローブは NASA 型プローブと比較して顕著に非特異反応性が低いことがわかった。次に、薬剤耐性タンパク質のモデルとして、C481S 変異型 Bruton's Tyrosine Kinase (BTK)を標的とした不可逆阻害剤開発を試みた。BTK リガンドである Ibrutinib を骨格として Ar-NASA 基を導入したプローブを合成し、強制発現系において BTK 修飾能を評価した(Fig. 1b)。その結果、従来のマイケルアクセプター(MA)型プローブは野生型 BTK には高い修飾能を示すものの、C481S 変異体に対しては修飾反応が進行しないことがわかった。一方、Ar-NASA 型プローブは野生型・C481S 変異体共に修飾可能であり、実際に MA 型プローブよりも強力かつ持続的に BTK(C481S 変異体)のキナーゼ活性を阻害することが示された。

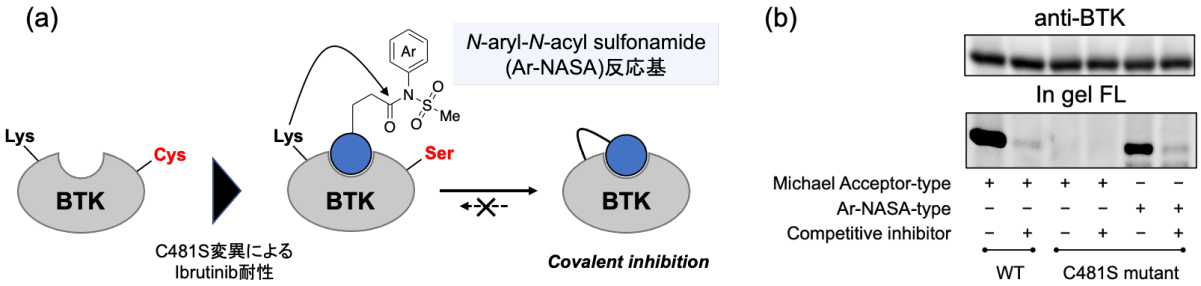


Figure 1. (a) General scheme of covalent inhibition against drug-resistant BTK mutant using Ar-NASA warhead.(b) In cell BTK labeling with Michael Acceptor-type or Ar-NASA-type probe.

1) T. Tamura *et al.*, *Nat. Commun.*, 2018, 9, 1870. 2) T. Ueda *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2021, 143(12), 4766-4774.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

蛍光磁性ナノ粒子を用いたレクチンー糖質間相互作用の検出法の開発

○鈴木祥夫（産総研健康医工学）

Development of the Detection for the Interaction between Lectins and Saccharides using Fluorescent Magnetic Nanoparticles (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) SUZUKI, Yoshio

近年、糖質に関する研究が目覚ましく進歩しており、癌、免疫受容体、受精、発生・分化、感染症、バイオ医薬品開発等において、重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。糖質を標的とする診断薬等の開発には、糖質とそれを認識するプローブとの相互作用を定性・定量的に解析する必要があるが、糖質とプローブとの結合力は一般的な抗体-抗体反応と比較して弱いため、新たな評価技術の開発が求められている。

レクチンを表面修飾し、かつ蛍光物質（Cy3）を内包した蛍光性磁気ビーズを用いて、糖タンパク質を濃縮するための反応条件の最適化、阻害糖を用いて濃縮した糖タンパク質を溶出するための反応条件の最適化、繰り返し測定の検証および ELISA 法との比較による本法の定量性について検証した。その結果、糖タンパク質の磁気ビーズ表面への濃縮過程と阻害糖による糖タンパク質の溶出過程を磁気ビーズに内包した蛍光物質からの発光強度をモニタリングすることによって、リアルタイムで追跡可能であり、最終的に極微量の糖タンパク質(0.1ng)を濃縮することに成功した（計測前の前処理時間は 1～2 時間）。また、溶出過程においても阻害糖添加後の磁気ビーズから発せられる蛍光強度をモニタリングすることによって反応を追跡することができ、１バッチの磁気ビーズで最大５回の繰り返し測定を行えることが分かった。さらに、市販の Human Transferrin ELISA Kit および α1-酸性糖タンパク質 ELISA キットを用いて、本法の定量性について検証したところ、未知試料濃度について両者の間に良好な相関性が確認され、誤差範囲についても 5%以内に収まることが示唆された。

本法の応用例の一つとして、がん由来細胞中の糖質の濃縮効果について検討するため、MCF-7（ヒト乳腺癌由来細胞）、A549（ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞）、HeLa（ヒト子宮頸癌由来細胞）、HepG2（ヒト肝癌由来細胞）のライセ―トに含まれる糖質の濃縮を試みたところ、AAL と親和性の高いフコースリッチの O-結合糖鎖の濃縮効果が最も高く、過去の報告例と矛盾しない結果が得られた。また、阻害糖による溶出過程のモニタリングにも成功した。

以上のことから、今回、開発した技術を用いることにより、糖質の迅速かつ高感度検出が可能になると考えられる。

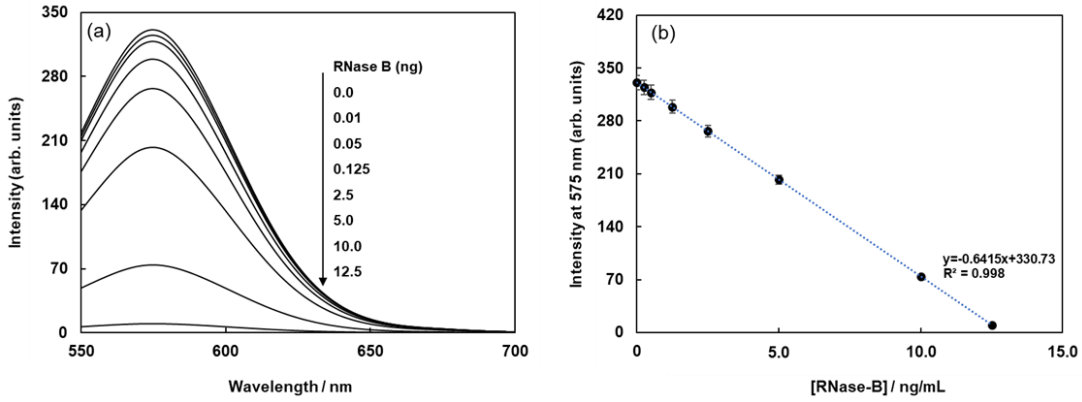


Figure 1. Fluorescence spectra of fluorescent magnetic beads modified by Con A (FMB-Con A) before and after the addition of RNase-B (a), and plots of the fluorescence intensities of FMB-Con A at 575 nm against the concentrations of RNase-B (b).

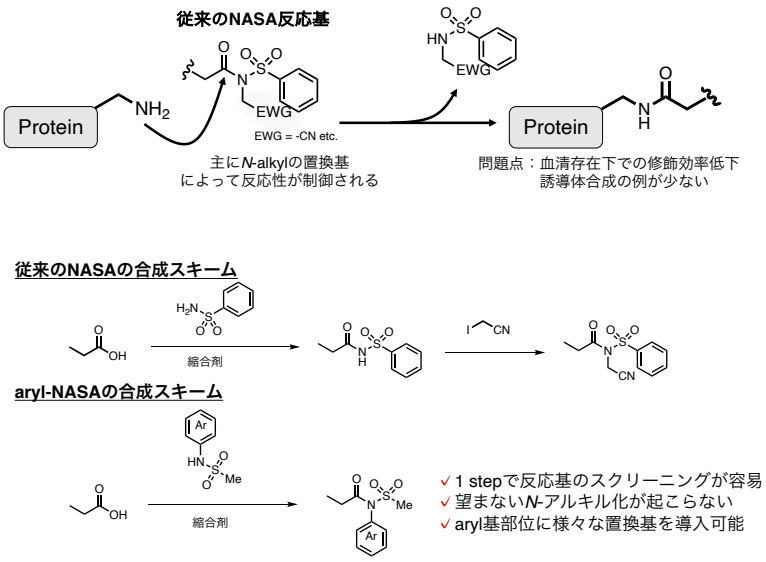
in vivo 応用を指向した新規 NASA 反応基の構造活性相関

○村川駿介[1]・河野正晴[1]・田村朋則[1]・浜地格[1,2]（[1]京大院工、[2]JST ERATO）

Structure activity relationship of new NASA derivative warhead for *in vivo* application (Graduate School of Engineering, Kyoto University[1], JST ERATO[2]) MURAKAWA, Shunsuke[1]; KAWANO, Masaharu[1]; TAMURA, Tomonori[1]; HAMACHI, Itaru[1,2]

生体内のような分子夾雑環境下で、標的タンパク質（POI）の選択的化学修飾を可能にする有機化学反応の開発は現在のケミカルバイオロジー分野におけるチャレンジングな課題である。これを実現するためにクリックケミストリーに代表される bioorthogonal chemistry に基づいたタンパク修飾方法がこれまで数多く開発されてきた。一方、これらは非天然アミノ酸やタグの遺伝子工学的導入を伴うため、内在性（天然型）POI を修飾することは困難である。これに対して我々は遺伝子操作を行うことなく内在性 POI を選択的に化学修飾するための戦略として、リガンド指向性化学(ligand-directed chemistry: LDC)を開発してきた。本手法では、POI に対するリガンドと機能性分子を cleavable な求電子性反応基で連結した修飾試薬を用いる。修飾試薬が POI に認識されると、リガンド認識部位近傍の求核性アミノ酸残基と求電子性反応基が近接することで反応が促進され、標的選択的かつ部位特異的修飾が達成される。LDC は修飾試薬の分子設計次第で POI のラベリング・機能化だけではなく、近年製薬業界で注目を集めている不可逆阻害剤開発にも展開可能である。特に、我々が最近開発した *N*-acyl-*N*-alkyl sulfonamide (NASA)基[1,2]はリジンやチロシンと選択的かつ迅速に反応するというユニークな反応性を有しており、不可逆阻害剤の warhead としての応用が期待されている。しかしながら、NASA 基は血清存在下において不安定であり、生物個体への応用が困難であった。この問題を克服するためには NASA 基の反応性に影響する *N*-alkyl 部位の構造変換が有効であると考えられるが、NASA 基の誘導体合成に関する報告例はほとんどなく、構造活性相関研究が不十分であった。このような背景から、本研究では *in vivo* における POI の修飾・不可逆阻害を目指し、NASA 基をベースとした新たな反応基開発に取り組んだ。具体的には、NASA 基の *N*-alkyl 部位を aryl 基に変更した *N*-acyl-*N*-aryl sulfonamide (Ar-NASA)骨格の合成ルートを新たに開拓し、様々な aryl 基を有する Ar-NASA を用いて構造活性相関を行なった。

HSP90 の N 末端 ATP 結合ドメイン(HSP90^{N})をモデル標的タンパク質として、複数の Ar-NASA 型修飾試薬を合成し、精製 HSP90^{N} に対する修飾能を MALDI-TOF-MS によって評価した。その結果、いくつかの Ar-NASA 誘導体は従来の NASA 反応基に匹敵する反応速度を有することが明らかとなった。本発表では、これらタンパク質修飾反応の詳細と各 Ar-NASA 基の安定性評価について報告する。



1) T. Tamura et al., *Nat. Commun.*, 2018, **9**, 1870.

2) T. Ueda et al., *JACS.*, 2021, **143**, 4766-4774.

細胞内結晶鋳型設計を志向した Bt 菌由来 Cry1Aa の構造解析

○田中潤子[1]・安部聡[1]・早川徹[2]・上野隆史[1]（[1]東工大院生命理工、[2]岡山大院ヘルスシステム統合科学研究科）

Full-length structure analysis of Cry1Aa from *Bt bacteria* for designing in-cell protein crystal template.

(Graduate School of Life-Science and Technology, Tokyo Institute of Technology[1], Graduate School of Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama University[2]) TANAKA, Junko[1]; ABE, Satoshi[1]; HAYAKAWA, Tohru[2]; UENO, Takafumi[1]

序論　天然には、細胞内で自律的に結晶化し、様々な機能を発現する細胞内タンパク質結晶が存在する。これらは、高い安定性を有することから、近年、機能性分子を結晶内に固定化するための鋳型として注目されている[1]。これまで、酵素との共発現や融合化による固体触媒の合成は報告されているものの、ランダムな内包や限定された空間内への固定化のため、内包可能なタンパク質は限られている。そこで、バチルスチューリンゲンシス(Bt 菌)で結晶化する Cry1Aa に着目した（図 1a)。1180 残基からなる Cry1Aa は 7 つのドメインを有し（図 1b)、C 末端側の 4 つのドメインにある複数のシステイン残基が分子間ジスルフィド結合を形成することによって結晶を安定化していると考えられている。しかし、全長構造は C 末端ドメインのシステイン残基をアラニンに置換した Cry1Ac 変異体でのみ決定されており、依然としてジスルフィド結合形成による安定化機構は不明である[2]。そこで、システインを有する野生型 Cry1Aa の構造を明らかにすることで、ドメイン置換による様々なタンパク質の固定化など、精密な分子設計につながると考えた。本研究では、Cry1Aa のジスルフィド結合を利用した細胞内複合結晶形成とその安定化を目指し、Bt 菌で合成した Cry1Aa 結晶の構造解析を試みた。

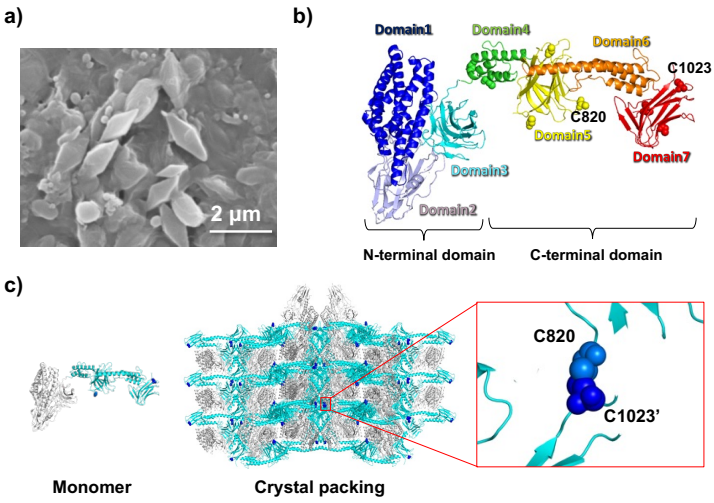


Figure1. (a) SEM image of Cry1Aa crystal. (b) Crystal structure of Cry1Aa. (c) Crystallization packing via disulfide bonds.

実験　Bt 菌を胞子形成培地へ植菌し、30℃で 3 日間振盪培養した。培養後の胞子と結晶の混合物を 80% Percoll による密度勾配遠心によって結晶を精製した。精製した結晶を SDS-PAGE と SEM、SPring-8 BL32XU での連続シンクロトロン回転回折法（SS-ROX）によりデータを収集した。

結果　Bt 菌から精製した Cry1Aa 結晶を、SDS-PAGE と走査電子顕微鏡（SEM）によって同定した。SEM 観察では、菱形の結晶が形成されていた（Fig.1a)。SPring-8 では、3.4Å の分解能データを収集し、構造解析に成功した。Cry1Aa の全長構造から、C 末端領域のドメイン 5 の C820 は隣接する分子のドメイン 7 の C1023 と分子間でジスルフィド結合を形成していることが明らかとなった(Fig.1b, 1c)。従って、Cry1Aa は N 末端ドメインを内包する形で C 末端ドメインがフレームワークを形成し、分子間ジスルフィド結合によって安定化していることが示唆された。(Fig.1c)。

References

[1] M. Kojima, *et al., Biomater. Sci*, **2022**, 10, 354-367
[2] A. Evdokimov, *et al., Protein Science,* **2014**, 23, 1491-1497

ケミカルプローブによるペルオキシソーム内脂肪酸分解経路の検出

○松尾祐治[1]・内之宮祥平[1]・永浦智樹[1]・王子田彰夫[1]（[1]九大院薬）

Fluorescent detection of peroxisomal fatty acid degradation activity in cultured cells using a chemical probe

(Graduate School of pharmaceutical Sciences, Kyushu University[1]) Matsuo yuya[1]; Uchinomiya Shohei[1], Nagaura Tomoki[1], Ojida Akio[1]

1. 緒言：β酸化とは脂肪酸を分解しATP生産に用いられるアセチルCoAを生産する重要なエネルギー代謝経路である。β酸化はミトコンドリアおよびペルオキシソームで起こり、ミトコンドリアβ酸化は短～長鎖脂肪酸を, 一方ペルオキシソームβ酸化は極長鎖脂肪酸および分枝鎖脂肪酸を分解する。我々はこれまでミトコンドリアβ酸化を蛍光検出するプローブを開発しており、本発表ではペルオキシソームβ酸化選択的な蛍光イメージングを可能とする新規プローブを報告する。このプローブは極長鎖脂肪酸部位を有しており、β酸化によりこの脂肪酸部位が分解されるとアルキンを有するキノンメチドを放出する。放出されたキノンメチドが周辺のタンパク質と反応し、その後ラベル化されたアルキンにクリック反応で蛍光色素を導入することで、ペルオキシソーム内のβ酸化活性を蛍光検出する事を可能にする。
2. 実験：プローブを肝臓がん細胞由来のHepG2細胞に添加し破砕後に蛍光色素を導入することで、細胞内タンパク質をラベル化しているかをin-gel蛍光解析によって評価した。また、このラベル化がペルオキシソームβ酸化選択的であることを確認するために、阻害剤で前処理した細胞でも同様の評価を行った。続いて、プローブを添加したHepG2細胞をパラホルムアルデヒド固定化後に蛍光色素を導入し、さらに免疫染色と組み合わせることで、プローブ蛍光の細胞内局在を同定した。
3. 結果及び考察：In-gel蛍光解析の結果、様々な分子量の細胞内タンパク質がラベル化されることが分かった。また、ペルオキシソームのβ酸化の阻害剤を添加したときはラベル化が抑制されたことから、このラベル化はペルオキシソーム内β酸化依存的に進行することが判明した。蛍光イメージングでは、ペルオキシソームとみられるベシクル状の蛍光が検出された。このプローブ蛍光は免疫染色により得られたペルオキシソームβ酸化関連タンパク質である ACOX1 の蛍光パターンと一致することから、本プローブはペルオキシソームβ酸化を検出していることが示唆された。さらに、ペルオキシソーム内β酸化活性化剤を細胞に添加したところ蛍光強度が増大したことから、ペルオキシソームのβ酸化活性の変動を検出する有用なツールになると期待される。

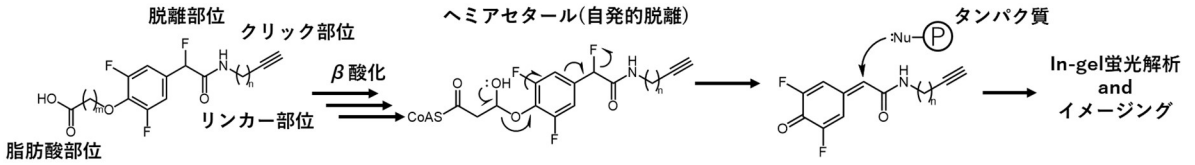


Figure1. sensing mechanism of FAO probe

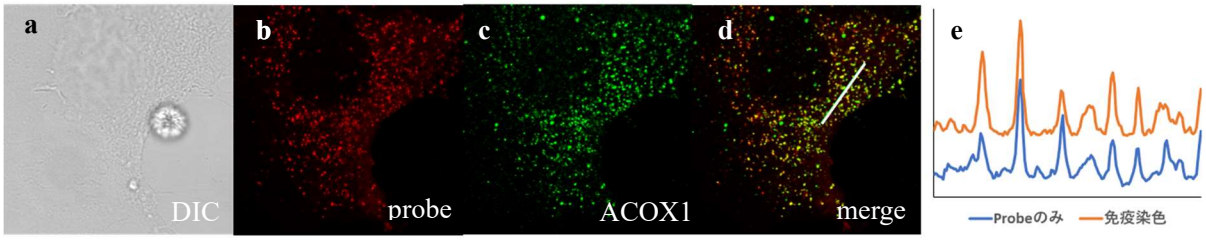


Figure2. Fluorescent colocalization images of our probe in HepG2 cells. Fluorescence microscope images of our probe (b: red channel), ACOX1 antibody (c: green channel) and merged images (d for b plus c). colocalization plot (e).

光反応を用いた細胞表層受容体の迅速なラベル化と インターラクトーム解析への応用

○末次春花、今村拓哉、善明直輝、田畑香織、内之宮祥平、王子田彰夫（九州大院薬）

Rapid Photoaffinity Labeling of Receptor Proteins on Cell Surface and Its Application of Interactome Analysis

(Graduate School of Pharmaceutical sciences, Kyushu University) Haruka Suetsugu; Takuya Imamura; Naoki Zenmyo; Kaori Tabata; Shohei Uchinomiya; Akio Ojida

1. 緒言：タンパク質を機能性分子でラベル化する技術はタンパク質の機能解析に必須である。従来は抗体やHaloタグなどのタンパク質タグなどが広く用いられているが、分子サイズが大きいため機能解析に影響を与える懸念がある。一方、当研究室では連続ヒスチジン配列(Hisタグ)とNi錯体間の選択的な相互作用を利用した、サイズの小さなタンパク質ラベル化法を開発してきた[1)]。本研究では、光反応基の利用による反応速度の大幅な向上と細胞表層での迅速なラベル化、およびタンパク質間相互作用を検出するインターラクトーム解析のための近位ラベル化への展開について検討した。

2. 実験：光反応基としてカルボン酸と反応するテトラゾール基を選択した。様々な構造のテトラゾール基と酢酸の反応をHPLCで解析し、細胞毒性が低い波長で励起可能かつ反応性が高いテトラゾール基を探索した。続いて、Asp残基を有するHisタグを導入したブラジキニン受容体(B2R)をHEK293T細胞表層に強制発現させ、テトラゾール基導入Ni 錯体を用いたラベル化を蛍光イメージングで検討した。さらに、最近インターラクトーム解析に用いられるIr錯体を、本手法を用いて細胞表層上の標的タンパク質にラベル化可能かを検討した。

3. 結果および考察：様々な構造のテトラゾール基の反応性を評価したところ、ナフタレンを有するテトラゾール基が細胞毒性の低い365 nmで励起可能、かつ酢酸と5分で定量的に反応することを見出した。続いて、この反応基と蛍光色素を導入したNi錯体を用いてタグ導入B2Rのラベル化を評価したところ、365 nmの光を1分間照射することでB2R発現細胞から選択的にNi錯体の蛍光を検出できたことから、細胞表層で標的タンパク質を迅速にラベル化することが可能であった。さらに、本手法を用いて近位ラベル化のためのIr錯体をタグ導入B2Rにラベル化可能であることも分かった。

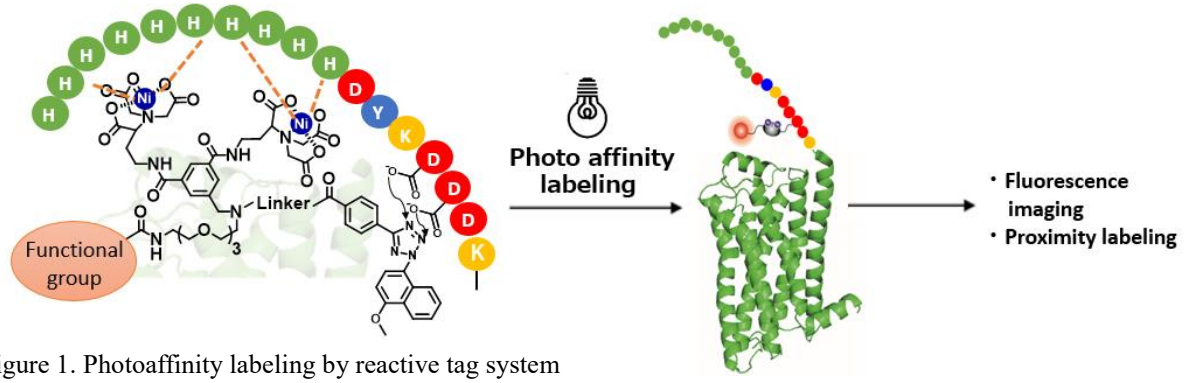


Figure 1. Photoaffinity labeling by reactive tag system

Reference 1) Naoki Zenmyo et. al., Bull.Chem.Soc.Jpn,2019,92,995-1000

血清アルブミンのキラル場を活用した触媒的不斉光反応：アントラセン誘導体の光環化二量化とその機構

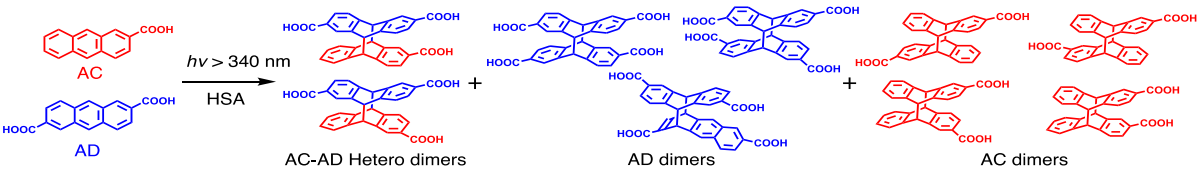
○西嶋　政樹[1]・河合　美咲[1]・豊岡　壮太[1]・藤城　祐也[1]・荒木　保幸[1]・森　直[2]・井上　佳久[2]・和田　健彦[1]（[1]東北大多元研、[2]阪大院工）

Catalytic photochirogenesis mediated by serum albumins: Mechanistic studies on enantiodifferentiating hetero-photocyclodimerization of anthracene derivatives (IMRAM, Tohoku Univ.[1], Osaka Univ. [2]) NISHIJIMA, Masaki[1]; KAWAI, Misaki[1]; TOYOOKA, Sota[1]; FUJISHIRO, Yuya[1]; ARAKI, Yasuyuki[1]; MORI, Tadashi[2]; INOUE, Yoshihisa[2]; WADA, Takehiko[1]

【緒言】我々はこれまで、ヒト血清アルブミン（HSA）による 2-アントラセンカルボン酸（AC）[1-4] と 2,6-アントラセンジカルボン酸（AD）を基質とするエナンチオ区別光ヘテロ二量化（スキーム）を行い、AC-AD ヘテロ二量体だけでなく、HSA 存在下条件でしか得られない、ユニークなナフタレン環を有するスリップ型 AD ホモ二量体を、90%を超える高いエナンチオマー過剰率（ee）で得られることを報告してきた。この超分子不斉光反応系を実用的手法へと展開するために、触媒的反応への展開が期待されている。我々は、HSA を用いた AC の光ホモ二量化系を用い、バッチ型ではあるが触媒的反応系への展開が可能で得あることを既に報告した [5]。本発表では、より効率的合成法への展開を指向し、HSA を用いた AC-AD ヘテロ二量化系のフロー型触媒反応への展開を指向し、HSA に対する AC と AD の錯形成挙動、AC-AD ヘテロ二量化結果を指標に、フロー型触媒サイクル構築条件を詳細に検討した。

【結果・考察】本反応系において、フロー型触媒サイクルを達成するには、条件１．HSA に結合した基質のみが選択的に反応すること、条件２．光反応生成物が HSA から速やかに解離すること、条件３．生成物の解離後に新たな基質が効率的に取り込まれること、の 3 条件のクリアーが必要であると考えた。まず条件１に関しては、HSA に対する AC ならびに AD 各々の結合定数を算出し、超分子不斉光反応下で HSA に結合していないフリーAC と AD 濃度を算出し、この濃度条件下での光二量化反応を検討し、二量体はほとんど得られないことを見出した。続いて、HSA 内でヘリックスを挟んで隣接して取り込まれている AC と AD 間で初めて観測されたエキシトンカップリング型 CD スペクトルピークを指標に、条件２および３を検討した。光照射によりエキシトンカップリング型ピークが減少することから二量化反応の進行を定量的に観測し、減少分に相当する基質を再添加することにより、エキシトン型ピークは光照射前の強度にほぼ回復することを確認した。この結果は、フロー型触媒反応構築に求められる条件２および３いずれも満足することを示唆している。

これらの結果を踏まえ、実際にフロー型触媒反応を指向した、HSA をキラル反応場とする AC、AD 連続添加系での光反応を検討したので報告する。



Scheme. Supramolecular asymmetric photoreaction of AC and AD mediated by HSA.

References:
[1] M. Nishijima, T. Wada, T. Mori, T. C.S. Pace, C. Bohne, Y. Inoue *J. Am. Chem. Soc*. **2007**, *129*, 3478.
[2] D. Fuentealba, H. Kato, M. Nishijima, G. Fukuhara, T. Mori, Y. Inoue, C. Bohne *J. Am. Chem. Soc*. **2013**, *135*, 203.
[3] M. Nishijima, M. Goto, M. Fujikawa, C. Yang, T. Mori, T. Wada, Y. Inoue, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14082.
[4] M. Nishijima, T. Pace, C. Bohne, T. Mori, Y. Inoue, T. Wada *J. Photochem. Photobiol. A* **2016**, *331*, 89.
[5] M. Nishijima, H. Kato, C. Yang, G. Fukuhara, T. Mori, Y. Araki, T. Wada, Y. Inoue *ChemCatChem*, **2013**, *5*, 3237.

粘土ナノシート上に吸着させたペルオキシダーゼの酵素活性の評価

○佐藤勝哉[1]・追分悠太[1]・荒川京介[1]・嶋田哲也[1]・石田玉青[1,2]・高木慎介[1,2]（[1]都立大院都市環境、[2]都立大水素社会構築研究セ）

Research on enzyme activity of Peroxidase on clay nanosheets (Graduate School of Urban Environmental Sciences, Tokyo Metropolitan University[1], ReHES of Tokyo Metropolitan University[2]) SATO, Katsuya[1]; OIWAKE, Yuta[1]; ARAKAWA, Kyosuke[1]; SHIMADA, Tetsuya[1]; ISHIDA, Tamao[1,2]; TAKAGI, Shinsuke[1,2]

昨今、酵素を材料上に吸着させることで立体構造を制御し、酵素の機能を拡張しようとする研究が盛んに行われている。当研究室ではこれまでに合成サポナイト(スメクトン SA（Sap1.2)、クニミネ工業)の剥離体である、表面に負電荷を持った粘土ナノシートを用いて、数種類のタンパク質の吸着挙動およびその複合体の酵素活性を評価してきた。特に過酸化水素(H_2O_2)を特異的に分解する酵素、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)を Sap1.2 に吸着させた複合体は、HRP 単体では反応性が殆ど無いサイズの大きい過酸化物である *tert*-ブチルヒドロペルオキシド(TBHP)を基質に用いた場合に、Sap1.2 なしの状態に比べ、活性が大幅に向上することを見出した[1)]（Fig. 1)。この結果は粘土ナノシートが酵素の基質選択機能を制御できる可能性を示した。本研究では、粘土ナノシートの種類を拡張し、サポナイト、及びヘクトライトの剥離体を用いた。サポナイトには、Sap1.2 に加え負電荷密度の異なる粘土ナノシート Sap1.0、Sap1.4 (当研究室で合成、数字はそれぞれの負電荷の配列がヘキサゴナル配列であると仮定したときの平均負電荷間距離(nm)を表す)を用いた。またヘクトライトには、ラポナイト XLG(日本シリカ工業)、ルーセンタイト SWF(コープケミカル)を用いた。

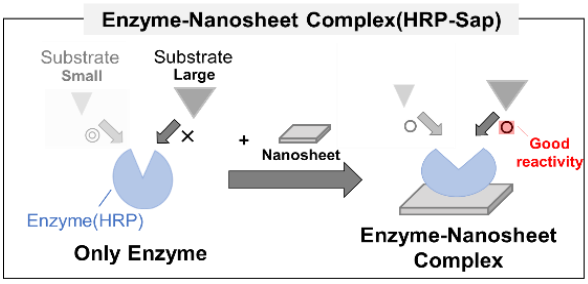


Fig. 1. Modification of substrate selectivity by enzyme-nanosheet complexation.

粘土ナノシート上へのタンパク質の吸着については、遠心分離法及び円二色性(CD)スペクトルを用いて確認した。また酵素活性については複合体の基質特異性を評価するため、サイズの異なる 3 種類の過酸化物、H_2O_2、TBHP、クメンヒドロペルオキシド(CHP)を用いた。その結果、いずれのナノシートに吸着させても、本来 HRP との反応性が高い H_2O_2 に対しては活性が低下した一方で、本来反応性が低いサイズの大きい過酸化物に対しては活性が向上した。また吸着させるナノシートの種類によって、それぞれ HRP-ナノシート複合体の活性が変化した。この理由はそれぞれのナノシートに吸着したときに HRP の構造が異なるためだと考えられる。そこで、酵素の立体構造を推測するため、HRP 中に含まれる芳香族アミノ酸の蛍光測定を行ったところ、吸着させるナノシートの種類によって、その蛍光強度が変化した。さらに、酵素の反応性と蛍光強度には相関があることが示唆された(Fig. 2) 。

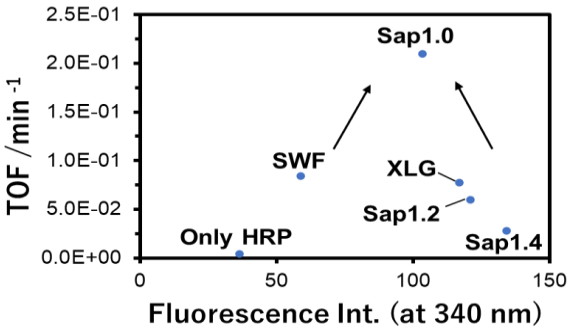


Fig. 2. Relationship between enzyme activity for cumene hydroperoxide as a substrate (Turnover number frequency (TOF), Vertical axis) and fluorescence intensity (horizon axis) of HRP adsorbed on each clay nanosheet.

1）T. Arai, M. Tabuchi, Y. Sato, T. Ishida, T. Shimada, S. Takagi, *Langmuir*. **2020**, *36*, 8384-8388.

カテプシンBとDの活性を同時検出するためのDNA修飾FRET型カテプシンプローブ

○芝野 佑哉・Zhang Zhengxiao・中田 栄司・森井 孝（京大エネ研）

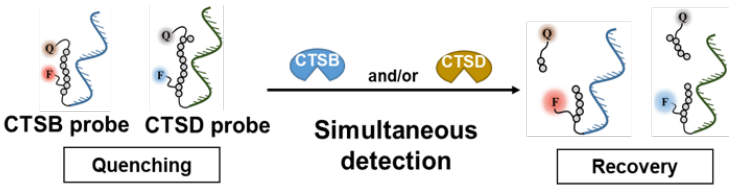
DNA-modified FRET-based cathepsin probes for simultaneous detection of cathepsin B and D activities

(Institute of advanced energy, Kyoto University) SHIBANO, Yuya; Zhang Zhengxiao; NAKATA, Eiji; MORII, Takashi

生物学的に重要な分子やイオンの濃度だけでなく、pHや温度などの環境因子の動的変化は、細胞内の化学反応を制御するために重要な役割を担っている。したがって、このような複数の因子の変化をプローブを用いて計測することは、細胞内化学反応と、それに伴う生物現象を理解する上で非常に重要である。リソソームの主要なシステインプロテアーゼであるカテプシンB（CTSB）は、リソソームにおけるタンパク質分解と細胞の恒常性維持に重要な役割を担っている。また、CTSB の活性の上昇は、様々な癌の進行に関連することが多く、潜在的な治療の標的となると考えられている [1)]。タンパク質分解過程におけるCTSBの相互作用をより詳細に理解するためには、局所pHやCTSBに関連する他の酵素の活性といった生理学的情報を同時に計測する必要がある。例えば、リソソーム内に普遍的に存在するアスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンD（CTSD）は、CTSBと複雑な関係を示す重要なプロテアーゼの1つである [2)]。CTSBとCTSDの活性の相関を明らかにするためには、それぞれのカテプシン活性を同時に計測する必要がある。

本研究では、CTSBとCTSDのペプチド基質（CtBsub, CtDsub）[3, 4)]を区別できるFRET型の蛍光色素と消光剤を組み合わせて修飾し、FRET効率の変化によりCTSBおよびCTSDの活性をそれぞれ特異的に計測できるように設計した。さらに、これらのカテプシンプローブにオリゴDNA（ODN）を結合させると、それぞれのカテプシンに対する反応性が飛躍的に向上した。これは、ODNを結合させることで疎水性の高い蛍光色素と消光剤で修飾したプローブの溶解性が改善されたためと考えられる。CtBsubとCtDsubにODNを結合させたプローブ（CtBsub-ODN1, CtDsub-ODN2）を用いることで同時に、それぞれの酵素活性を同時に計測することに成功した。

また、ODNの修飾によってプローブの反応性が向上するだけでなく、ODNとの相補鎖形成によってプローブを特異的な空間に配置することが可能になる [5)]。今後、これらのカテプシンプローブをpHプローブなどの他のプローブとともにDNAナノ構造体上に配置することにより、細胞内の特定の空間で複数の情報を同時に計測することを試みる。



1) N. Aggarwal *et al. Proteomics: Clin. Appl.* **2014**, *8*, 427–437.
2) G. Leto *et al., Clinical and Experimental metastasis* **2004**, *21,* 91-106.
3) M. Poreba *et al., Chem. Sci.* **2019**, *10*, 8461–8477.
4) Y. Yasuda *et al., J. Biochem.* **1999**, *126*, 1137–1143.
5) E. Nakata *et al., Chem. Sci.*, **2021**,*12*, 8231-8240.

14-3-3 阻害剤の探索と気孔開閉の化学的制御

○西山康太郎[1]・相原悠介[2]・中村咲耶[1]・鈴木健裕[1]・高橋宏二[2,3]・木下俊則[2,3]・堂前直[1]・佐藤綾人[3]・萩原伸也[1,3]（[1]理研 CSRS、[2]名大理、[3]名大 WPI-ITbM）

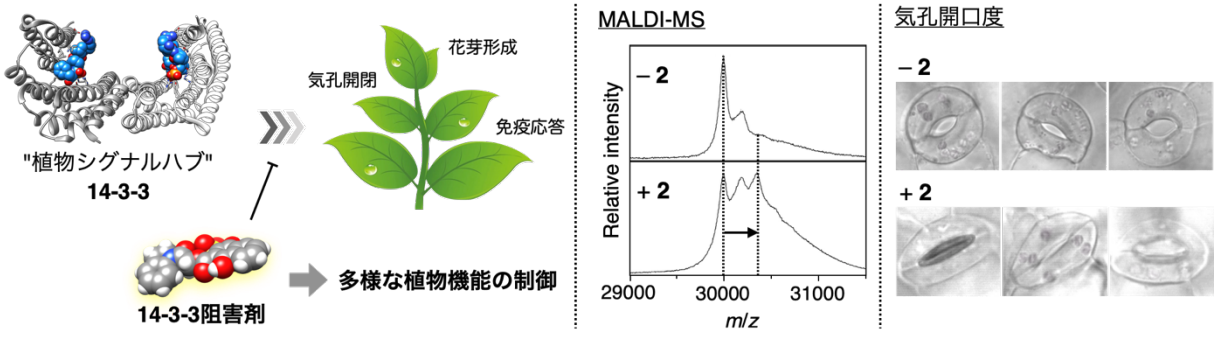
Discovery of a 14-3-3 Inhibitor and Chemical Regulation of Stomatal Movement (RIKEN Center for Sustainable Resource Science[1], Graduate School of Science, Nagoya University[2], WPI-ITbM, Nagoya University[3]) NISHIYAMA, Kotaro[1]; AIHARA, Yusuke[2]; NAKAMURA, Sakuya[1]; SUZUKI, Takehiro[1]; TAKAHASHI, Koji[2,3]; KINOSHITA, Toshinori[2,3]; DOHMAE, Naoshi[1]; SATO, Ayato[3], HAGIHARA, Shinya[1,3]

ヒトや植物などの真核生物がもつ 14-3-3 タンパク質は、100 種類以上のタンパク質と相互作用することで多様な機能を示す「シグナルハブ」である。植物では、気孔開閉や花芽形成など、様々な生理応答・発生・成長に対して多角的に関与している。そのため、14-3-3 を標的とした阻害剤は、投与する成長段階や器官に応じて、様々な効果を示す「植物ホルモン」のような薬剤になると期待できる。

本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナが持つ 14-3-3 を標的として、強力な阻害剤の探索と、気孔開閉の制御を行なった。まず、シロイヌナズナ 14-3-3 の一つである 14-3-3λ（ラムダ）に対して、約 5,000 化合物の中から阻害剤候補 **1** を選抜した。しかし、種々の検討の結果、化合物 **1** は阻害活性を持たず、DMSO 溶液中で保存されることで発生した化合物 **2** が、真の阻害活性種であることを突き止めた。合成・単離した化合物 **2** は、14-3-3λ に対して高い in vitro 阻害活性を示した（IC_{50} = 1.21 μM）。

続いて、阻害剤 **2** の阻害メカニズムを調べるため、質量分析や変異タンパク質を用いた解析を行なった。その結果、阻害剤 **2** は共有結合を介して 14-3-3 に結合し、アロステリックな阻害効果を示すことが示唆された。シロイヌナズナは、構造が酷似した 13 種類の 14-3-3 アイフォームを持つが、阻害剤 **2** の結合サイトはアミノ酸配列の保存性が低い。そこで、各種アイソフォームに対して阻害活性を評価したところ、最大 10 倍以上の選択性が確認された。本阻害剤は、各 14-3-3 アイソフォームが持つ固有の機能を解析・制御するためのケミカルツールとして期待できる。

最後に、阻害剤 **2** による気孔開閉の制御を試みた。14-3-3 は、青色光受容体フォトトロピンや、気孔開口の原動力となるプロトンポンプと相互作用することで、気孔開口を促進する。そのため、14-3-3 を阻害することで、気孔を人為的に閉じさせることができると期待した。シロイヌナズナの葉へ、阻害剤 **2** と、気孔を強制的に開口させる植物毒素フシコクシンを投与して、気孔開口度の変化を顕微鏡により観察した。その結果、阻害剤 **2** によってフシコクシンに打ち勝ち、気孔を閉じさせることに成功した。将来的に、気孔閉口作用によって耐病性や乾燥耐性を付与することで、農作物の安定生産や鮮度維持への応用が期待できる。



一塩基変異を完全識別する新規定量 PCR 法による KRAS 遺伝子変異及び SARS-CoV-2 変異株高感度検出

藤田亮祐・大石真衣・○藤井政幸（近畿大産業理工）

Highly Sensitive Detection and Identification of SARS-CoV-2 Variants by A Novel Quantitative PCR Completely Discriminating Single Point Mutation of *KRAS* (Faculty of Humanity Oriented Science and Engineering, Kindai University) Ryosuke Fujita, Mai Ohishi and Masayuki Fujii

一塩基多型(SNPs)や癌ドライバー遺伝子における一塩基変異の解析は個別化医療の基盤技術として重要性を増している。また、頻繁に変異を繰り返す SARS-CoV-2 の変異株を高感度に検出・同定する技術は感染防止対策やワクチン、治療薬開発において極めて重要である。しかしながら、現行の PCR 法では遺伝子中の一塩基変異を完全に識別して定量解析することは困難である。

本研究では化学修飾プライマーとプルーフリーディングポリメラーゼを利用して $KRAS^{wt}$ と $KRAS^{G12D}$, $KRAS^{G12A}$, $KARS^{G12V}$ を識別できる PCR 技術を開発することを目的として検討を行った。

結果として、フリーディングポリメラーゼと化学修飾プライマーの組み合わせによって、プライマー3’-末端と完全にマッチしたテンプレートのみが増幅され、$KRAS^{wt}$ と $KRAS^{G12D}$, $KRAS^{G12A}$, $KARS^{G12V}$ を完全識別できる定量 PCR が可能であることが示された。この PCR 法では一サンプル中テンプレート 10 コピーまで濃度依存的に増幅することが可能で、野生型遺伝子に 0.01%混在する変異型遺伝子を干渉されることなく完全に識別して定量的に検出できることも示された。

Table 1. Quantitative Detection KRAS Mutation by qPCR Using Chemically Modified Primers

Primers	Ct/Tg (35G)	Ct/Ta (35A)	Ct/Tc(35C)	Ct/Tt(35T)
POM2t	NA	NA	NA	24.77 ± 0.81
POM2c	NA	NA	25.95 ± 0.20	NA
POM2a	NA	22.67 ± 0.92	NA	NA
POM2g	25.41 ± 0.84	NA(G-T)	NA	NA

さらに、同 PCR 法を用いて SARS-CoV-2 のオミクロン株 BA.1、オミクロン株 BA.2、オミクロン株 BA.5 を高感度に検出し、同時に同定することに成功した。フォワード、リバース両プライマーの 3’-末端で一塩基変異が識別可能であり、下記の表のとおり、SARS-CoV-2 surface glycoprotein mRNA の 1355 および 1486 の 2 つの変異点を同時に識別することにより 3 種の変異株オミクロン株 BA.1、オミクロン株 BA.2、オミクロン株 BA.5 を検出・同定することに成功した。

Table 2. Detection of SARS-CoV-2 Variants by qPCR Using Chemically Modified Primers

Primers	o BA.5 (ΔCt)	o BA.1 (ΔCt)	o BA.2(ΔCt)
F1355BA5 R1486BA2	20.57±0.07	NA	NA
F1355o R1486BA1	NA	25.32±0.35	NA
F1355o R1486BA2	NA	NA	26.48±0.19

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

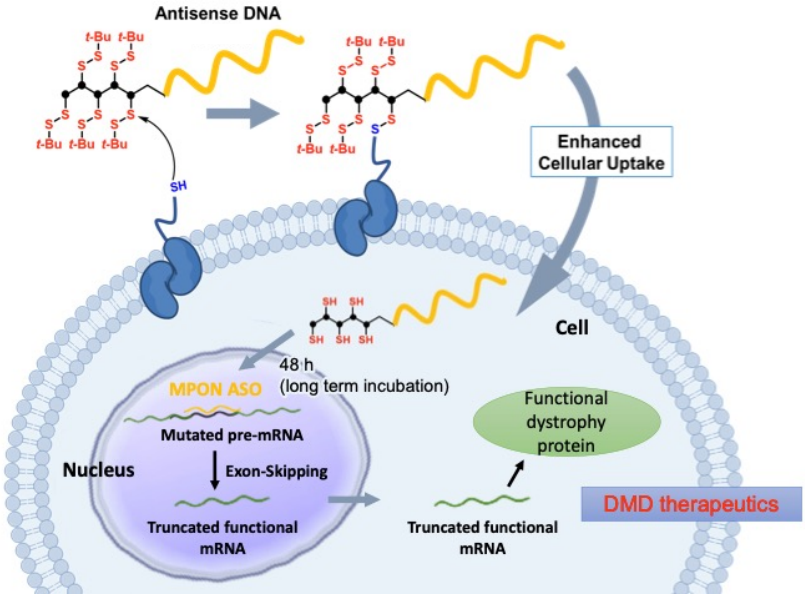
膜透過性核酸 MPON の核移行によるエキソンスキッピングの促進

○平岡陽花[1]・Zhaoma Shu[1]・Bao Tri Le[2]・益田恵子[3]・中本航介[1]・林光太朗[4]・阿部奈保子[1]・木村康明[1]・Rakesh N. Veedu[2]・清水義宏[3]・内田智士[5]・阿部洋[1, 3, 6]（[1]名大院理、[2]マードック大学、[3]理研、[4]ナノ医療イノベーションセンター、[5]京都府立医科大・医、[6]糖鎖生命コア研究所）

Membrane permeable oligonucleotide (MPON) modified with disulfide units induces efficient exon skipping through enhanced membrane permeability and nucleus transfer (Grad. Sch. of Sci., Nagoya Univ.[1], CMMIT, Murdoch Univ.[2], RIKEN[3], iCONM[4], Grad. Sch. of Med., Kyoto Pref. Univ. of Med.[5], iGCORE[6]) HIRAOKA, Haruka[1]; Zhaoma Shu[1]; Bao Tri Le[2]; MASUDA, Keiko[3]; NAKAMOTO, Kosuke[1]; HAYASHI, Kotaro[4]; ABE, Naoko[1]; KIMURA, Yasuaki[1]; Rakesh N. Veedu[2]; SHIMIZU, Yoshihiro[3]; UCHIDA, Satoshi[5]; ABE, Hiroshi[1, 3, 6]

核酸医薬の一種であるアンチセンス DNA は、mRNA や核内 DNA の相補配列に結合し、mRNA の分解やスプライシング制御を通じて異常タンパク質の産生を抑制する。配列依存的に作用するため特異性が高く副作用が起こりにくいのが利点である。その一方で、アンチセンス DNA と細胞膜の負電荷が互いに反発し合うため細胞導入効率が非常に低いことが課題となっている。

その解決策として、我々の研究室では、チオール基を持つ修飾構造をオリゴヌクレオチドに付加することで自発的かつ超高速に細胞内に導入できることを見出した [1)]。この修飾オリゴヌクレオチドを Membrane Permeable Oligo-Nucleotide の頭文字から MPON と呼称する。主要な導入経路であるエンドサイトーシスで見られるエンドソーム小胞および MPON を蛍光ラベルして観察したところ共局在が見られず、エンドサイトーシスを介さず直接細胞質へ導入されることが示唆された。一方で細胞膜上のチオール基をキャッピングすると導入効率が大幅に低下しており、MPON は膜タンパク質とジスルフィド結合を形成することで効率的に細胞内に取り込まれると考えられる。実際に、MPON と特異的に結合する膜タンパク質が複数発見されている [2)]。さらに、添加後 72 時間で核内へと移行していることが観察され、核内 DNA を標的とできる可能性が示された [2)]。そこで、筋ジストロフィーの原因となる変異 *dmd* 遺伝子を対象として、相補配列を持つアンチセンス核酸にチオール修飾を施した *dmd*-MPON を合成し疾患モデル細胞に導入した。その結果、対象領域のスプライシング阻害による変異配列の除去が実際に確認された [2)]。これは MPON を利用した有用な医薬品送達の実現可能性を示唆するものである。



1) Z. Shu et al., Angew. Chem. Int. Ed., 58, 6611-6615 (2019)
2) H. Hiraoka et al., ChemBioChem, 22(24), 3437-3442 (2021)

超巨大人工細胞における高効率な真核系遺伝子発現を指向した転写-翻訳共役系の開発

○高橋萌・小川敦司（愛媛大 PROS）

Development of a coupled *in vitro* transcription/translation system for highly efficient eukaryotic gene expression in supergiant artificial cells (Proteo-Science Center, Ehime University) TAKAHASHI, Hajime; OGAWA, Atsushi

【緒言】人工細胞は、現時点では、天然細胞の機能の一部を模倣する小胞のことを指し、リポソームなどのカプセルに特定の生体反応系を封入することにより作製できる。中でも、無細胞発現系を封入して構築される「遺伝子発現機構を模倣する（つまり、遺伝子発現能を有する）人工細胞」は、同封する発現遺伝子の種類によって多様な機能を発揮しうるため、注目が集まっている。しかし、既存の人工細胞のほとんどは、「原核無細胞系」が封入されているため、真核生物由来のタンパク質の発現には不適となる場合が多い。一方、我々は最近、原核から真核まで様々な生物種由来のタンパク質を合成可能である「小麦無細胞系」を、直径数 mm の超巨大リポソーム（SGUV）に封入することで、「真核系遺伝子発現能を有する超巨大人工細胞」を構築した [1]。しかし、真核無細胞系の中では発現活性が比較的高い小麦無細胞系であっても、バッチ反応におけるタンパク質生産性は原核無細胞系に比して低いため、人工細胞内における高効率発現は困難だった。そこで本研究では、小麦無細胞系で効率的に機能する「転写-翻訳共役系」を開発し、バッチ反応におけるタンパク質生産性を向上させることで、当該超巨大人工細胞における遺伝子発現効率の改善を試みた。

【実験】小麦無細胞系で転写と翻訳を効率良く共役させるために、「T7 RNA ポリメラーゼによる転写」と「クリケット麻痺ウイルス（CrPV）の内部リボソーム進入部位（IRES）媒介の翻訳」を選択した。なお、CrPV IRES は、当研究室において小麦無細胞系用に最適化した配列に改変した。実際の実験手順としては、初めに、mRNA 鋳型（CrPV IRES および黄色蛍光タンパク質（YPet）遺伝子をコード）を用いて、小麦無細胞基盤バッチ法におけるタンパク質合成（翻訳）を阻害しない転写-翻訳共役系の反応条件を調査した。次に、鋳型として mRNA の代わりに DNA（T7 プロモーター、CrPV IRES、YPet 遺伝子をコード）を用いて、転写-翻訳共役反応条件を最適化した。最後に、転写-翻訳共役系の最適条件下でのタンパク質合成活性が SGUV（＝超巨大人工細胞）内でも維持されるか確認した。

【結果】転写-翻訳共役系の最適条件下でのタンパク質生産性は、mRNA を鋳型とした従来のバッチ法に比して、約 9 倍上昇し、原核無細胞系に匹敵した。また、効率的な転写-翻訳共役反応に必要な最小の鋳型 DNA 濃度（2.5 nM）は、他の真核無細胞系基盤の転写-翻訳共役系における最大活性に必要な鋳型 DNA 濃度（30~50 nM）に比して極めて低く、当該鋳型 DNA 濃度下（2.5 nM）における生産性は、市販の小麦無細胞系（SP6 ポリメラーゼを用いた別の転写-翻訳共役系を使用）の約 80 倍高かった。さらに、本研究で開発した転写-翻訳共役系が超巨大人工細胞内部でも生産性を損なうことなく機能することを確認した（**Fig. 1**）[2]。

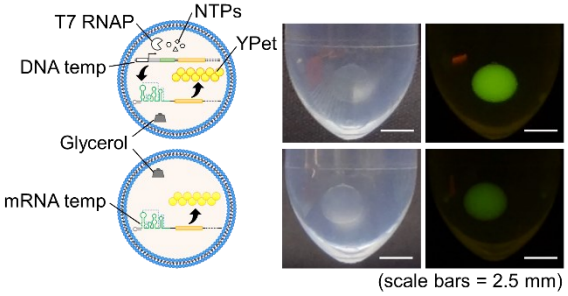


Fig. 1 転写-翻訳共役系と従来バッチ法における超巨大人工細胞（SGUV）内 YPet 遺伝子発現（写真各左: 可視光 image、各右: 蛍光 image）

1) *ACS Synth. Biol.* **2020**, *9*, 1608-1614.
2) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *52*, 128412.

カチオン性オリゴペプチドを基盤としたリボソーム RNA イメージングプローブの開発

○鈴木理志[1]・佐藤雄介[1]・富樫奈央[1+]・西澤精一[1]（[1]東北大院理）

Development of ribosomal RNA imaging probe based on cationic oligo peptides (Graduate School of Science, Tohoku University[1]) SUZUKI, Michiyuki[1]; YUSUKE, Sato[1]; TOGASHI, Nao[1]; NISHIZAWA, Seiichi[1]

核小体に豊富に存在する ribosomal RNA (rRNA)は様々な生命現象に密接に関連しており、その可視化（イメージング）技術は rRNA 機能解析に必要不可欠である。市販の rRNA イメージングプローブとして SYTO RNA-select が広く用いられているが、核に対して核小体選択性が低いことが課題である。これに対して本研究室では、benzo[*c,d*]indole 環含有モノメチンシアニンシアニン色素が RNA に対して明瞭な発蛍光応答を示し、生細胞における rRNA イメージングに適用しうることを見出している [1-3]。一方、本研究では、核小体で機能するタンパク質の多くが核小体内の生体分子と相互作用することによって核小体に局在していることに着目し、RNA 結合性ペプチドに基づく新規 rRNA イメージングプローブの開発を試みた。具体的には RNA 二重鎖に選択的に結合することが知られているカチオン性オリゴペプチドを RNA 結合部位として活用し、その N 末端を蛍光ラベル化したプローブを設計・合成し、その核小体イメージング機能ならびに RNA 結合能を評価した。

異なるアルキル鎖長の 1 級アミンを有するカチオン性アミノ酸(Dap, Dab, Orn. Lys)それぞれ 8 残基から成るカチオン性オリゴペプチドにグリシン及び 6-aminohexanoic acid スペーサを介して FITC を修飾した 4 種のプローブを固相合成により合成した(Fig.1 A)。次にヒト乳がん細胞(MCF7 細胞)を用いて各プローブの細胞内 RNA イメージング機能を評価した。その結果、固定化・膜透過処理した細胞において、いずれのプローブも既存プローブ（SYTO RNA-select）と比較して強い輝度および高い核小体選択性を有することを見出した (図 1B)。最も優れた核小体染色能を有する FITC-Dap$_8$ プローブを用いて核酸分解実験を行ったところ、観測された核小体由来蛍光はプローブと核小体内 RNA との結合に起因することが分かった。以上の結果から、プローブの優れた核小体イメージング機能発現はカチオン性オリゴペプチドによる RNA 結合能に起因することが示唆される。さらに、Dap8 ペプチドは他の蛍光色素(TAMRA, Cy5)に連結した場合でも優れた核小体イメージング能を示した。この結果は本プローブ設計が高い汎用性を示すとともに、Dap8 部位は人工の核小体局在化シグナル配列として機能しうることを示している。

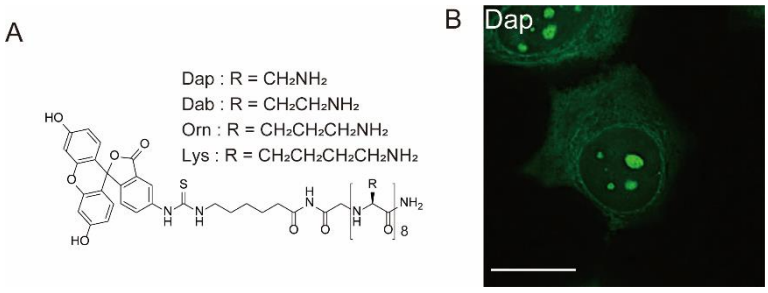


Fig. 1. (A) Chemical structures of probes, and (B) fluorescence image of fixed and permeabilized MCF7 cells stained with FITC-Dap$_8$. Scale bar : 15 μm.

1. Y. Yoshino, Y. Sato, S. Nishizawa, *Anal. Chem.*, **91**, 14254 (2019).
2. Y. Sato, Y. Igarashi, M. Suzuki, K. Higuchi, S. Nishizawa, *RSC Adv.*, **11**, 35436 (2021).
3. K. Higuchi, Y. Sato, N. Togashi, M. Suzuki, Y. Yoshino, S. Nishizawa, *ACS Omega*, **7**, 23744(2022).

光触媒修飾 DNA プローブを利用した核酸の光修飾法の開発

○山野雄平[1]・鬼塚和光[1,2]・佐々木まどか[2]・佐藤伸一[3]・永次史[1,2]（[1] 東北大多元研、[2] 東北大院理、[3] 東北大学際研）

Photo-Labeling of Nucleic Acid by Photo-Catalyst Tethered DNA Probe ([1]IMRAM, Tohoku University, [2] Graduate School of Science, Tohoku University, [3]FRIS, Tohoku University) YAMANO, Yuuhei;[1] ONIZUKA, Kazumitsu;[1, 2] SASAKI, Madoka; [2] SATO, Shinichi;[3] and NAGATSUGI, Fumi[1, 2]

核酸を位置選択的に化学修飾する方法の開発は、高機能な核酸材料や核酸医薬の創製につながるため、注目されている。核酸の修飾法としては、ポリメラーゼを利用して非天然のヌクレオチドを核酸配列中に導入する方法や、核酸合成装置を用いて機能性オリゴヌクレオチドを化学合成する方法が古くから知られている。しかし、これらの方法を用いて長鎖の核酸を部位特異的に化学修飾することは難しい。また、近年では DNA 構造体やメチルトランスフェラーゼなどを利用した mRNA の位置選択的な化学修飾も試みられているが、多くの場合、修飾には酵素や大量の DNA が必要となる。このことから、任意の長さの核酸を簡便に修飾するための新しい有機反応の探索が求められている。

これに対し、本研究では光酸化反応に基づく核酸修飾法の開発を目指した。これまでに蛋白質の修飾法として、光触媒を蛋白質の特定の部位に近接させ、限られた空間で光酸化反応を起こすことで部位特異的な化学修飾を実現している。[1] そこで、同様の設計を核酸の修飾に適応することを考えた。標的配列（Target-ODN）と相補的で光触媒が末端に導入された DNA プローブ（Cat-ODN1, Cat-ODN2）を合成した（Fig.1a, b）。これらのプローブと標的配列を二重鎖形成させた状態で光を照射すれば、光触媒近傍の核酸塩基が優先的に酸化を受け、この酸化体を標識試薬がトラップする形で修飾反応が進行すると期待した（Fig.1c）。標識試薬には蛋白質の光修飾に使用されるウラゾール系化合物の一種である AUra-N_3 を用いた。この標識試薬にはアジド基を導入しており、クリック反応によって様々な機能性分子を修飾できると考えた。本発表では、光触媒に Eosin と Ru 錯体（Fig.1b）を導入した DNA プローブを用いた結果について報告する予定である。

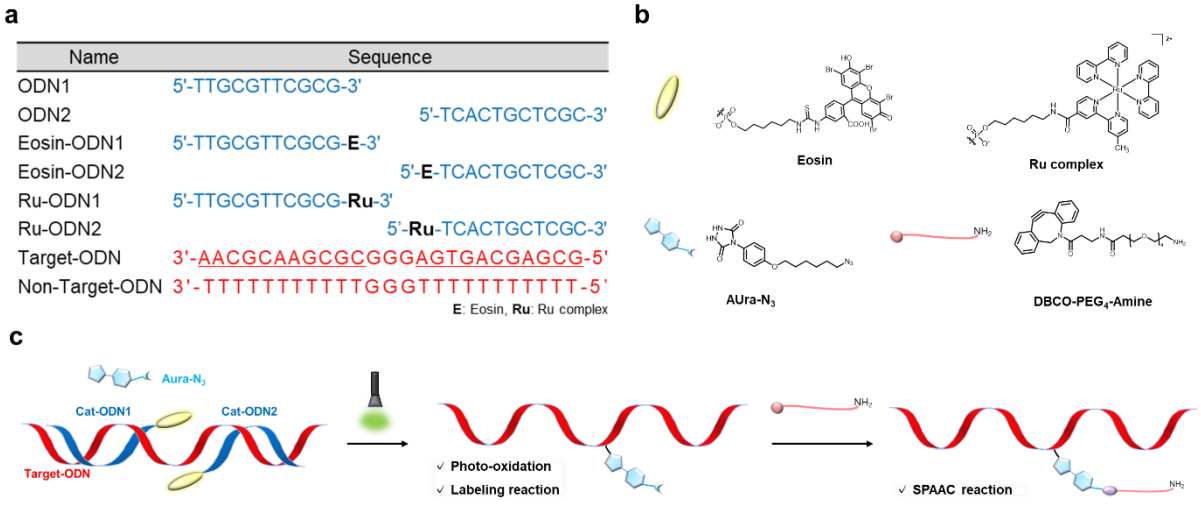


Fig. 1 (a) Sequences of ODNs, Eosin-ODNs, Ru-ODNs, Target-ODN and Non-Target-ODN. Target-ODN sequence can form duplex containing gaps with ODNs or Cat-ODNs. (b) Chemical structures of photo-catalysts (Eosin and Ru complex) and labeling reagent (AUra-N_3 and DBCO-PEG_4-Amine). (c) Schematic illustration of the photo-chemical labeling reaction. Target-ODN can be labeled with AUra-N_3 based on the photo-oxidation reaction; the addition of DBCO-PEG_4-Amine causes a secondary modification: SPAAC reaction.

1) K. Nakane, S. Sato, T. Niwa, M. Tsushima, S. Tomoshige, H. Taguchi, M. Ishikawa and H. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*, 7726–7731.

RNA シュードノット構造の安定性予測のための最近接塩基対モデルの検証

○遠藤玉樹[1]・Sagar Satpathi[1]・杉本直己[1,2]（[1]甲南大 FIBER、[2]甲南大 FIRST）

Validity evaluation of nearest-neighbor model in stem region of RNA pseudoknots (Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), Konan University[1], Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University[2]) ENDOH, Tamaki[1]; SATPATHI, Sagar[1]; SUGIMOTO, Naoki[1, 2]

我々の研究グループはこれまで、DNA や RNA といった核酸分子の安定性を、二重らせん構造中の隣り合った塩基対の組み合わせ（最近接塩基対）から予測できるエネルギーパラメータの取得を進めてきた[1)]。その結果、細胞内の分子夾雑環境にも適用できる二重らせん構造の安定性予測法を構築しつつある[2)]。さらに、二重らせん構造のみならず、任意の核酸構造の安定性予測に向けて得られているエネルギーパラメータを拡張していくことで、生命現象を左右し得る核酸構造の機能を、細胞内の分子環境などに依存した核酸の構造安定性と相関させて議論できるようになると考えられる。

RNA は、二次構造中のループやバルジといった領域が三次元的な相互作用を形成することで、様々な高次構造を形成する。その中でも、ループ領域と分子内の一本鎖領域との相互作用により形成されるシュードノット構造は、機能性 RNA の高次構造中に散見される基本構造である。シュードノット構造には 2 つの二重らせん形成領域が互い違いに存在するため、最近接塩基対からその安定性を予測できる可能性がある。しかしながらこれまで、RNA シュードノット構造に対して最近接塩基対に基づいた安定性予測のモデルを適用できるか否かの検証は行われてこなかった。本研究では、H タイプと呼ばれるシンプルなシュードノット構造をモデルとし、2 つの二重らせん形成領域のうち一方の領域に焦点を絞って熱安定性（Δ*G*°）を解析した。その結果、異なる配列であっても同じ最近接塩基対の組み合わせを有するシュードノット構造では、Δ*G*°の差（ΔΔ*G*°）が平均で 0.37 kcal/mol であった。この値は、異なる最近接塩基対の組み合わせを有するシュードノット構造間での ΔΔ*G*°よりも有意に小さかった。つまり、同じ最近接塩基対の組み合わせを有するシュードノット構造は同程度の熱安定性を示す。また、実験的に得られた熱安定性と、最近接塩基対に基づいて予測される RNA 二重らせん構造の熱安定性とに直線的な相関関係が見出された（Fig. 1）。このことは、最近接塩基対モデルによりシュードノット構造の安定性を予測できることを示している[3)]。本研究の成果により、シュードノット構造の安定性が、RNA 機能の発現にどの程度寄与するのかを定量的な数値として示すことができるようになると期待される。

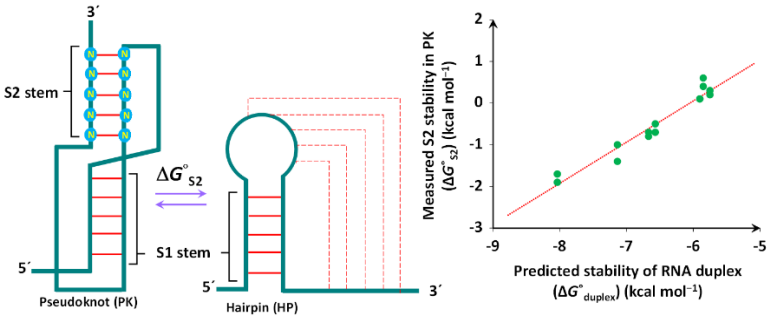


Fig 1. Linear correlation between stability of S2 stem in pseudoknot and duplex stability predicted by using nearest-neighbor model.

参考文献

1) S. Takahashi and N. Sugimoto, *Chem. Soc. Rev.*, **49**, 8439 (2020).

2) N. Sugimoto, T. Endoh, S. Takahashi and H. Tateishi-Karimata, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **94**, 1970 (2021).

3) S. Satpathi, T. Endoh and N. Sugimoto, *Chem. Commun.*, **58**, 5952 (2022).

SARS-CoV-2 由来 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの複製反応におけるグアニン四重鎖の効果とその制御

○高橋俊太郎[1]・松本咲[1]・建石寿枝[1]・KIM Byeang Hyean[2]・杉本直己[1,4]（[1]甲南大 FIBER、[2]POSTECH、[3]甲南大 FIRST）

Effect of guanine quadruplex and its regulation in replication reaction of RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 (Konan University[1], FIBER, POSTECH[2], Konan University, FIRST[3]) TAKAHASHI, Shuntaro[1]; MATSUMOTO, Saki[1]; TATEISHI-KARIMATA, Hisae[1]; KIM Byeang Hyean[2]; SUGIMOTO Naoki[1,3]

COVID-19 のパンデミックの克服は、現在の世界において緊急に解決すべき最重要課題である。SARS-CoV-2 のゲノム RNA は、ウイルスを検出し、治療するための有望なターゲットの一つである。グアニン四重らせん（G4）構造は様々な二次構造の中でもポリメラーゼによる複製反応を阻害する効果が高い[1,2]。そこで本研究では、SARS-CoV-2 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRp）の複製反応において、鋳型 RNA 鎖に形成された G4 の安定性と複製阻害について、異なる G4 の安定性を示すモデル配列を用いて定量的に解析した。その結果、G4 構造は SARS-CoV-2 の RdRp の複製反応を効果的に阻害することが明らかになった。そこで、実際の SARS-CoV-2 のゲノム配列の複製反応において、G4 形成による RdRp による複製阻害を検討した。SARS-CoV-2 のゲノム RNA 上には安定な G4 構造を形成する配列が存在しないため、ピレン修飾グアニントラクト（PyG3: 5'-[Pyrene-dU]-GGGTT-3'）を用いて分子間で G4 を誘導することで[3]、RdRp の複製阻害を検討した。PyGs による分子間 G4 形成でピレンの蛍光が増大することを利用し、標的配列のスクリーニングを効率的に行い（Fig. 1a）、SARS-CoV-2 の Nsp3 をコードする領域中にある G_3 を 2 ユニットと G_2 を 1 つ含む配列が PyG3 と分子間 RNA/DNA ハイブリッド G4 を効率的に形成できることを見いだした。実際、この標的配列を含む RdRp による RNA の複製は、PyG3 の添加により形成された分子間 G4 上で効果的に停止した（Fig. 1b）。さらに、上記ターゲット配列の 2 つの G_3 に効率津的に結合するタンデム型の G3 ピレン修飾核酸（5'-[Pyrene-dU]-GGGTTTGGGTT-3'）を開発することで、同配列での RdRp の複製反応をさらに効果的に抑制することができた。これらの知見は、RNA/DNA G4 形成を利用した COVID-19 の治療法として、新しいアプローチを提供するものである。

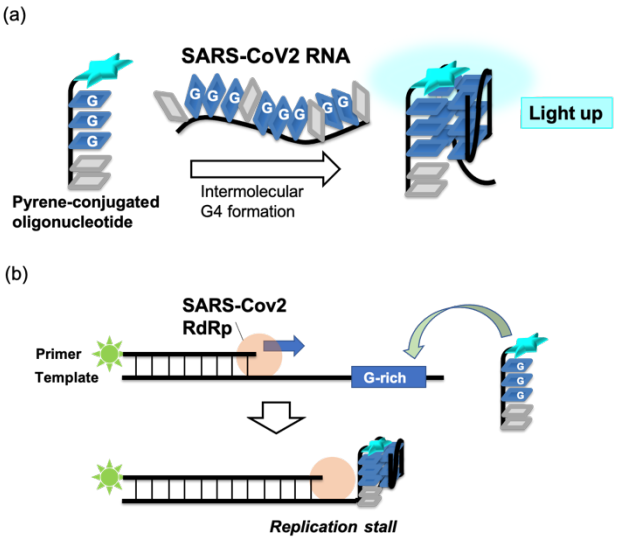


Fig. 1 (a) The detection of target sequences that form an intermolecular G4 with the pyrene-conjugated oligonucleotide. (b) The replication of SARS-CoV2 inhibited by the formation of the intermolecular G4 induced by the pyrene-conjugated oligonucleotide.

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

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

チミングリコール含有 DNA 二重鎖検出を指向したルマジン誘導体–シアニン色素コンジュゲートの開発

○高久慶秀[1]・佐藤雄介[1]・赤松憲[2]・西澤精一[1]（[1]東北大院理、[2]量研機構）

Development of lumazine derivative-cyanine dye conjugates for detection of thymine glycol containing DNA duplex. (Graduate School of Science, Tohoku University[1], National Institutes for Quantum Science and Technology[2]) TAKAKU, Yoshihide[1]; SATO, Yusuke[2], AKAMATSU, Ken[2], NISHIZAWA, Seiiti[1].

【序論】チミン塩基が放射線照射や酸化により生じるチミングリコール(Tg)と呼ばれる DNA 損傷塩基は老化やがんと密接に関連しており、その検出法の開発は重要な研究課題である。既存の検出法として、加水分解処理後に HPLC や GC-MS で検出する手法が報告されているが[1][2]、これらの手法は前処理操作が煩雑である点などの解決すべき問題を抱えている。

本研究では、新たな Tg 含有 DNA 二重鎖(Tg-DNA)検出を指向した分子プローブとして、Tg-DNA 選択的な結合能を示す蛍光性プローブの開発を試みた。具体的には Tg が DNA 二重らせん構造から飛びたしたフリップアウト構造をとること[3]に着目し、Tg 対面のアデニン塩基を選択的に認識しうるルマジン誘導体(DML)[4]とその近傍の二重鎖塩基対間にインターカレーションし蛍光応答を示すチアゾールオレンジ(Thiazole orange, TO)とを連結したコンジュゲート(DML-TO, Fig. 1)を設計・合成した。DML-TO の Tg-DNA に対する結合能および蛍光応答機能を評価するとともに、DML-TO を用いて Tg 切断を担う DNA 損傷修復酵素の機能阻害能を評価した。

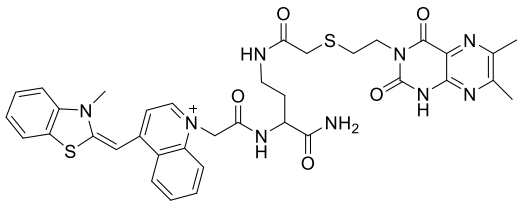


Fig. 1　Chemical structure of DML-TO.

【結果と考察】DML-TO は Fmoc 固相合成法によって合成し、逆相 HPLC により精製後、MALDI-TOF-MS によって構造を同定した。合成オリゴ Tg-DNA(21mer)に対するプローブ機能を評価したところ、DML-TO は結合に伴い TO 部位の蛍光強度が著しく増加した。この応答は Tg を含まないフルマッチ DNA 二重鎖と比べて大きいことから、DML-TO が Tg-DNA 選択性を持つことが分かった。さらに、蛍光滴定実験により、DML- TO は極めて強い結合能(解離定数 $K_d = 11 \pm 2.9$ nM ($N = 3$))を有することを見出した。以上の結果から、DML-TO は優れた Tg-DNA 検出プローブとして機能することが示唆される。

次に、Tg-DNA の強い結合能に着目し、これを利用することで Tg 修復酵素 EndonucleaseIII(EndoIII)の機能を阻害できないか検討した。その結果、DML-TO 濃度依存的に EndoIII の Tg 切断機能が低下することを見出した($IC_{50} = 1.9 \pm 0.35$ μM ($N = 3$))。これは、Tg-DNA に対して DML-TO が EndoIII と競合的結合することで EndoIIIによる Tg 認識を阻害したことに起因すると考えている。

[1] Frelon, S. *et. al., Chem. Res. Toxicol,* **2000**, 13, 1002–1010.
[2] Naritsin, D. B. *et. al.*, *Anal. Biochem*, **1996**, 241, 35–41.
[3] Hsiang Chuan *et al., J. Biol. Chem.,* **1997**, 272, 9227-9236.
[4] Yusuke Sato *et al., Chem. Commun.,* **2016**, 52, 14446-14449.

ゲノム操作に向けた超高速光架橋素子を含むオリゴ核酸を用いた長鎖 dsDNA 侵入法開発

○島原杏実[1]・渡部康羽[1]・Sethi Siddhant[1]・藤本健造[1]（[1]北陸先端大バイオ機能）

Development of long dsDNA penetration method using oligodeoxynucleotide containing ultrafast photo-cross-linking nucleoside for genome manipulation. (Japan Advanced Institute of Science and Technology [1])
SHIMABARA, Ami[1]; WATANABE, Yasuha[1]; SETHI,Siddhant[1]; FUJIMOTO, Kenzo

アンチジーン法は 2 本鎖 DNA に核酸プローブを結合させ、標的遺伝子の発現を抑制する方法である。1 本鎖の RNA に作用するアンチセンス鎖とは異なり、二重らせん構造を形成している 2 本鎖 DNA に作用させる。アンチジーン法の中でも Double-duplex invasion 法 (DDI 法) は二重らせん構造をした 2 本鎖 DNA に 2 本の核酸プローブを割り込ませ、標的の DNA と相補的に結合することで遺伝子発現を抑制する。この方法はワトソン・クリック塩基対を認識し、標的の DNA と結合する方法であるため、配列選択性が高く、標的配列の制限が少ないことが知られている。さらに、アンチジーン法以外に核酸検出にも応用が可能であり、新たなゲノム操作法として期待されている。DDI 構造を構築するためには、安定な 2 本鎖 DNA にプローブを割り込ませる必要があり、標的の DNA とプローブの高い親和性が求められる。また、プローブ同士の結合を抑制することも必要であり、これまで、様々な人工核酸が開発されてきた。しかし、結合の安定性や標的配列の制限、生体内環境との親和性など課題が多く残っている [1),2)]。

当研究室で開発された光架橋性人工核酸 3-cyanovinylcarbazole nucleoside（^{CNV}K）は、385 nm の光照射により相補鎖中のピリミジン塩基と共有結合を形成する [3)]。そのため、従来の手法に比べて安定した photoinduced-DDI (pDDI) 構造が形成されると考えられる。しかし、プローブ同士の光架橋も起きるため、その抑制が必要になり、先行研究では抑制素子として 5-cyanouracil (^{CN}U) が有用であることが明らかになっている [4),5)]。

本研究では、^{CNV}K と ^{CN}U を用いた pDDI の実用化を目指して、より長い 400 bp の DNA をターゲットとした pDDI 構造の形成を試み、光照射時間や当量などの検討を行ったので報告する。

1) J. Lohse, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 11804.
2) S. P. Sau, T. S. Kumarb, P. J. Hrdlicka, *Org. Biomol. Chem*., **2010**, 8, 2028.
3) Y. Yoshimura, K. Fujimoto , *Org. Lett*., **2008**, 10 , 3227.
4) S. Nakamura, H. Kawabata, K. Fujimoto, *Chemical Communications*, **2017**, 53, 7616.
5) K. Fujimoto, A Hirano, Y. Watanabe, A. Shimabara, S. Nakamura, *ChemBioChem*, **2021**, 22(24), 3402.

酸化損傷塩基 2-オキソアデニンを特異的に認識しシーケンシングを目指した新規人工核酸の開発

○宮原 涼[1]、谷口 陽祐[1]([1]九大院薬)

Development of novel artificial nucleic acids specifically recognizing and sequencing the oxidatively damaged base 2-oxoadenine in DNA (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University[1]) Ryo Miyahara[1], Yosuke Taniguchi[1]

【目的】DNA は生命情報を維持する極めて重要な生体高分子である。しかし、放射線・紫外線・化学物質などの外的要因や細胞の代謝過程で発生する活性酸素種などの内的要因により絶えず損傷を受けている。中でも酸化により損傷を受けた酸化損傷塩基は、DNA 複製の際に、塩基置換型の変異を誘発し非常に強い遺伝毒性を示す。この変異がある特定の配列および特定の位置で変異が生じ、修復されずに残存すると、がんや神経変性疾患などを発症すると考えられている。そのため、この発生位置を特定することができれば、疾患発生メカニズム解明及び治療・診断薬への展開が期待できる。しかしながら、既存の検出法では、損傷塩基の発生量を定量することはできるが、発生位置を特定することはできていない[1]。そこで、本研究では DNA 中の酸化損傷塩基の革新的な位置特定法の開発を目的とし、損傷塩基の一つである 2-オキソアデノシン（2-oxo-dA）を特異的に認識しシーケンシングを可能にする人工ヌクレオチドの開発を目指した。具体的には、図 1 に示すような酸化損傷塩基と相補的な水素結合形成可能な人工ヌクレオチドを化学合成し、酸化損傷塩基の DNA 配列中の発生位置を正確に特定することを検討した。

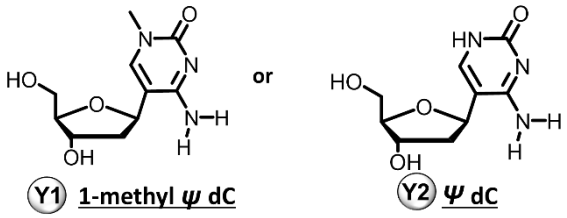


図1 人工ヌクレオチドの分子構造

【方法・結果】本研究では、2-oxo-dA を認識可能な分子として、その水素結合形成様式に着目して 2 種類の人工ヌクレオチド（1-methyl-ψdC、ψdC）を設計し合成を行った（図 1）。まず、2-oxo-dA へ選択性を評価するため、人工核酸と 2-oxo-dA をそれぞれ組み込んだオリゴヌクレオチドを調整し、溶解温度（T_m 値）を測定した。その結果、ψdC と 2-oxo-dA の T_m 値（57.1℃）は ψdC と非酸化体の天然塩基（dA）の T_m 値（48.8℃）よりも約 10℃高いことから、2-oxo-dA と非常に高い選択性で塩基対を形成することが明らかとなった。次に、人工核酸のトリリン酸体（1-methyl-ψdCTP、ψdCTP）を合成して、2-oxo-dA の相補的な位置に取り込まれるのか評価を行った。DNA 合成酵素として Klenow Fragment を用い、2-oxo-dA を含む鋳型鎖に対して、一塩基伸長反応を行った。反応液を変性ポリアクリルアミドゲルにアプライし、一塩基伸長したものと伸長していない FAM 標識プライマー鎖を分離し蛍光検出した。その結果、鋳型鎖の 2-oxo-dA に対してのみ伸長反応が進行し、その他の核酸を含む鋳型鎖に対しては伸長反応がほとんど進行しなかった。従って、今回新たに合成した 2 種類の人工ヌクレオチドが DNA ポリメラーゼの基質となり、2-oxo-dA の相補的な塩基として認識されていることを示している。さらに、2-oxo-dA 位置特定法の開発に向けて、dNTP 共存下で伸長反応を行った結果、シーケンシングが可能な予備的な結果が得られた。

本発表では、新規ヌクレオチド誘導体の開発とその機能性評価について報告する。

参考文献 1) T. Hofer, et al., Biol. Chem., 387, 2006, 103-111, etc.

Poster Session

Mon. Sep 12, 2022 3:20 PM - 4:20 PM JST | Mon. Sep 12, 2022 6:20 AM - 7:20 AM UTC | Online Site B Online Streaming

Poster Session (P169-P202)

[P169] Development of α-TFOs capable of recognizing C-G and T-A base pairs

*Yuya Okawara[1], Gaohang Tu[1], Jijun Liang[1], Akihiro Ohkubo[1] (1. Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[P170] Development of identification method of Chemical modification in mRNA

*Sana Ohashi[1], Fumitaka Hashiya[2,3], Hiroshi Abe[1,2,3,4] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Material Science, Nagoya University, 3. CREST, Japan Science and Technology Agency, 4. Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya University)

[P171] Development of uracil specific ultrafast photo-cross-linking reactions for RNA FISH in cell

*Eita Satonaka[1], Yasuyuki Narita[1], Jun-ichi Mihara[1], Siddhant Sethi[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P172] In situ detection of point mutation in tumor cell block specimens by monitoring single-molecule fluorescence blinking

*Shuya FAN[1], Jie XU[1], Yasuko OSAKADA[1,2], Katsunori HASHIMOTO[3], Kazuya TAKAYAMA[4], Atsushi NATSUME[4,5,6], Masaki HIRANO[4,7], Atsushi MARUYAMA[8], Mamoru FUJITSUKA[1], Kumi KAWAI[9], Kiyohiko KAWAI[1] (1. SANKEN, Osaka University, 2. IACS, Osaka University, 3. Dept. of Med. Sci., Shubun University, 4. Craif. Inc., 5. Institute of Innovation for Future Society, Nagoya University, 6. Dept. of Neurosurgery, Kawamura Medical Associate Hospital, 7. Div. of Molecular Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute, 8. Dept. of Life Sci. and Technol, Tokyo Institute of Technology, 9. Dept. of Health and Nutrition, Shubun University)

[P173] Novel mothod of DNA ligation and library construction using chemically modified primers

*Kohei Nomura[1], Kaoru Onda[1], Daisuke Suzuki[1], Hirotaka Murase[1], Masahito Inagaki[1], Haruka Hiraoka[1], Naoko Abe[1], Fumitaka Hashiya[2,3], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,2,3,4] (1. Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Material Science, Nagoya University, 3. CREST, Japan Science and Technology Agency, 4. Institute for Glyco-core Research (iGCORE))

[P174] Development of Novel Phosphate Prodrugs with Fluorophosphoramidate Group

*Yuki Yoshida[1], Ti Zheng[1], Wataru Tanabe[1], Fumiaki Tomoike[2,3], Fumitaka Hashiya[2], Shuto Hirota[4,5], Yuriko Saiki[4,5,6], Akira Horii[4], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,7,8] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Materials Science, Nagoya University, 3. Department of Life Science, Gakushuin University, 4. Tohoku University School of Medicine, Department of Molecular Pathology, 5. Tohoku University School of Medicine, Department of Investigative Pathology, 6. Tohoku University School of Medicine, Office of Medical Education, 7. JST CREST, 8. Institute for Glyco-core Research)

[P175] The system to release a small drug responding to miRNA

*Yasuhiro Tomida[1], Akimitsu Okamoto[1], Kunihiko Morihiro[1] (1. Faculty of Engineering, University of Tokyo)

[P176] Site-specific C->U deamination using photo-cross-linkable probe for RNA editing applications

*Siddhant Sethi[1], Eita Satonaka[1], Kei Sakuma[1], Shu Kawazoe[1], Kenzo Fujimoto[1] (1. Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P177] Ultrafast photo-cross-linkabe oligodeoxynucleotides probes for quantitative detection of RNA detection

*Yuki Hirano[1] (1. Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P178] Regulation of ligation and amplification of oligonucleotides using 3' exonuclease III

*Koki Maruyama[1], Aoma Yoshida[1], Saaya Akazawa[1], Yu Miyazaki[1], Akihiro Ohkubo[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

[P179] A Modified Photo-induced Memory System Using Ultrafast Photo-cross-linker

*ZUMILA HAILILI[1], SETHI SIDDHANT[1], SHIGETAKA NAKAMURA[1], KENZO FUJIMOTO[1] (1. Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

[P180] Simultaneous fluorescence detection of multiple microRNAs

*Yunsong Xu[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

[P181] Synthesis and evaluation of tetraphosphate nucleoside analogs for polymerase substrate

*Mayu Nakamura[1], Masahito Inagaki[1], Fumitaka Hashiya[2,3], Yasuaki Kimura[1], Hiroshi Abe[1,2,3,4] (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Nagoya University, 2. Research Center for Material Science, Nagoya University, 3. CREST, Japan Science and Technology Agency, 4. Institute for Glyco-core Research, Tokai National Higher Education and Research System)

[P182] Protein Modification with solvatochromic fluorophore using reactive oligodeoxynucleotides-Effects of substituents on modification and properties of fluorophores-

*Mariko Aso[1], Yixuan Liu[1], Takuma Dozono[1], Kaori Tabata[1], Yukiko Abe[1] (1. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyusyu University)

[P183] A study on energy transfer between a fluorophore and a metal complex by using DNA.

*Azuma Hidenori[1], Hiroyuki Asanuma[1], Hiromu Kashida[1] (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University)

[P184] Mechanistic aspects for the modulation of scaffolded enzyme activity on DNA scaffold

*Peng Lin[1], Eiji Nakata[1], Masahiro Kinoshita[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

[P185] Development of methods to control the interactions between C9orf72-derived repeat RNA and peptides

*Hisae Tateishi-Karimata[1], Tatsuya Ohyama[1], Saki Matsumoto[1], Shigenori Tanaka[2], Naoki Sugimoto[1,3] (1. Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER) Konan University, 2. epartment of Computational Science, Graduate School of System Informatics, Kobe University, 3. Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University)

[P186] Chemically Enhanced Stability of 2D and 3D DNA Origami Nanostructures

*KiranKumar Krishnamurthy[1], Arivazhagan Rajendran[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

[P187] Construction of the packed state of enzymes in 3D DNA scaffold

*Mei Nakabayashi[1], Peng Lin[2], Eiji Nakata[2], Takashi Morii[2] (1. Graduate School of Energy Science, Kyoto University, 2. Institute of Advanced Energy, Kyoto University)

[P188] Cancer-Selective Cytotoxicity through RNA Hairpin Technology

*Shunto Morita[1], Kunihiko Morihiro[1], Akimitsu Okamoto[1] (1. School of Engineering, The University of Tokyo)

[P189] Kinetic analysis of a *trans*-acting VS ribozyme affected by spermine and metal ions

*Yuki Miyazaki[1], Shigeyoshi Matsumura[1,2], Yoshiya Ikawa[1,2] (1. Graduate School of Pharma-Medical Science, University of Toyama, 2. Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama)

[P190] Functional analysis of the parental ribozyme-related RNAs obtained during experimental evolution

*Sho Noguchi[1], Kaishu Terada[2], Motochika Ehara[2], Yoshiya Ikawa[1,2], Shigeyoshi Matsumura[1,2] (1. Graduate School of Pharma-Medical Sciences, University of Toyama, 2. Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama)

[P191] DNA Origami as a scaffold to assemble membrane proteins on an artifical compartment

*Shiwei Zhang[1], Eiji Nakata[1], Takashi Morii[1] (1. Kyoto university)

[P192] Development of multidrug-integrated mini-nucleic acid drugs for effective chemotherapy of refractory cancer

*Ryosei Komiyama[1], Kunihiko Morihiro[1], Akimitsu Okamoto[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)

[P193] Rapid HPLC electrochemical detection of labelled Leu and Ile

Uehara Akuri[1], Taiki Mori[1], Midori Nagase[1], *Kenji Yokoyama[1] (1. School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology)

[P194] Characterization of Lysozyme Aggregation by monitoring Forward Static and Dynamic Light Scattering

*Takashi Wakamatsu[1], Makoto Ogata[2], Hidenori Ue[3] (1. Ibaraki KOSEN, 2. Faculty of Food and Agricultural Sciences, Fukushima University, 3. Fukushima KOSEN)

[P195] Subcellular localization of avermectin during morphological differentiation in *Streptomyces avermitilis* using Raman microspectroscopy

*Shumpei Horii[1,2], Mahiro Ando[3], Takuji Nakashima[3], Ashok Zachariah Samuel[3], Yoko Takahashi[3], Haruko Takeyama[1,2,3,4] (1. Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 2. Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory, AIST-Waseda University, 3. Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University, 4. nstitute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

[P196] Raman spectroscopic analysis of Soybean related microbes for metabolite based screening

*Shunnosuke Suwa[1], Masahiro Ando[2], Nakashima Takuji[2], Shumpei Horii[1,3], Atsuko Matsumoto[2], Toyoaki Anai[4], Haruko Takeyama[1,2,3,5] (1. Graduate school of Advanced Science and Engineering, Waseda University, 2. Research organization for Nano and Life Innovation, 3. Waseda University Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory, 4. Graduate school of Agriculture, Kyushu University, 5. Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University)

[P197] Development of envelope-binding fluorescent probes for virus detection

*Yusaku Hatanaka[1], Yusuke Sato[1], Shion Osana[2], Ryoichi Nagatomi[2], Seiichi Nishizawa[1] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. Graduate School of biomedical engineering, Tohoku University)

[P198] Measurement of microbial degradation of biodegradable polymer by QCM and electrochemistry

*Takuma Otsuki[1], Yasumasa Takenaka[2], Tomohiro Hiraishi[2], Hideki Abe[2], Noriyuki Asakura[1] (1. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. RIKEN CSRS)

[P199] 9-Cyano-10-tellurium-pyronin derivative as red light activatable Raman probe

*Minoru Kawatani[1], Spencer JOHN Spratt[2], Hiroyoshi Fujioka[3], Yasuteru Urano[3,4], Yasuyuki Ozeki[2], Mako Kamiya[1] (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institution of Technology, 2. Graduate School of Engineering, University of Tokyo, 3. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 4. Graduate School of Medicine, University of Tokyo)

[P200] Encapsulation and Release of Lipid Vesicles into and from Pores of Anodized Aluminum Oxide toward Development of Exosome Analysis

*Masahiro Okada[1], Yusuke Sato[1,2], Tetsuji Itoh[3], Seiichi Nishizawa[1] (1. Graduate School of Science, Tohoku University, 2. JST PRESTO, 3. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

[P201] Development of activity-based fluorescent probes for tissue-clearing-based imaging

*Bo Yi[1], Daichi Sakamoto[1], Iori Tamura[1], Yutaro Saito[1], Naoki Yamada[1], Shimpei Kubota[2], Kazuki Tainaka[3], Shinsuke Sando[1] (1. Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 2. Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, 3. Brain Research Institute, Niigata University)

[P202] Construction and evaluation of Quenchbody made with a pro-parallel coiled-coil peptide pair

*Takanobu Yasuda[1], Kana Sasamoto[2], Tetsuya Kitaguchi[1], Hiroshi Ueda[1] (1. Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 2. Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology)

C-G, および T-A 塩基対を認識可能な α-TFO の開発

○大河原佑哉・Tu Gaohang・Liang Jijun・大窪章寛（東工大院生命理工）

Development of α-TFOs capable of recognizing C-G and T-A base pairs (Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) OKAWARA, Yuya; TU, Gaohang; LIANG, Jijun; OHKUBO, Akihiro

三重鎖形成核酸（TFO）は、二重鎖 DNA に結合して三重鎖を形成できる核酸である。この特性を利用し、TFO をゲノム DNA の標的部位と結合させることで、特定の転写過程を阻害しタンパク質発現の抑制が可能になる。しかし、TFO には、「ヌクレアーゼ耐性が低い」ことや、「結合できる配列に制限がある」ことなどの問題点がある。

「ヌクレアーゼ耐性が低い」という課題を解決するため、本研究では α-ヌクレオチドを使用した。α-ヌクレオチドは、天然の β-ヌクレオチドと比較してリボース 1'-位の立体化学のみが異なるヌクレオチドである（図 1）。β-および α-オリゴヌクレオチドの核酸分解酵素耐性を比較すると、複数のヌクレアーゼに対していずれも α-オリゴヌクレオチドが数十倍高い耐性をもつことが報告されている [1]。

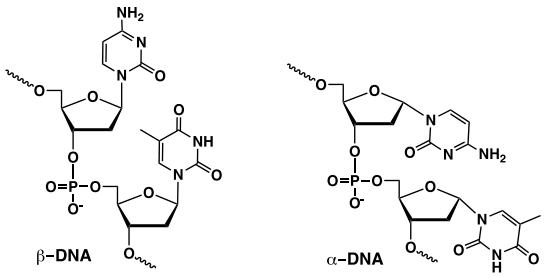


図 1

一方、結合できる配列をホモプリン-ホモピリミジン配列から拡張するため、当研究室では C-G 塩基対を認識できる ^{g}C[2) 3)]、T-A 塩基対を認識できる $^{7DA}Q_{Ac}$[4)]を含んだβ-TFO を過去に開発している(図 2)。そこで、本研究では、ヌクレアーゼ耐性の高い α-TFO に ^{g}C、または $^{7DA}Q_{Ac}$ を含む α-ヌクレオシドを導入し、それらの三重鎖形成能、および塩基識別能を三重鎖融解温度測定によって評価した。

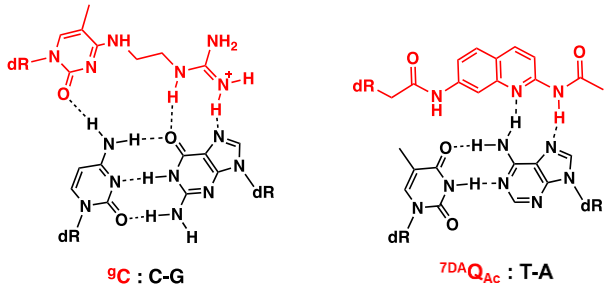


図 2

その結果、α-TFO に導入した α-^{g}C は C-G 塩基対を、α-$^{7DA}Q_{Ac}$ は T-A 塩基対を選択的に認識することが明らかになった。また、本発表では、α-^{g}C 、または α-$^{7DA}Q_{Ac}$ の前後配列の変化が、三重鎖形成能、および塩基識別能におよぼす影響についても、詳細に報告する。

[1] Vichier-Guerre, S., et al. *Antisense Res. Dev,* **1994,** 4:9-18

[2] Semenyuk, A., et al. *Biochemistry.,* **2010,** *49,* 7867-7878

[3] Ohkubo, A., et al. *Nucleic Acids Res.,* **2015,** *43,* 5675-5686

[4] Ohkubo, A., et al. *Bioorg. Med. Chem,* **2020,** *28,* 115350

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

mRNA の化学修飾位置の特定技術の開発

○大橋咲南[1]・橋谷文貴[2,3]・阿部洋[1,2,3,4]（[1]名古屋大院理、[2]物質科学国際研究センター、[3]CREST, 国立研究開発法人科学技術振興機構、[4]iGCORE, 糖鎖生命コア研究拠点）

Development of identification method of Chemical modification in mRNA (Graduate School of Science, Nagoya University[1], Research Center for Material Science, Nagoya University[2], CREST, Japan Science and Technology Agency[3], Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya University[4]) OHASHI, Sana[1]; HASHIYA, Fumitaka[2,3]; ABE, Hiroshi[1,2,3,4]

従来の mRNA 医薬品における課題は、生体内安定性やタンパク質翻訳能の低さにある。mRNA の安定性を改善するため、糖部に化学修飾を導入した mRNA が開発されている。しかし、mRNA に化学修飾を導入すると、タンパク質を合成するリボソームが mRNA を認識しづらくなり、翻訳能が低下することが知られている。これまでの研究より、mRNA における化学修飾の導入位置がタンパク質翻訳能に影響を与えていることが示唆された (*Angew. Chemie Int. Ed.*, 2020)。このことより、mRNA 上の化学修飾位置を最適化することで高い安定性と翻訳能を有する mRNA の設計が可能になると期待される。

修飾位置を最適化するためには、安定性と翻訳能の高い修飾 mRNA を網羅的に探索・選別し、その後、RNA 配列解析技術により修飾導入位置を特定する必要がある。しかし、一般的な RNA 解析では RNA を DNA に逆転写してから、配列解析を行うため、逆転写の際に RNA 糖部の修飾情報が失われてしまい、修飾位置を特定することは困難である (図 1a)。

そこで、mRNA 中の 2′-フルオロ (F) などの糖部修飾塩基の導入位置を特定する技術の開発に取り組んだ。本実験では、mRNA 上の修飾位置を特定するため、4-チオウリジン (4sU) からシチジン (C) への化学変換を利用した。これにより、RNA を DNA に逆転写した後も修飾位置情報を塩基変換として残すことができる (図 1b)。4sU の塩基変換法として、RNA の生合成や分解速度を調べるために開発された 3 手法 (四酸化オスミウムと塩化アンモニウム (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017)、ヨードアセトアミド (*Nat. Methods*, 2017)、過ヨウ素酸ナトリウムとトリフルオロエチルアミン (*Nat. Methods*, 2018)) と新たに開発したジニトロフルオロベンゼンとメチルアミンの計 4 反応を試し、比較した。その結果、最も良い塩基変換効率を示した四酸化オスミウムと塩化アンモニウムを用いた反応では 4sU の 90%が C に変換され、配列解析によりその塩基変換を検出できた。さらに、4sU の糖部 2′位に F 修飾を導入した 2′-F 4sU に関しても化学処理による塩基変換効率を算出したが、その変換効率は 4sU と大きく異なっていた。本発表では、その詳細について発表する。

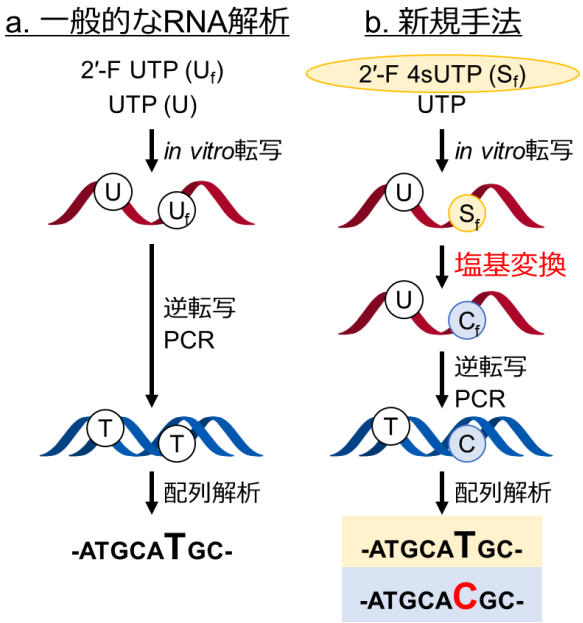


図 1 RNA 解析手法

細胞内RNA-光FISHに向けたウラシル特異的超高速光クロスリンク反応の開発

○里中彗伊太[1]，成田泰之[1]，三原純一[1]，Sethi Siddhant[1]，藤本健造[1]
（[1]北陸先端科学技術大学院大学・バイオ機能医工学研究領域）

Development of uracil specific ultrafast photo-cross-linking reactions for RNA FISH in cell

(Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology[1])
Eita Satonaka[1], Yasuyuki Narita[1], Jun-ichi Mihara[1], Siddhant Sethi[1], Kenzo Fujimoto[1]

ゲノム配列において，塩基配列が一塩基のみ変化した一塩基多型の存在が報告されている。また，遺伝子領域で生じた一塩基多型が転写されると，翻訳されたタンパク質の機能に変異が生じる。その結果，遺伝子疾患やウイルスの変異が引き起こされる可能性がある。そのため，遺伝病やウイルスの変異株を識別するためには，遺伝子領域の一塩基多型を正確に見分ける必要がある。

当研究室では，光で操作できる光架橋素子を開発している。DNA 鎖に組み込んだ光応答性人工核酸は必要とされる波長の光を照射されると，遺伝子内に存在する thymine や cytosine の pyrimidine 塩基と[2+2]光還化することで，位置，塩基選択的な光架橋反応を示す。当研究室では，光架橋素子を組み込んだ人工核酸 probe を用いた Fluorescence *in situ* hybridization (FISH 法)において，検出難度の高い領域である Eco360_K12，Eco360_P12 で染色された，大腸菌を標的とした二次構造を持つ RNA の解析を既に成功させている[1]。しかし，従来用いられていた光架橋素子 3-cyanovinylcarbazole nucleoside (^{CNV}K) はチミンとシトシンのどちらにも架橋する性質を持つため[2]，一塩基多型を正確に同定することが困難であった。また，^{CNV}K は光架橋に紫外光である 366 nm の光照射を必要とするため、細胞への光毒性が生細胞で使用する障害となっていた。

今回，DNA 中のチミン、RNA 中のウラシルにのみ選択的な光架橋を示す 4-methylpyranocarbazole nucleoside (^{MEP}K)の開発に挑戦した[3]。^{MEP}K は ^{CNV}K より塩基部分のπ共役構造を広げることで，紫外光である 366 nm よりも光毒性の弱い可視光の 400 nm で光架橋できるように設計している。^{MEP}K を有した核酸 probe を用いて RNA 中のウラシルを光架橋の有無で正確に見分けることにより，正確な細胞内 RNA-光 FISH が可能となるのではと期待している。

1. K. Fujimoto et al, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, *29*, 16, 2173.
2. Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett*., **2008**, *10*, 3227.
3. J. Mihara, K. Fujimoto, *Organic & Biomoleculer Chem*., **2021**, *10*, 1039.

1 分子 blinking 測定による腫瘍細胞病理切片上での点変異診断

○范姝亜[1]・徐潔[1]・小阪田泰子[1,2]・橋本克訓[3]・髙山和也[4]・夏目敦至[4,5,6]・平野雅規[4,7]・丸山厚[8]・藤塚守[1]・川井久美[9]・川井清彦[1]（[1]阪大産研、[2]阪大高等共創、[3]修文大医、[4]Craif、[5]名大未来社会、[6]河村病院、[7]愛知県がんセ、[8]東工大生理工、[9]修文大健）

In situ detection of point mutation in tumor cell block specimens by monitoring single-molecule fluorescence blinking (SANKEN, Osaka University[1], IACS, Osaka University[2], Dept. of Med. Sci., Shubun University[3], Craif. Inc.[4], Institute of Innovation for Future Society, Nagoya University[5], Dept. of Neurosurgery, Kawamura Medical Associate Hospital[6], Div. of Molecular Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute[7], Dept. of Life Sci. and Technol, Tokyo Institute of Technology[8], Dept. of Health and Nutrition, Shubun University[9]) FAN, Shuya[1]; XU, Jie[1]; OSAKADA, Yasuko[1,2]; HASHIMOTO, Katsunori [3]; TAKAYAMA, Kazuya[4]; NATSUME, Atsushi[4,5,6]; HIRANO, Masaki[4,7]; MARUYAMA, Atsushi[8]; FUJITSUKA, Mamoru[1]; KAWAI, Kumi[9]; KAWAI, Kiyohiko[1]

Electron could transfer along DNA over long distances attributable to the well-stacked π structure in DNA, which makes it possible to sensitively detect perturbations that disturb the π stacked structure by measuring electron transfer (ET) rate. When a single fluorophore-modified nucleic acid is excited by a laser, it may occasionally enter a non-emissive state called OFF state due to charge separation. Charge recombination returns it to the emissive ON state. Fluctuation between a bright ON state and a dark OFF state is called blinking (Fig. 1). By monitoring single-molecule fluorescence blinking, the lifetime of the charge-separated state can be determined as the duration of the OFF state (τ_{OFF}), while charge recombination rate is evaluated as $k_{ET} = 1/\tau_{OFF}$[1, 2]. In this study, we achieved point mutation detection in tumor cell block specimens by monitoring single-molecule fluorescence blinking.

We applied single-molecule fluorescence blinking measurement to detect IDH1-R132H mutation related to gliomas, which are the most malignant of the primary brain tumors. Probe DNA was designed to bind to wild-type IDH1 and mutant R132H RNA. We first hybridized the probe with synthetic RNA followed by immobilization on a glass surface. 2 times difference in τ_{OFF} was observed between the wild-type and mutation, which suggested the mutation was distinguishable by monitoring blinking. We next prepared cell block specimens from IDH1 wild-type mRNA-expressing and R132H mutant mRNA-expressing cultured cells and performed single-molecule blinking measurement. The blinking signals for individual molecules were successfully captured as fluorescence time traces (Fig. 2), suggesting that point mutation detection in cell blocks could be achieved by monitoring single-molecule fluorescence blinking[2].

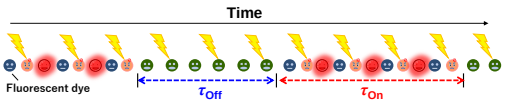


Fig 1. Schematic representation of blinking.

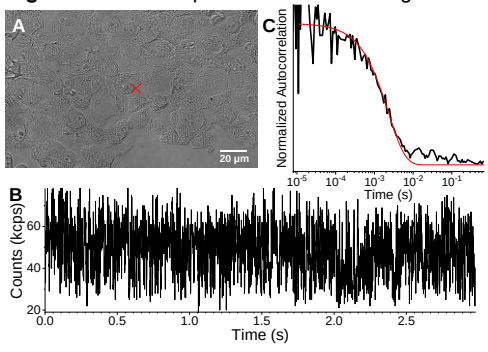


Fig 2. (A) One representative blinking signal captured in cell block specimen prepared from R132H mutant mRNA-expressing cultured cells. (B) Time trace of fluorescence signal obtained from the position shown in (A). (C) Autocorrelation analysis of the time trace.

1) K. Kawai, M. Fujitsuka, A. Maruyama, *Acc. Chem. Res.* **2021**, 54, 1001-1010
2) S. Fan, J. Xu, Y. Osakada, K. Hashimoto, K. Takayama, A. Natsume, M. Hirano, A. Maruyama, M. Fujitsuka, Kumi. Kawai, Kiyohiko. Kawai, *Chem*, accepted.

化学修飾プライマーを用いた新規 DNA 連結法とライブラリー構築

○野村浩平[1]・恩田馨[1]・鈴木大輔[1]・村瀬裕貴[1]・稲垣雅仁[1]・平岡陽花[1]・阿部奈保子[1]・橋谷文貴[2,3]・木村康明[1]・阿部洋[1,2,3,4]（[1]名大院理、[2]名大物質科学国際センター、[3]CREST,国立研究開発法人科学技術振興機構、[4]iGCORE,糖鎖生命コア研究拠点）

Novel method of DNA ligation and library construction using chemically modified primers (Graduate School of Science, Nagoya University[1], Research Center for Material Science, Nagoya University[2], CREST, Japan Science and Technology Agency[3], iGCORE, Institute for Glyco-core Research[4]) NOMURA, Kohei[1]; ONDA, Kaoru[1]; SUZUKI, Daisuke[1]; MURASE, Hirotaka[1]; INAGAKI, Masahito[1]; HIRAOKA, Haruka[1]; ABE, Naoko[1]; HASHIYA, Fumitaka[2,3]; KIMURA, Yasuaki[1]; ABE, Hiroshi[1,2,3,4]

長鎖 DNA の合成は合成生物学において重要な技術であり、精密かつ高収率での合成を達成する技術の開発が求められている。さらに、汎用性の高い DNA 合成技術は、抗体やタンパク質ライブラリーの作成、mRNA 医薬、遺伝子治療ベクターの開発にも応用できる。

目的の遺伝子配列を複数コードするような二本鎖 DNA を合成する際には、それぞれの遺伝子をコードした二本鎖 DNA 同士をつなぎ合わせるという手法が主に用いられる。一般的に、二本鎖 DNA 同士は、その断片に接着末端を形成させることで連結させる。しかし、既存の接着末端形成法は、酵素を用いたものが共通の戦略となっており、配列の自由度や連結効率が低い、接着末端の突出塩基配列が短い、連結部位の DNA 配列に変異が起こりやすいなどの課題がある。

そこで本研究では、これらの課題を克服すべく、化学的手法を用いた接着末端の形成を目的として、リン酸部に光分解性保護基を導入した核酸誘導体を開発した。DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長反応において鋳型鎖にこの修飾を導入すると、鎖伸長反応が保護基導入部位で停止することが明らかとなった (図 1)。これは保護基の立体障害により、ポリメラーゼの鎖伸長反応が阻害されるためだと考えられる。この現象を利用し、本保護基を導入したプライマーを用いて PCR を行うことで、任意の長さ・配列の接着末端が作成可能となり、その後の光照射により保護基を除去することで天然型の DNA 断片が得られた。実際にこの化学的手法を用いることで、酵素法よりも高い効率で DNA の連結に成功した。

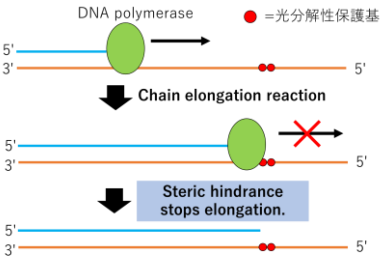


図1 化学修飾導入による鎖伸長反応の停止

さらに、本技術の応用として mRNA ライブラリーの構築を試みた。この mRNA ライブラリーは 5'-UTR と 3'-UTR にランダム配列を有する設計で、その構築にはランダム配列を有する二本鎖 DNA が鋳型鎖として必要となる。このような二本鎖 DNA は、一般的にはランダム配列を有するプライマーを用いた PCR により調製される。しかし、この方法の場合、ランダム領域に PCR をかけることになり、PCR のかかりにくい配列 (例 : GC 含有率の高い配列) はライブラリーから除かれてしまう。そこで本研究では、化学修飾 PCR プライマーを用いて調製した接着末端を持つ DNA 断片と、化学合成したランダム配列を有する DNA 鎖をアニーリングさせた後、連結反応を行うことで鋳型鎖 DNA を調製した (図 2)。この方法では、ランダム領域に対して PCR を使用せずに調製可能であるため、ライブラリーの多様性を維持できると考えられる。

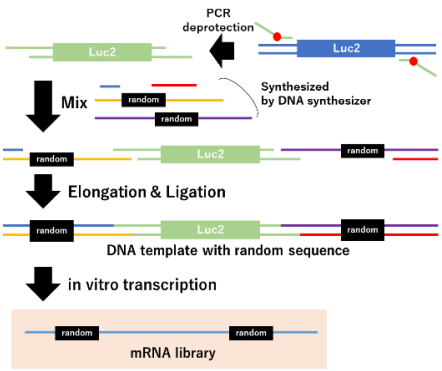


図2 本研究でのmRNAライブラリー構築法

フルオロリン酸アミデート基を用いた新規リン酸プロドラッグの開発

○吉田祐希[1]・Zheng Ti[1]・田辺航[1]・友池史明[2, 3]・橋谷文貴[2]・廣田嵩人[4, 5]・齋木由利子[4, 5, 6]・堀井明[4]・木村康明[1]・阿部洋[1, 7, 8]　([1]名大院理・[2]名大物質科学国際センター・[3]学習院大理・[4]東北大医分子病理・[5]東北大医病態病理・[6]東北大医学教育推進センター・[7]JST CREST・[8]糖鎖生命コア研究拠点)

Development of Novel Phosphate Prodrugs with Fluorophosphoramidate Group. (Graduate School of Science, Nagoya University[1], Research Center for Materials Science, Nagoya University[2], Department of Life Science, Gakushuin University[3], Tohoku University School of Medicine, Department of Molecular Pathology[4], Tohoku University School of Medicine, Department of Investigative Pathology[5], Tohoku University School of Medicine, Office of Medical Education[6], JST-CREST[7], Institute for Glyco-core Research[8]) YOSHIDA, Yuki[1]; ZHENG, Ti[1]; TANABE, Wataru[1]; TOMOIKE, Fumiaki[2, 3]; HASHIYA, Fumitaka[2]; HIROTA, Shuto[4, 5]; SAIKI, Yuriko[4, 5, 6]; HORII, Akira[4]; KIMURA, Yasuaki[1]; ABE, Hiroshi[1, 2, 3]

ヌクレオシドアナログはヌクレオシドを模倣して合成された分子であり、抗がん剤や抗ウイルス薬として現在でも広く用いられている。ヌクレオシドアナログは生体内のリン酸化酵素によってリン酸化を受けて活性種であるトリリン酸体に変換される。しかしながら、この経路においてモノリン酸化の段階が律速段階であるため、薬理活性低下の原因となっていた。そこで、膜透過性の向上およびリン酸化の効率化をはかることを目的としてモノリン酸体に化学的な修飾を施し、細胞内に移入後に代謝されて活性種になるリン酸プロドラッグが開発されてきた[1]。例としてはC型肝炎治療薬のSofosbuvirや新型コロナウイルス感染症治療薬のRemdesivirが挙げられる (Fig. 1)。これらの薬はProTide型と呼ばれる代表的なリン酸プロドラッグであり、アリールアルコールとアミノ酸エステルをベースとしている。しかし、ProTide型のような従来のリン酸プロドラッグは代謝時に副生成物として生じる毒性分子や活性体解放条件の多様さの観点から改善の余地がある。

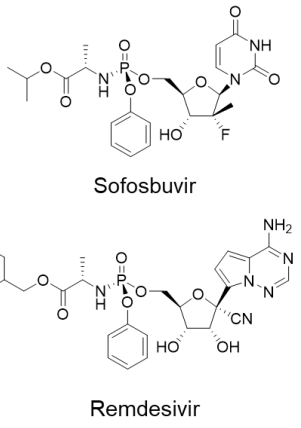


Fig 1. Structure of ProTide phosphate prodrug.

以上のような背景から、本研究では新規の官能基：フルオロリン酸アミデート基を開発し、膵臓がんをはじめ種々のがん治療に用いられるGemcitabineを中心として、リン酸プロドラッグとしての応用検討を行った (Fig. 2)。このフルオロリン酸アミデート基におけるリン—フッ素結合は、生理的条件下で高い安定性を示すため、生理活性分子への応用が可能である。さらに、アミノ基に環境応答性官能基を導入し、条件特異的に活性体放出が起こることを期待した。発表では本プロドラッグの合成および抗がん活性・毒性評価について報告する。

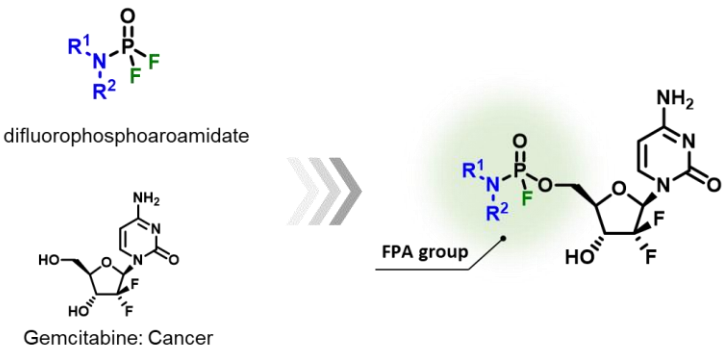


Fig 2. Structure of Fluorophosphoramidate prodrug.

1) *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154－9218
2) *ChemMedChem.* **2022**. 10.1002/cmdc.202200188

miRNA 応答型低分子薬剤放出システム

○冨田康弘・森廣邦彦・岡本晃充（東大院工）

The system to release a small drug responding to miRNA (Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) TOMIDA, Yasuhiro; MORIHIRO, Kunihiko; OKAMOTO, Akimitsu[1]

ここから本文を書き始めてください。このテンプレートに直接上書きできます。

がんの早期発見やその選択的な治療はがんの治癒および、化学療法の副作用低減の観点で重要である。本研究では、有用ながんバイオマーカーである miRNA の発現量の違いを利用し、特定の miRNA に応答して蛍光分子や抗がん剤として働く低分子化合物を細胞内で放出する分子システムの開発・評価を目的としている。[1). 2)]

本研究の具体的な方法として、Catalytic Hairpin Assembly（以下、CHA）と Staudinger 還元を組み合わせることにより、特定の miRNA 存在下で選択的に低分子化合物を放出する DNA プローブを合成し、その機能性を *in vitro* の蛍光アッセイおよび細胞実験により確認・評価した。CHA は核酸シグナル増幅法の一種であり、Target 核酸とヘアピン DNA の片方が相互作用することにより、反応が進行し、生成物として 2 種類のヘアピン DNA が一つずつ相互作用した二本鎖 DNA が得られる。[3)]本研究では、2 種類のヘアピン DNA を、アジドとホスフィンで修飾し、CHA が進行した場合のみ Staudinger 還元反応が起き、アニリン分子の 1,6 脱離により低分子化合物が放出されるように設計されている。[4)](Fig.)

本研究の進捗および結果として、初めに多くのがん細胞で過剰発現が確認されている miRNA の一種である miR-21 の存在下で選択的に進行する CHA 用の DNA の設計および合成を行った。次に、蛍光分子である AMC を搭載したアジドのリンカーとホスフィンのリンカーで修飾した CHA 用のヘアピンを用いて、AMC が miR-21 の存在下でのみ選択的に放出されることを *in vitro* の蛍光アッセイにより確認した。最後に、SN38 を搭載したアジドのリンカーとホスフィンのリンカーで修飾した CHA 用のヘアピンの毒性を評価した。結果としてこのプロドラッグの系は、miR-21 の過剰発現が確認されている複数のがん細胞種において、通常細胞に比較して選択的に毒性を示すことが確認された。

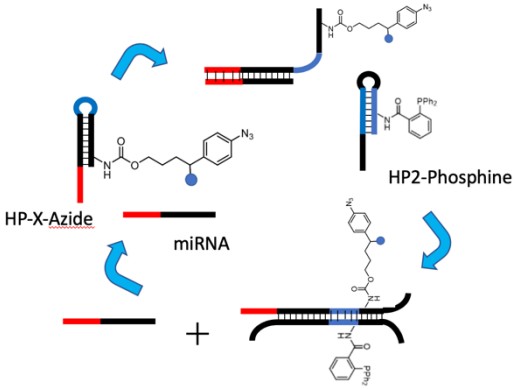


Fig.アジドとホスフィンのリンカーで修飾したヘアピンDNAがCHAの進行により二本鎖を形成する様子。二本鎖形成後、直ちにStaudinger還元反応が起き、青丸で示した搭載されている低分子が放出される。

1) Katarzyna, G et al, *Chem. Sci.,* 2011, 2, 1969–1975
2) Wilson, R et al, *Clin Invest Med* 2010; 33 (2): E124-E132
3) Jumei, L et al, *smll*.201902989
4) Morihiro, K. et al, *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 39, 13909–13915

Site-specific C->U deamination using photo-cross-linkable probe for RNA editing applications

(Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology [1])
Siddhant Sethi[1], Eita Satonaka[1], Kei Sakuma[1], Shu Kawazoe[1] , Kenzo Fujimoto[1]

Recently, the genetic disorders, which were thought to untreatable in the past, can now be treated using advanced techniques like CRISPR/Cas and ADAR[1,2]. These techniques can make changes to both DNA and RNA, respectively. One such technique was developed by Fujimoto lab which uses only a photo-cross-linkable moiety, called 3-cyanovinylcarbazole (^{CNV}K), incorporated in an oligo-DNA to cross-link with pyrimidines specifically and can induce site-specific mutation of cytosine to uracil via deamination[3]. Although, this techniques was promising, it had its disadvantages as high temperature of 90 ºC was required to induce the C->U deamination. We tried to overcome this problem by replacing the counter-base of cytosine from guanine to inosine and it afforded us deamination reaction at physiological conditions but with a half-life of 5 days[4]. But this gave us an insight that by increasing the hydrophilicity around the target cytosine, the reaction rate can be improved. Thus, we further tinkered with the photo-cross-linking moiety ^{CNV}K and replaced the cyano group with the carboxylic acid (^{OHV}K) and amide groups (^{NH2V}K)[5]. Among the cross-linkers, the most hydrophilic group, carboxylic acid group showed best reaction rate, the yield was still low.

Therefore, in the current study, we decided to combine both the modifications to achieve the maximum hydrophilicity around the target cytosine. We used guanine, inosine, and cytosine as the counter bases and ^{CNV}K, ^{OHV}K, and ^{NH2VK} as the cross-linker. As per our hypothesis, the increased hydrophilicity increased the reaction rate and the pair of inosine as counter base and ^{OHV}K as the cross-linker showed the highest rate of reaction with a half-life of 4 days. We further carried out the mutation of short oligo-RNA and was able to achieve the similar results. Thus, this technique can be used for potential *in vivo* editing of both DNA and RNA.

1. Karimian, A., Gorjizadeh, N., Alemi, F., Asemi, Z., Azizian, K., Soleimanpour, J., Yousefi, B. *Life Sciences*, 2020, 259, 118165.
2. Fan, J., Ding, Y., Ren, C., Song, Z., Yuan, J., Chen, Q., Shu, W. *Communications Biology*, 2021, 4(882).
3. Fujimoto, K., Konishi-Hiratsuka, K., Sakamoto, T., & Yoshimura, Y. *Chemical Communications*, 2010, 46(40), 7545.
4. Sethi, S., Ooe, M., Sakamoto, T., & Fujimoto, K. *Molecular Biosystems,* 2017, 13, 1152-1156
5. Sethi, S., Takashima, Y., Nakamura, S., & Fujimoto, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 27(16), 3905-3908.

RNA の定量検出に向けた超高速光架橋核酸プローブの開発

○平野佑樹・篠崎一世・Sethi Siddhant、藤本健造（北陸先端科学技術大学院大学）

Ultrafast photo-cross-linkabe oligodeoxynucleotides probes for quantitative detection of RNA detection

(Bioscience, Biotechnology, and Biomedical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology) Yuki Hirano, Issei Shinozaki, Siddhant Sethi, Kenzo Fujimoto

昨今のコロナウイルスの流行に伴い、PCR という言葉をよく耳にする。PCR による遺伝子診断 は高い正確性を有しており、RNA 検出において強力なツールとされている。例として、標的 RNA を磁気ビーズを用いて補足するプローブなどを使用した RT-PCR による定量化する手法や、細胞内 RNA を迅速に解析できる FISH 法などが挙げられる。PCR を用いた RNA の定量検出は病気の早期診断などにおいて非常に有用である。しかし現在使用されている多くの手法は基本的にハイブリダイゼーションを用いた補足となるため、標的 RNA の確実な補足や夾雑物除去が困難であることが知られている。 本研究では補足する過程において超高速 RNA 光架橋反応を用いることで、RNA の定量的な補足 を試みた。光架橋の有無により RT-PCR 増幅曲線の立ち上がりを確認し、サイクル数(Ct 値)に大きな差が見られるか確認した。その結果 Ct 値の差が 19.7 であることがわかった。この大きな差は、光架橋していない系ではハイブリダイゼーションのみでの補足となるため、洗浄操作時に標的 RNA が解離する一方、光架橋している系では標的 RNA と Probe が共有結合を形成しているため洗浄操作を行っても結合が解離することなく標的 RNA を捕捉し続けたためと考えられる。次に用いる Probe の配列依存性について検証し、用いる Probe によってサイクル数に変化が現れることを確認した。磁気ビーズ上で架橋反応を用いて標的 RNA を選択的に補足することによって、強力な洗浄操作でも解離することなく、標的 RNA の高感度検出につなげることができたためここに報告する。

核酸増幅・連結反応の 3’-エキソヌクレアーゼを用いた反応制御

○丸山幸記・吉田蒼馬・赤澤紗彩・宮崎祐宇・大窪章寛（東工大生命理工）

Regulation of ligation and amplification of oligonucleotides by using 3’-exonuclease III ([1]School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) Koki Maruyama[1], Aoma Yoshida[1], Saaya Akazawa[1], Yu Miyazaki[1], Akihiro Ohkubo[1]

エキソヌクレアーゼは、オリゴヌクレオチドのリン酸結合を 5'-末端から 3'-末端へ、あるいは 3'-末端から 5'-末端への方向に加水分解する。これまでの核酸医薬開発において、様々な化学修飾がエキソヌクレアーゼの加水分解活性を阻害することが報告されてきた。この化学修飾の高いヌクレアーゼ耐性により、多数の未修飾オリゴヌクレオチドを含む混合物から、目的の修飾オリゴヌクレオチドのみを単離することが可能となる。また、単離したオリゴヌクレオチドの配列を、DNA ポリメラーゼで連結・増幅できるようにあらかじめ設計しておけば、図 1 に示すように、目的の DNA 二重鎖を選択的に合成することが可能である。このような DNA 二重鎖の連結・増幅手法は、ゲノム・遺伝子合成や DNA コンピューティング等のナノテクノロジーに応用できると考えられる。そこで本研究では、エキソヌクレアーゼを用いて ON-OFF スイッチング可能な核酸連結・増幅法の開発を行なった。

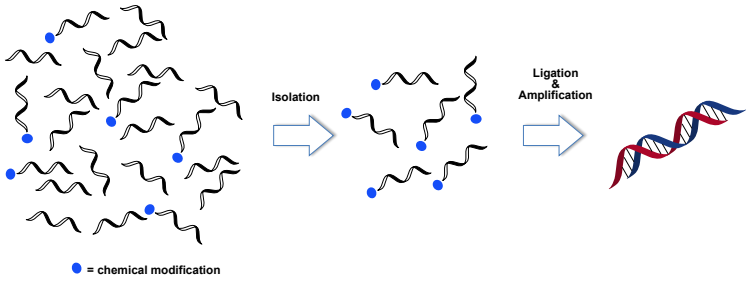


図 1

まず、種々のエキソヌクレアーゼや化学修飾を検討したところ、Exonuclease III 存在下、3’-末端のみにホスホロチオエート結合をもつ修飾核酸（PS 体）を用いれば、未修飾核酸（PO 体）を用いる場合と比べ連結・増幅反応効率が 50 倍以上も高いことが分かった。（図 2）また、この反応条件を用いることで、特定の配列のみを選択的に増幅できることも明らかにした。

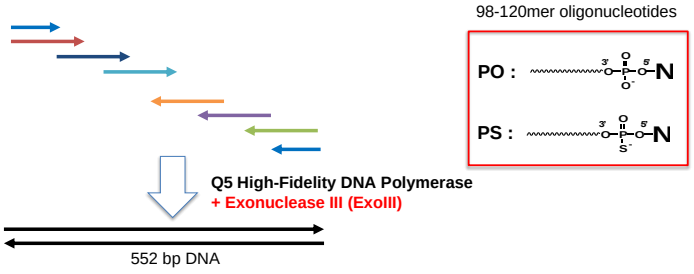


図 2

さらに、PS 体の 3’-末端をリン酸化することで、核酸連結・増幅反応の効率は大幅に抑制でき(反応 OFF)、 ここに Exonuclease III を添加することで抑制した反応を開始できる（反応 ON）、反応の OFF-ON スイッチングにも成功したので合わせて報告する。

光誘起 DNA メモリを志向した超高速 DNA 光架橋による DNA 回路構築

○ ZUMILA Hailili[1]・SETHI Siddhant[1]・中村重孝[1]・藤本健造[1]（[1]北陸先端大・バイオ機能医工学研究領域 ）

Construction of DNA circuits by ultra-fast DNA photo-cross-linking for photo-induced DNA memory

(Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology[1])
ZUMILA, Hailili[1]; SETHI, Siddhant[1]; NAKAMURA, Shigetaka[1]; FUJIMOTO, Kenzo[1]

Nucleic acid has been widely used in biological engineering for it follows the Watson-Crick base pairing method which makes it highly predictable and programmable. Various DNA-based nanodevices and logic circuits have been designed in the past few decades. These applications either use enzymes or toehold-mediated strand displacement reaction to regulate the behavior of DNA. In this study, we tried to achieve a DNA hairpin gate regulation by using photo-cross-linkable artificial nucleic acid, 3-Cyanovinylcarbazolenucleoside (^{CNV}K)[1)].

^{CNV}K cross-links to pyrimidine bases within 1 s under 366 nm UV irradiation. When inserting ^{CNV}K in the invading strand of the toehold-mediated strand displacement reaction, the covalent bond formed under UV-irradiation is thermally irreversible therefore stabilizing the DNA complexes and inhibiting the backward branch migration of the invading strand, achieving the acceleration of the strand displacement rate. Moreover, the insertion position of ^{CNV}K and the photo energy has also proven capable of regulating strand displacement ratio[2)].

In our previous study, we have designed a photo-regulated DNA memory system that can reflect the order of the input strands. ^{CNV}K played a critical role in the functioning of the memory gate, and considerably improved its efficiency. While the result is sufficient to reflect the input order, noise reduction is needed due to the length of the sequence (124 nt for Gate, 43 nt for input strand 1, 45 nt for input strand 2). Based on our previous experience, we redesigned the DNA memory system (Figure. 1). The hairpin Gate is shortened to 50 nt and the input strands to 16 nt. When the inputs are added in reverse order, the old system inhibited the invasion of input 1 by the cross-link between gate and input 2, whereas in our new system, the invasion of input 1 is designed to be inhibited by its cross-link with input 2, in which gate remains in its hairpin structure and the system can be reused till it meets sequential inputs. The new system aims to compute the input order with high speed and reduce the formation of any undesired complexes by achieving a high cross-linking rate.

1) Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **10**, 3227-3230 (2008)
2) S. Nakamura, H. Kawabata, K. Fujimoto, **18** (20), 1984-1989 (2017)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

多種マイクロ RNA の同時蛍光検出

○徐云嵩・森廣邦彦・岡本晃充（東大院工）

Simultaneous fluorescence detection of multiple microRNAs (Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) XU, Yunsong; MORIHIRO, Kunihiko; OKAMOTO, Akimitsu

MicroRNA (miRNA) is a kind of single-strand RNA with a short length of 18-22 bases which relates to the death and differentiation of cells. Especially, there are always specific abnormal miRNA found in cancer cells or inflammatory cells[1]. Taking advantage of the specific miRNA in diseased cells as a target molecule that is different from normal cells, we can separate the normal one and diseased one. If we can selectively detect the specific miRNA, we can not only demonstrate some life phenomenon but also realize early diagnosis of some diseases. Nevertheless, the concentration of miRNA in cells is always at a concentration of several nanomolar which is hard to be detected, at the same time, the short length of the chain will also limit the sensitive detection. What's more, the accessibility to the miRNA is low because of the existence of the RNA combing proteins. In that, it is significant to improve the fluorescent signal manually to image the miRNA in cells sensitively.

Hybridization Chain Reaction (HCR) is a kind of technology that takes advantage of two kinds of hairpin DNAs to combine with the target nucleic acid so that a chain reaction that will form a DNA double strand starts (Figure 1A).[2] HCR can be initiated with target nucleotide with a concentration under 0.1 nM.

Exciton-Controlled Hybridization-sensitive fluorescent Oligonucleotide (ECHO) probe is a kind of nucleotide with two Cyanine pigment molecules conjugated on it by the linker on the 5'-site carbons of uridine (Figure 1B).[3] Under the single-strand state, there will be no fluorescent because of the H-aggregation between the pigment. With the combination of target nucleic acid, double strand will form. Because of the local change of the structure, the aggregation structure will be broken, and strong fluorescence can be activated. As ECHO probe can be applied in kinds of cells and have a good signal to background ratio, it is a good choice to monitor the going on of HCR. What's more, ECHO probe can be decorated with different dyes with different colors, it is possible to detect different kinds of miRNA in cell at the same time.

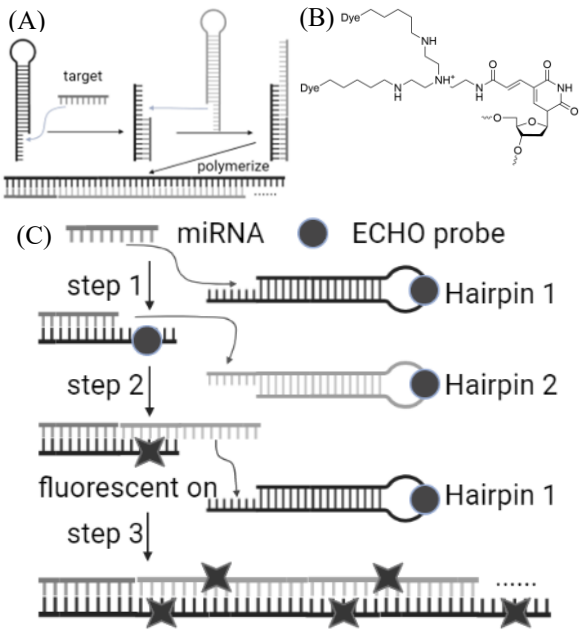


Figure 1 (A) Abstract of HCR. (B) Structure of ECHO probe (C) Combination of HCR and ECHO probe

Here, I am trying to challenge the sensitive fluorescence imaging of miRNA with the insertion of ECHO probe on the hairpin (Figure 1C). With the combination of these two technologies, HCR-type ECHO probe has been primarily designed and synthesized. This ECHO probe has a 4 times fluorescence enhancement with adding miRNA of low concentration (0.1 μM). The turn-on ratio of common ECHO probe is only 1.4 at the same concentration and measuring conditions.

1) Calin *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 857.
2) Bi *et al., Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4281.
3) Okamoto*, Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5815.

ポリメラーゼの基質として機能する
四リン酸核酸誘導体の合成および評価

○中村真由[1]・稲垣雅仁[1]・橋谷文貴[2,3]・木村康明[1]・阿部洋[1,2,3,4]（[1]名古屋大院理、[2]名古屋大物質科学国際研究センター、[3]国立研究開発法人科学技術振興機構 CREST、[4]東海国立大学機構糖鎖生命コア研究拠点 iGCORE）

Synthesis and evaluation of tetraphosphate nucleoside analogs for polymerase substrate (Graduate School of Science, Nagoya University[1], Research Center for Material Science, Nagoya University[2], CREST, Japan Science and Technology Agency[3], Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Tokai National Higher Education and Research System[4]) NAKAMURA, Mayu[1]; INAGAKI, Masahito[1]; HASHIYA, Fumitaka[2,3]; KIMURA, Yasuaki[1]; ABE, Hiroshi[1,2,3,4]

ポリメラーゼはヌクレオシド三リン酸を基質として、RNA や DNA を合成する。一方、天然のヌクレオシド三リン酸だけでなく、化学修飾された非天然のヌクレオシド三リン酸もポリメラーゼの基質となり得ることが知られている。ヌクレオシド三リン酸は、大きく分けて塩基、糖、リン酸の 3 つの部分から成り、私たちはリン酸部修飾がポリメラーゼの基質認識に与える影響に注目し、研究を行っている。

まず、三リン酸のγ位にアミノ基やタウリンを導入した誘導体を合成した。これらのヌクレオシド三リン酸誘導体は、3 段階で合成される（**Fig. a**)）。まず、ヌクレオシドを塩化ホスホリルで一リン酸化し、次に、二リン酸を加えて環化したヌクレオシド三リン酸を形成させた。最後に、アミンなどの求核剤を加えて目的の生成物を得た。

また、γ位にさらにリン酸が結合した四リン酸核酸誘導体も合成した。これはヌクレオシド三リン酸に縮合剤とイミダゾール、一リン酸を加えることにより合成したものである。これらの化合物も、DNA や RNA のポリメラーゼの基質となり得る（**Fig. b**)）。

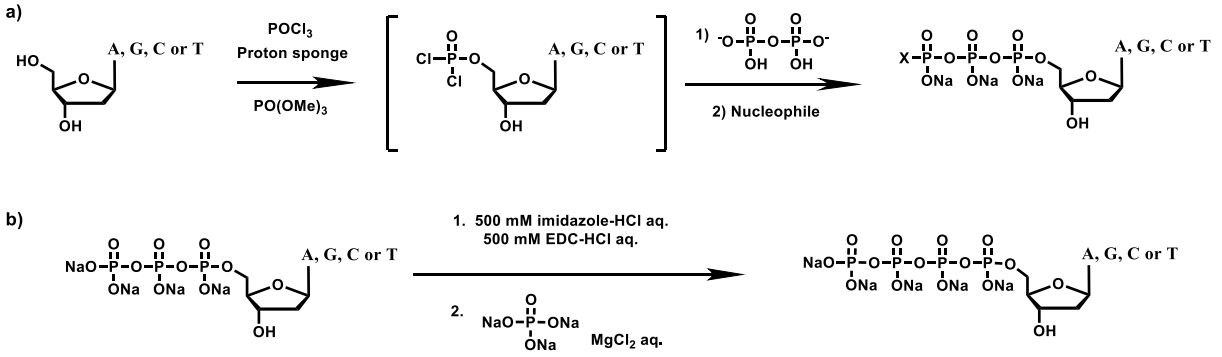


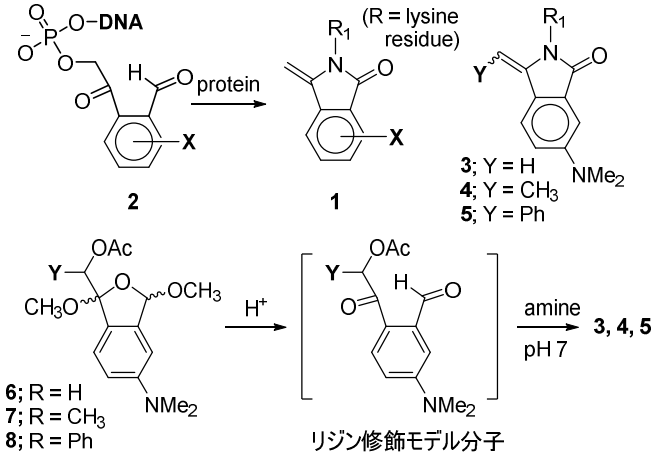
Figure a) Synthesis of nucleoside triphosphate derivatives, b) Synthesis of nucleoside tetraphosphate

反応性核酸を用いた蛋白質ソルバトクロミック蛍光修飾—蛍光基の物性、修飾反応に及ぼす置換基の影響—

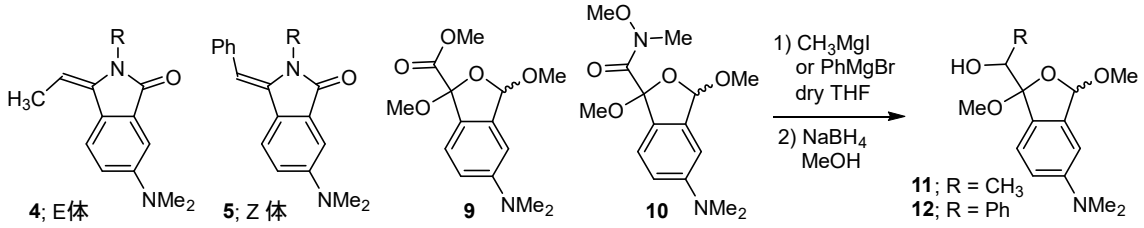
○麻生真理子・劉 怡萱・堂薗拓真・田畑香織・阿部由紀子（九州大院薬）

Protein Modification with solvatochromic fluorophore using reactive oligodeoxynucleotides-Effects of substituents on modification and properties of fluorophores- (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University) ASO, Mariko; LIU, Yixuan; DOZONO, Takuma; TABATA Kaori; ABE, Yukiko

ソルバトクロミック蛍光分子を導入した生体分子では、蛍光変化により生体分子の構造や相互作用がモニターでき有用な情報が得られる。我々は、DNA 結合性蛋白質に結合し、緩和な条件で近接するリジン残基を 3-methylene-isoindolin-1-one, **1** に変換する反応性核酸 **2** を開発した。ベンゼン環上にジメチルアミノ基をもつ **3** は 蛍光ソルバトクロミズムを示した。今回新たなソルバトクロミック蛍光分子の開発を目指し、オレフィン部にメチル基、フェニル基をもつ **4**、**5** を合成し、その物性および蛍光特性を **3** と比較した。続いて反応性核酸 **2** や **6** と同様、*o*-keto benzaldehyde 構造を取ると予想するリジン修飾モデル分子のアミン反応性を検討するため、前駆体となる **7**、**8** を合成した。化合物 **7**、**8** からリジン修飾モデル分子への変換、アミン分子との反応による **4**、**5** の生成を評価した。



メチル基を導入した **4** ($R_1 = (CH_2)_6OH$, E 体) は **3** と同様環境応答型の蛍光を示した。プロトン性溶媒中溶媒の誘電率の増加に伴い蛍光量子収率は低下し、蛍光極大波長は長波長シフトした（*i*-PrOH 中 λ_{emmax} 461, 456 nm (λ_{ex} 293, 360 nm), MeOH 中 λ_{emmax} 478, 476 nm（λ_{ex} 293, 365 nm)。誘電率と蛍光量子収率、誘電率と蛍光極大波長の間にはそれぞれ線形の相関がみられた。また、**3**、**4** の蛍光強度は同程度であった。化合物 **3** と比較して pH 6-8 の緩衝液中で **4** はより安定に存在することがわかった。一方、フェニル基を導入した **5** ($R_1 = (CH_2)_6OH$, Z 体) は環境応答型蛍光を示したが、蛍光強度は弱かった。pH 6-8 の緩衝液中での安定性は **3** より高く **4** より低いことがわかった。次にリジン修飾モデル分子へ変換可能な **7**、 **8** を合成した。エステル **9** から得られるアミド **10** の Grignard 反応、得られるケトン体の還元により **11**、**12** を得、それぞれアセチル化により **7**、**8** へ変換した。化合物 **7**、**8** は酸性条件下加水分解を行った後に中和し、中性条件下アミン分子と反応させたところ、**4**、**5** がそれぞれ **E** 体 **Z** 体の混合物として生成することが確認できた。



DNA を利用した色素-金属錯体間エネルギー移動の検討

○東秀憲・浅沼浩之・樫田啓（名大院工）

A study on energy transfer between a fluorophore and a metal complex by using DNA. (Graduate School of Engineering, Nagoya University) AZUMA, Hidenori; ASANUMA, Hiroyuki; KASHIDA, Hiromu

天然の光合成は、多数の色素と金属錯体を空間的に精密に集積化することで超高効率に光エネルギーを金属錯体へ捕集し物質変換を行っている。DNA は自発的に剛直な二重鎖構造を形成するという特徴がある。また、当研究室では D-Threoninol を介して DNA 二重鎖中に色素を導入すると、導入した色素が塩基対間に固定化されることで、色素間の距離や配向を厳密に制御することに成功している[1]。このから、DNA は多数の分子を精密に集積化する上で理想的な骨格であるといえる。すでに我々は DNA の高次構造である DNA junction にアクセプター色素（perylene）と多数のドナー色素（pyrene）を精密に集積化することで高効率に光エネルギーを捕集することに成功している [2]。しかしながら、捕集した光エネルギーを物質変換に利用するためには色素と金属錯体を同時に集積化する必要がある。本研究では DNA junction に有機色素及び金属錯体を導入し、色素-金属錯体間エネルギー移動の距離・配向依存性について明らかにしたので報告する。

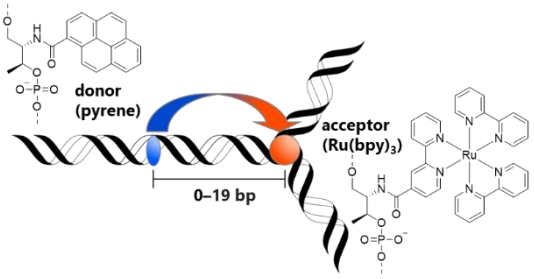


Figure 1. Design of DNA junction with pyrene and $Ru(bpy)_2$.

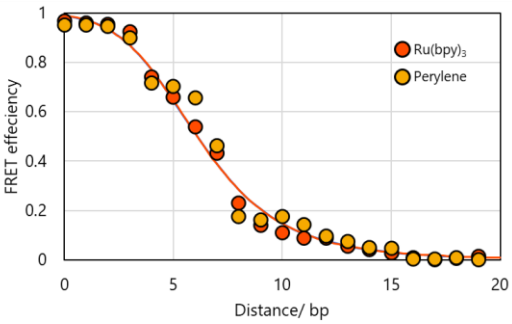


Figure 2. Values of FRET efficiencies and theoretical curve of averaged orientation.

エネルギー移動のドナーとして pyrene、アクセプターとしてフォトレドックス触媒である $Ru(bpy)_3$ を選択した。DNA junction の中央に $Ru(bpy)_3$ を配置し、二重鎖部位に pyrene を導入した。更に、pyrene と $Ru(bpy)_3$ との間の塩基対数を 0 bp から 19 bp まで変化させて蛍光スペクトルを測定した。$Ru(bpy)_3$ の導入に伴う pyrene の発光減少率から FRET 効率を算出した（Fig. 2 赤）。配向が平均化されていると仮定したときの理論曲線と比較すると、実験値と極めてよく一致することが分かった。一方、コントロールとして有機色素である perylene をアクセプターとして導入し、同様にエネルギー移動効率を算出したところ若干の配向依存性が観察された（Fig. 2 橙）。このように、DNA junction 構造に金属錯体を導入した際には、配向に依存しない FRET 系を構築できることが分かった。これは、$Ru(bpy)_3$ は有機色素とは異なり、遷移双極子モーメントが 3 方向あるため、配向による FRET 効率の変化が平均化されていることを示唆している。

以上のように DNA junction に導入した pyrene-$Ru(bpy)_3$ 間エネルギー移動の距離・配向依存性を明らかにすることに成功した。本発表では $Ru(bpy)_3$ を導入した DNA junction の構造予測や、$Ru(bpy)_3$ 導入による DNA の構造安定性変化についても報告する。

【参考文献】

[1] Kashida, H.; Sekiguchi, K.; Liang, X.; Asanuma, H. J. Am. Chem. Soc., 2010, 132, 6223-6230.

[2] Kashida, H.; Azuma, H.; Maruyama, R.; Araki, Y.; Wada, T.; Asanuma, H. Angew. Chem. Int. Ed., 2020, 59, 11360-11363.

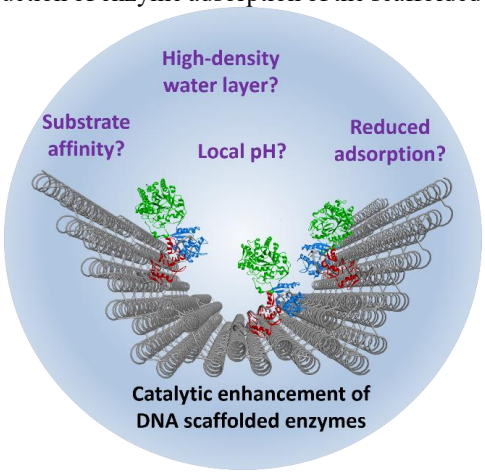
DNA ナノ構造体に配置した酵素の活性調節機構

○Lin Peng・中田栄司・木下 正弘・森井 孝（京大エネルギー理工学研究所）

Mechanistic aspects for the modulation of scaffolded enzyme activity on DNA scaffold (Institute of Advanced Energy, Kyoto University) LIN, Peng; NAKATA, Eiji; KINOSHITA, Masahiro; MORII, Takashi

Cells have developed the metabolic system consisting of efficient enzyme cascade reactions to manage specific and step-by-step biochemical transformations. The high efficiency and specificity of the enzymatic cascade reactions in cells are believed to rely on the spatial organization of enzymes assembled on the specific scaffolds like proteins or membrane. To mimic such nature systems, individual or multiple enzymes have been attached on various carriers. Among these, macromolecular scaffolds constructed by the DNA nanostructures attract great interest for their structural programmability and accurate addressability.[1] While the catalytic enhancement of DNA scaffolded enzymes has been observed, the exact chemical mechanisms behind this phenomenon remain controversial.[2]

In this research, we evaluated the possible effects of DNA scaffold on enzymatic reactions from various aspects. Our results indicated that the previously proposed mechanisms, the substrate affinity to the negatively charged DNA scaffold by the electrostatic interaction[3] or the lower local pH on the scaffold surface[4] was not the general factor of the catalytic enhancement by the DNA scaffold. Reduction of enzyme adsorption of the scaffolded enzymes on the surface of reaction vessels for the scaffolded enzymes would partly contribute to the catalytic enhancement. While our study evaluated the proposed mechanisms, critical characteristics of the DNA scaffold to enhance the scaffolded enzyme reactions remain to be elucidated.[5] We hypothesized that the high-density water layer formed by the negatively charged DNA scaffold surface played dominant role in accelerating the catalytic reaction of assembled enzymes. This hypothesis was systematically tested experimentally. Results of these experiments and the origins of catalytic enhancement of DNA scaffolded enzymes will be discussed.



1) P. W. K. Rothemund, *Nature*, **440**, 297 (2006)
2) Y. Zhang, J. Ge, Z. Liu, *ACS Catal.*, ***5***, 4503 (2015)
3) J. L. Lin, I. Wheeldon, *ACS Catal.,* 3, 560 (2013)
4) Y. Zhang, S. Tsitkov, H. Hess, *Nat. Commun.,* 7, 13982 (2016)
5) P. Lin, H. Dinh, Y. Morita, Z. Zhang, E. Nakata, M. Kinoshita, T. Morii, *Chem. Commun.*, **57**, 3925 (2021)

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

C9orf72 由来のリピート RNA とペプチドの相互作用制御法の開発

○建石寿枝 [1]•大山達也 [1]•松本咲 [1]•田中成典 [2]•杉本直己 [1,3]（[1] 甲南大 FIBER、[2] 神戸大院システム情報学、[3] 甲南大 FIRST）

Development of methods to control the interactions between C9orf72-derived repeat RNA and peptides

([1]Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), [2]Department of Computational Science, Graduate School of System Informatics, Kobe University, [3]Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University) TATEISHI-KARIMATA, Hisae[1]; OHYAMA, Tatsuya [1]; MATSUMOTO, Saki[1]; TANAKA, Shigenori[2]; SUGIMOTO, Naoki[1,3]

C9orf72 の GGGGCC リピート配列の拡張は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患の遺伝的原因である。リピート配列から転写された RNA は、ペプチドと共に集積し、神経変性疾患の発症や進行に関連する (1)。本研究では、GGGGCC リピート由来の RNA とペプチドの集積機構を化学的観点から検討した。*C9orf72* の $d(GGGGCC)_8$ をもつ鋳型 DNA を設計し、転写反応を行った。転写された RNA（$r(GGGGCC)_8$）は、円二色性分散計によるスペクトル解析の結果から、100 mM KCl を含む溶液中において、G-四重らせん構造を形成することが示された（Fig. 1A）。さらに、$r(GGGGCC)_8$ に、神経性疾患細胞内に発現しているペプチド配列$(GR)_8$, $(GA)_8$, $(GP)_8$ を添加し（Fig. 1B）、$r(GGGGCC)_8$ とペプチドの集積体の形成を解析した。熱力学的解析と分子動力学計算により、ペプチドは G 四重らせん構造特異的に結合することが示された。これまでの研究成果によって、四重らせん構造の形成は、周辺環境の影響を顕著に受けることが見出されている (3)。神経変性疾患の細胞内環境は、正常細胞と大きく異なるため、疾患特有の細胞内環境が、RNA の構造に影響を及ぼし、RNA-ペプチドの相互作用を変化させている可能性が推察される。講演では、細胞内におけるリピート RNA の構造変化や、集積体の形成についても物理化学的観点から考察する。また、小分子による RNA-ペプチド集積体の形成制御法についても紹介する。

【参考文献】

1) H. Tateishi-Karimata and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **49**, 7839 (2021)

2) H. Tateishi-Karimata*, Y. Teng*, and N. Sugimoto (*Equal contribution), *Biochemistry*, **59**, 1961 (2020)

3) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc*, **140**, 642 (2018)

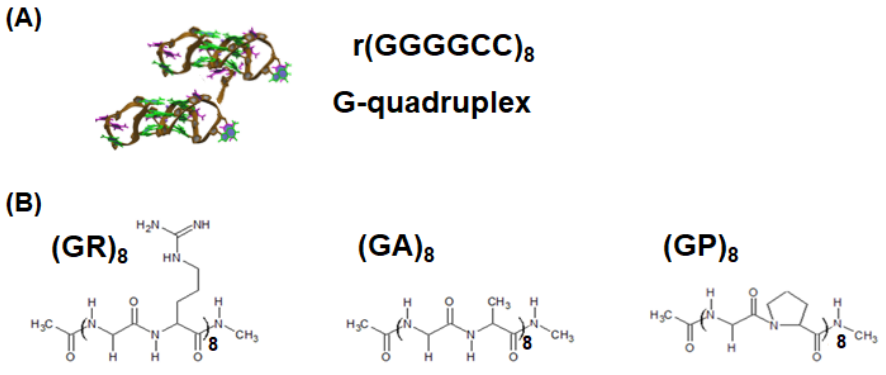


Fig. 1. (A) An expected structure of $r(GGGGCC)_8$ in the buffer containing 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl (pH 7.2), and 8 mM $MgCl_2$. (B) Chemical structures of the dipeptides used in this study.

Chemically Enhanced Stability of 2D and 3D DNA Origami Nanostructures

(Institute of Advanced Energy, Kyoto University[1]) KRISHNAMURTHY, Kirankumar[1], RAJENDRAN, Arivazhagan[1], NAKATA, Eiji[1] and MORII, Takashi[1]

Structural DNA nanotechnology[1] has grown exponentially over the last few decades, and the introduction of scaffolded DNA origami method[2] has gained much attention for its versatility in designing complex nano-architectures with sub-nanometer addressability, have made them novel scaffolds in various biochemical applications.[3] Regardless of the advantages, these nanostructures exhibit low stability to undergo any further modifications required for various applications. This is mainly due to the presence of many discontinuities (nicks) in the phosphate backbone of the staple strands in the DNA origami nanostructures. Though enzymatic ligation is commonly used in molecular biology to seal the nicks in the duplex DNA, their use is limited and less characterized.

In our previous work[4], we successfully optimized the conditions and characterized the enzymatic ligation of 2D DNA origami. Although the results are promising, with a maximum ligation efficiency of 31-55%, the complete ligation of all the nick sites is still challenging and limited by the high steric hindrance of the tightly packed DNA origami nanostructure. Especially, the accessibility to most nick sites in 3D origami nanostructures with overlayed and multiple helix designs would be almost impossible. The alternate way is to ligate them by chemical methods, which offers advantages over enzymatic ligation by complete accessibility and fast reaction kinetics. However, chemical processes that introduce cross-links and base modifications when ligated are unsuitable for native-like ligation of DNA origami nanostructures. In this work, we demonstrate two chemical methods, 1) chemically enhanced enzymatic ligation and 2) CNBr-induced native chemical ligation, which was previously demonstrated for duplex DNA ligation by Shabarova et al[5]. Both methods offer faster reaction rates and higher yields of ligation products than the conventional enzymatic ligation method. Detailed analysis and characterization of 2D and 3D DNA origami nanostructures ligation by the proposed chemical methods will be discussed.

References:

1) N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237.
2) P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297.
3) A. Rajendran, E. Nakata, S. Nakano, T. Morii, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 696.
4) A. Rajendran, K. Krishnamurthy, A. Giridasappa, E. Nakata, T. Morii, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 7884.
5) Z. A. Shabarova et al., *Nucleos. Nucleot. Nucl.* **1996**, *15*, 1137.

3D DNA ナノ構造体の足場上での酵素の構築

○中林芽以・Lin Peng・中田　栄司・森井　孝（京大院エネ研）

Construction of the packed state of enzymes in 3D DNA scaffold (Graduate School of Energy Science, Kyoto University) NAKABAYASHI, Mei; LIN Peng; NAKATA, Eiji; MORII, Takashi

細胞内で多段階の酵素反応を高効率かつ特異的に進行させるためには、酵素群の空間的な配置が重要であると考えられている。[1] この酵素群の空間的な配置は、タンパク質または膜などによって形成される特定の足場を利用して達成されているため、これらの酵素群を試験管内で単に混ぜ合わせただけでは、高効率な多段階の酵素反応を実現するのは困難である。一分子レベルで特定の場所に酵素を配置することができれば、細胞内で見られるような高効率な反応系を試験管内でも構築できると期待される。そのための足場として、我々は DNA origami 法[2] で構築した二次元や三次元の DNA ナノ構造体を利用している。これまでに報告された、DNA ナノ構造体の足場に酵素群を配置した酵素逐次反応では [3-6]、二次元構造体上で逐次反応の効率が酵素間距離に依存して変化することが確認されている。一方、三次元構造体に酵素を内包した場合には、二次元構造体上に配置した場合に比べて酵素の活性が向上することが確認されているが [5]、これまでに三次元構造体を足場とした場合の酵素間距離の効果は評価されていない。当研究室では、酵素を配置したまま構造変化させることで、酵素間距離を変化させることができる三次元の DNA ナノ構造体を酵素を配置する足場として用いて、酵素の空間配置と反応効率の相関を評価してきた。35 nm × 45 nm × 35 nm の正六角柱形状の DNA ナノ構造体 (Hexagonal Prism : HP)[7] に二種類の酵素を配置した際には、HP の開閉に伴う酵素間距離の変化によって酵素逐次反応の効率が変化することが明らかとなっている [8]。本発表では、異なるサイズの六角柱 DNA ナノ構造体 (Shallow Hexagonal Prism : SHP, 35 nm × 50 nm × 25 nm) を調整して、二種類の酵素を HP と SHP という形状が異なる足場に配置した場合に、酵素逐次反応効率がどのように変化するかについて評価した結果を報告する。

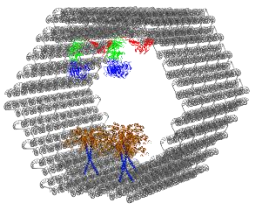


図 1. 酵素を修飾した HP

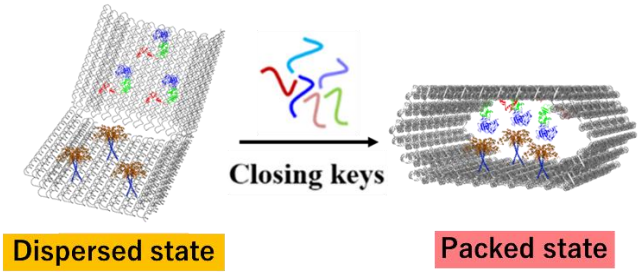


図 2. 酵素を修飾した SHP の閉鎖システムの模式図

1) W. Bonacci, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 478
2) P. W. Rothemund, *Nature*. **2006**, *440*, 297.
3) I. Willner. *et al.*, *Nat. Nanotech.* **2009**, *4*, 249.
4) T. A. Ngo. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 3012.
5) Z. Zhao. *et al.*, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10619.
6) R. Arivazhagan. *et al.*, *ChemBioChem.* **2017**, *18*, 696.
7) P. Lin, *et al.*, *Front. Chem.* **2021**, *9*, 697857
8) P. Lin, *et al.*, *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 11197.

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

RNA ヘアピン技術によるがん選択的な細胞毒性

○森田駿人・森廣邦彦・岡本晃充（東大院工）

Cancer-Selective Cytotoxicity through RNA Hairpin Technology (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) MORITA, Shunto; MORIHIRO, Kunihiko; OKAMOTO, Akimitsu

核酸分子はその配列・長さ・細胞内局在に応じて強力な細胞毒性を示すことから抗がん剤としての応用が期待されている。例えば poly(I:C)はポリイノシンとポリシチジンからなる長さが 1-10 kbp の人工二本鎖 RNA 分子であり、がん細胞に取り込まれるとエンドソーム中や細胞質中に存在するパターン認識受容体を活性化し、細胞死などの強力な免疫応答を誘導する。しかし poly(I:C)は通常細胞や免疫細胞にも取り込まれ深刻な副作用を示すため実用化には至っていない。本研究ではがん細胞選択的な細胞毒性を示す核酸分子の開発を目標としている。

我々はマイクロ RNA-21 (miR-21) とハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR) を用いて、poly(I:C)様の構造をがん細胞内で選択的に構築する戦略を考えた。miR-21 はがんの発達などを促進するがん関連マイクロ RNA の一つで、多くのがん細胞内で発現量が増加している [1]。また、HCR は短いトリガー核酸分子を二種類のヘアピン型核酸分子が長鎖二重鎖核酸分子に伸長する連続した鎖置換反応である [2]。本戦略は以下の通りである (**Fig. A**)。1) miR-21 をトリガーとする腫瘍溶解性ヘアピン型 RNA 分子 (oHPs) を設計し、細胞に導入する。2) がん細胞内で oHPs は内在性の miR-21 と共に HCR を進行させる。3) HCR 産物は poly(I:C)と類似した長鎖 RNA 二重鎖であるため、がん細胞内で毒性を発揮する。4) 一方で通常細胞内では miR-21 が少ないため HCR は進行せず、細胞毒性を発揮しない。

まず適切な反応性と選択性を有する oHPs を設計した。試験管内で oHPs と miR-21 を反応させ、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で HCR 産物の構築を確認した (**Fig. B**)。次に oHPs を培養細胞内に導入し、24 時間後の細胞生存及びアポトーシスを確認した。スクランブル配列を有し HCR を進行させない scHPs と比較すると、oHPs はがん細胞選択的に細胞生存率を低下させた (**Fig. C**)。またアネキシン/PI 二重染色による評価では、oHPs は poly(I:C)には劣るものの scHPs よりも強いアポトーシス誘導能を有することがわかった (**Fig. D**)。そして担がんマウスモデルを用いた実験においても oHPs は poly(I:C)と同等かそれ以上の抗がん活性を示すことを確認した (**Fig. E**)。

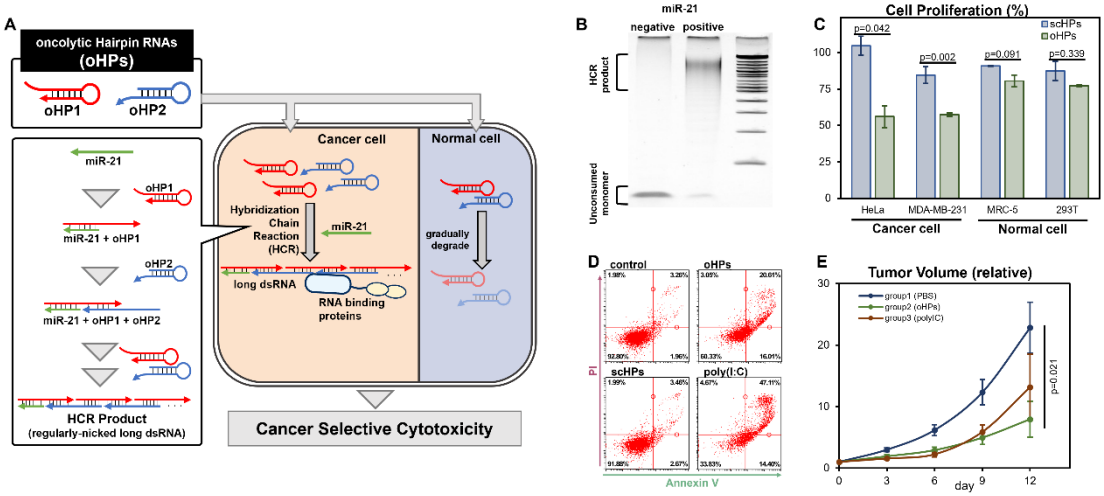


Fig. (A) Strategy of this research. (B) Image of PAGE which confirms the formation of HCR products in test tubes. (C) Cell proliferation at 24 h after the transfection of scHPs or oHPs. (D) Results of Annexin V-FITC/PI staining for HeLa cells after the transfection. (E) Cancer size of tumor-bearing mice with three times of drug administration.

1. X. Cai, *et al.*, *RNA*, **10**, 1957 (2004)
2. R. M. Dirks, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 15275 (2004)

ターンオーバー型 VS リボザイムの触媒能力に対する スペルミンおよび金属イオン添加効果の定量解析

○宮崎優大[1]・松村茂祥[1,2]・井川善也[1,2]

（[1]富山大院医薬理工学環、[2]富山大院理工）

Kinetic analysis of a *trans*-acting VS ribozyme affected by spermine and metal ions (Graduate School of Pharma-Medical Science, University of Toyama[1], Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama[2]) MIYAZAKI, Yuki[1], MATSUMURA, Shigeyoshi[1,2], IKAWA, Yoshiya[1,2]

【背景と目的】自己切断型 RNA 酵素（リボザイム）である Varkud satellite（VS）リボザイムは、酵素 RNA と基質 RNA への分割（図 1）により、ターンオーバー能力を付与できる。VS リボザイムの活性発現には Mg^{2+}が重要であり、低 Mg^{2+}濃度ではターンオーバー能が低下するが、生体ポリアミンの一つであるスペルミン（図 2）の添加が、その触媒能力低下を相補できる。

当研究室では、VS リボザイムのターンオーバー能力を向上させる人工進化実験を行ってきたが、進化実験により得られた進化型リボザイムの機能を評価するためには、母体である VS リボザイムの基準データを得る必要がある。

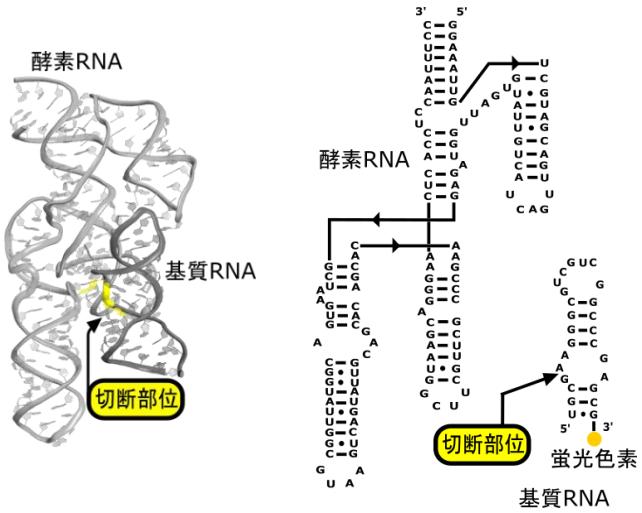


図 1　VS リボザイムの三次構造式（左）と二次構造式（右）

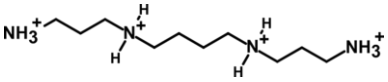


図 2　スペルミンの構造式

本研究では、第一に、VS リボザイムの触媒回転機構の解析を目的として、低・高 2 つの Mg^{2+}濃度（5 mM と 10 mM）条件においてターンオーバー能力を速度論的に解析した。第二に、スペルミン添加によるターンオーバー能力向上の分子基盤を解明するため、低濃度 Mg^{2+}に微量（100 μM）のスペルミンを添加して同様の解析を行い、ターンオーバー能力を定量的に比較した。第三に、金属イオンの VS リボザイム活性発現に対する効果を調査するため、Mg^{2+}を他の二価金属イオン（Ca^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}および Ni^{2+}）に置換した条件、二価金属イオン存在下においてスペルミンを添加した条件、において VS リボザイムの活性を解析・比較した。

【結果と考察】基質過剰条件と酵素過剰条件の結果を比較すると、k_{cat} および K_m に大きな変化は見られなかった。従って、VS リボザイムの触媒回転における律速段階は、基質切断の段階であることが強く示唆された。また、低 Mg^{2+}濃度条件では、スペルミンの添加により、リボザイムの基質結合能（K_m）には大きな変化がない一方、リボザイムの最大反応速度（k_{cat}）を約 14 倍向上させたことから、スペルミンは VS リボザイムによる基質切断の効率を向上させることが示唆された。さらに、Mg^{2+}を Ca^{2+}、Mn^{2+}に置き換えても活性は発現し，さらにスペルミン添加による触媒性能の向上も見られた。一方で、Zn^{2+}、Ni^{2+}に置換した条件では、活性は発現せず，スペルミンを添加した場合においても同様であった。このことから、VS リボザイムの活性発現には特定の二価金属イオンが必要であることが示唆された。

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

実験進化中に出現した
親リボザイムに配列が類似した機能性 RNA の解析

○野口唱[1]・寺田海舟[2]・荏原基力[2]・井川善也[1,2]・松村茂祥[1,2]
（[1]富山大院医薬理工学環、[2]富山大院理工）

Functional analysis of the parental ribozyme-related RNAs obtained during experimental evolution

(Graduate School of Pharma-Medical Sciences, University of Toyama[1], Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama[2]) NOGUCHI, Sho[1]; TERADA, Kaishu[2]; EHARA, Motochika[2]; IKAWA, Yoshiya[2]; MATSUMURA, Shigeyoshi[2]

Varkud satellite（VS）リボザイム（図 1）は、比較的高いターンオーバー能を有する天然由来の RNA 切断リボザイムである。我々はこれまで、液滴マイクロ流体システムを用いて、VS リボザイムの活性向上を目指した実験進化を行ってきた。この実験系では、切断される基質 RNA の両末端を蛍光分子と消光分子で標識し、リボザイムによる切断反応によって蛍光分子が消光分子から遊離して生じる蛍光を計測することで、リボザイムの活性を評価している（図 2）。しかし、進化実験の結果得られた RNA を解析すると、蛍光を生じさせるにもかかわらず、基質 RNA を切断する能力をもたない RNA が多数単離された。これまでの解析により、蛍光増強 RNA は、もとの VS リボザイムとの配列類似性の有無により、2 つのタイプに分類できることが分かった。

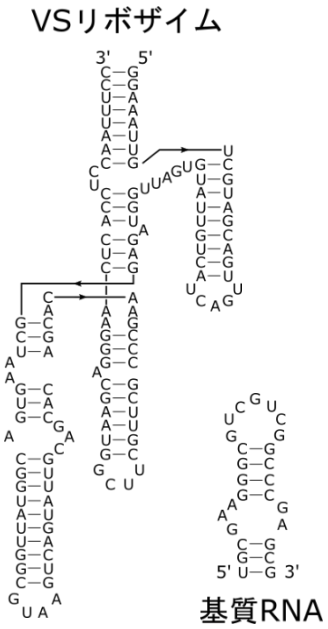


図 1 VS リボザイムと基質 RNA

本研究では、リボザイムと配列の類似性がある蛍光増強 RNA について、その機構を解析した。この蛍光増強 RNA が基質 RNA とどのように相互作用しているのかを調べるため、予測二次構造に基づいて変異体 RNA を作製した。それらを解析した結果、基質 RNA との結合部位が明らかとなった。このことから、この蛍光増強 RNA は、基質 RNA とワトソン・クリック塩基対を形成することにより、基質 RNA のヘアピン構造を開き、蛍光分子と消光分子との距離を離すことで、基質 RNA の蛍光を増強することが示唆された（図 3）。現在は、この蛍光増強 RNA が得られた経緯について解析を行っている。

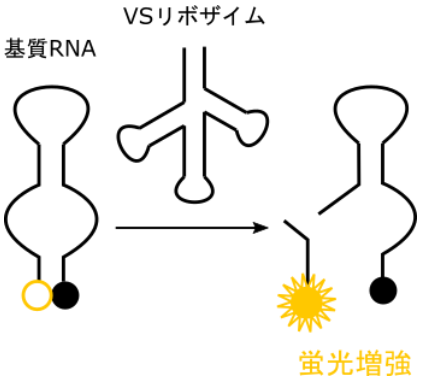


図 2 VS リボザイムの切断反応による蛍光増強メカニズム

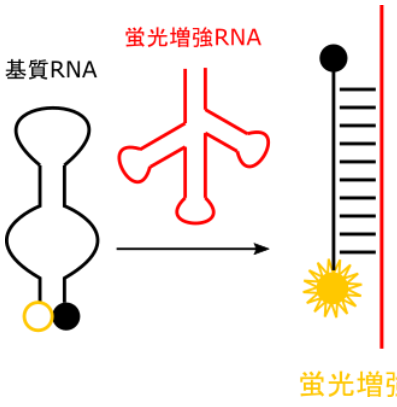


図 3 本研究における蛍光増強 RNA による蛍光増強メカニズム

DNA Origami as a scaffold to assemble membrane proteins on an artifical compartment

(Institute of Advanced Energy, Kyoto University[1]) ZHANG, Shiwei[1], NAKATA, Eiji[1], MORII, Takashi[1]

Artificial compartments are valuable tools for the study of membrane structure and mimicking cellular environment. Controlling the transport of ligands through the membrane ensures that the substrate and the reaction product can passively diffuse through the membrane. Inside cells, complex metabolic reactions are highly organized and distributed into different organelles which allows a better control over the biological processes.[1] There are some advantages in such organized systems. Because many cascade reactions suffer from incompatibilities such as cross-inhibitions by components of the reaction system. In fact, spatially arranged enzymes are observed in organelles which enhance the efficiency of multistep processes. DNA origami can serve as a high-precision template for construction of confined membrane.[2] Up to now, the available membrane protein that has been successfully inserted in artificial compartments is rather limited.[3] To overcome this problem, a method which can locate the channel proteins on the membrane of artificial compartments in high loading yields with control of number is highly required.

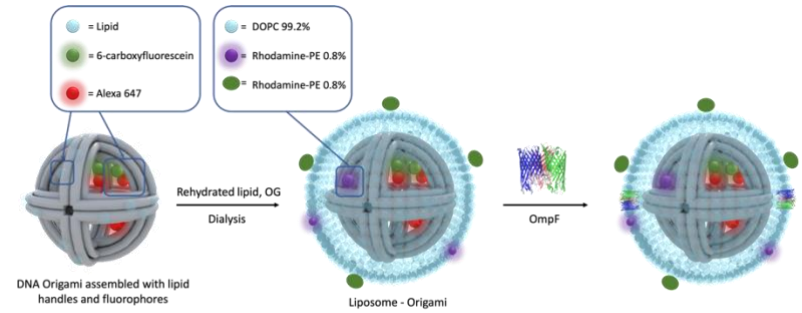


Fig 1. Schematic illustration of insertion of OmpF into the membrane of artificial compartment.

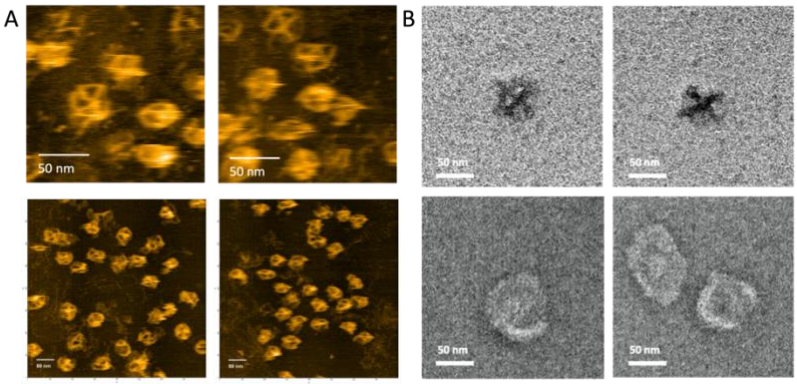


Fig 2. (A) AFM images of DNA origami. (B) TEM images of DNA origami and artificial compartment.

Here, we present a bio-inspired templating method to generate a nanocompartment that is capable of locating membrane proteins. A spherical DNA nanostructure encapsulated by liposome was designed by following the work by Perrault et al.[4] We characterized internalized DNA origami diameters of 58.6 ± 5.5 nm and outer membrane diameters of 81.6 ± 10.1 nm from TEM images. Artificial compartment was immobilized on a BSA (Bovine Serum Albumin) surface using a biotin/streptavidin linkage. It can monitor pH change by colocalizing the fluorescence signal from DNA origami modified by a pH sensitive fluorophore 6-carboxyfluorescein and a pH insensitive fluorophore Alexa 647 in the presence of membrane protein OmpF. The sequence-specific zinc finger protein (zif268) was applied as an adaptor to stably locate the OmpF on the DNA origami scaffold.[5] Assembly of the adaptor-fused OmpF on the DNA nanostructure and on the liposome will be described.

1) R. J. R. W. Peters, I. Louzao, J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.* **3**, 335-342 (2012)
2) Y. Yang, J. Wang, H. Shigematsu, W. Xu, W. M. Shih, J. E. Rothman, C. Lin, *Nat. Chem.* **8**, 476-483 (2016)
3) E. Christoph, E. Tomaz, S. Mariana, C. Anja, M. Wolfgang, G. P. Cornelia, *Nano Lett.* **17**, 5790-5798 (2017)
4) S. D. Perrault, W. M. Shih, *ACS Nano.* **8**, 5132-5140 (2014)
5) E. Nakata, H. Dinh, T. A. Ngo, M. Saimura, T. Morii, *Chem. Commun.* **55**, 1016-1019 (2015)

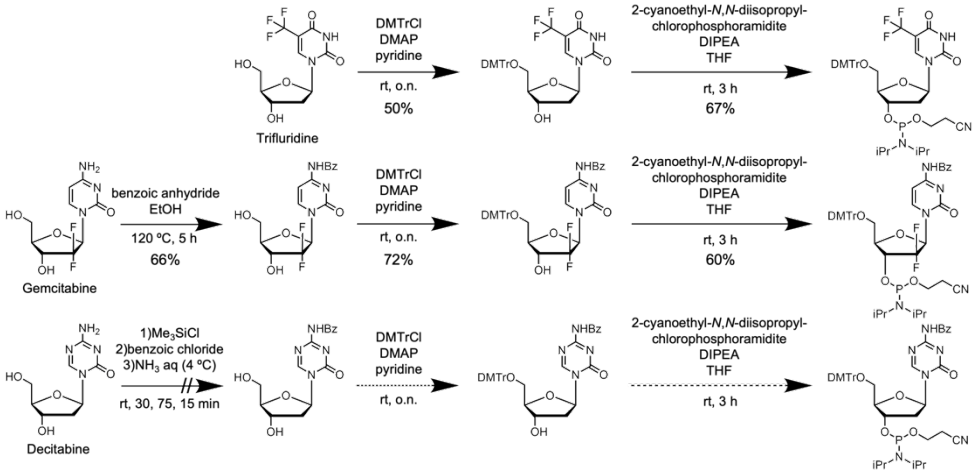
難治性がんの効果的な化学療法に向けた多剤一体型ミニ核酸医薬の開発

○込山凌成・森廣邦彦・岡本晃充（東大院工）

Development of multidrug-integrated mini-nucleic acid drugs for effective chemotherapy of refractory cancer (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) KOMIYAMA, Ryosei; MORIHIRO Kunihiko; OKAMOTO Akimitsu

Floxuridine などのヌクレオシド製剤はがんの化学療法で実際に用いられており、細胞内で 5’位水酸基がリン酸化されることで抗がん活性を示すが、多くのがん細胞ではリン酸化酵素の活性が低下しており、薬効低下や薬剤耐性の原因となっている。この欠点を克服するためにヌクレオシド製剤のオリゴマー化が注目されており、Floxuridine を 10 残基連結させた分子は F10 と呼ばれ、過去の研究において単体の Floxuridine の数倍から数十倍の抗がん活性をもつことが報告されている [1]。F10 は細胞内で DNase によって分解され、抗がん活性体であるリン酸化 Floxuridine が直接放出されるため、反応効率の低いリン酸化の過程を回避することができる。そこで本研究では難治性がんの効果的な化学療法を目指し、異なる作用機序をもつ Trifluridine、Gemcitabine および Decitabine の 3 種のヌクレオシド製剤を 1 つの分子に集積させた多剤一体型ミニ核酸医薬を開発する。作用機序の異なる薬剤を同一の分子から放出することで、従来のカクテル療法に代わる多剤併用療法を実現する。

それぞれのヌクレオシド製剤を DNA 合成機によりオリゴマー化するために、それぞれのアミダイトブロックを合成した (Scheme 1)。Decitabine については加水分解によるトリアジン骨格の分解により、目的物を得ることができなかった。



Scheme 1. 各種アミダイトブロックの合成

Floxuridine、Trifluridine および Gemcitabine については、上記で合成したアミダイトブロックを DNA 自動合成機によりそれぞれ 10 量体化し、ESI-MS 測定により目的物 (**F10, Tr10, Ge10**) が得られたことを確認した。トリフルリジンが 10 量体化した **Tr10** については、通常の DNA 固相合成における脱保護条件により核酸塩基が分解されることが報告されていたため [2]、より温和な UltraMild 条件により脱保護を行った。さらに **F10, Tr10, Ge10** それぞれの CD 測定を行い、高次構造を調べた。ゲムシタビンを 10 量体化した **Ge10** に関しては、酸性条件下で i-motif 構造をとることがわかった。

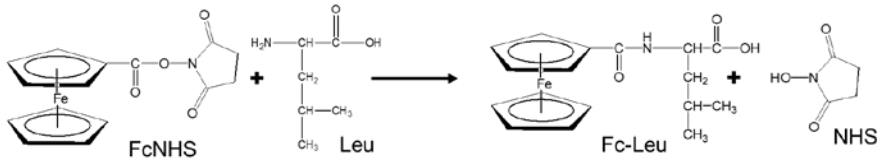
1) Gmeiner, H. *et al*., *Future Oncol.* **2016**, *12*, 2009-2020.
2) Ohtsu, A. *et al*., *Br. J. Cancer.* **2012,** *107(3)*, 429-434.

Leu/Ile のラベル化反応と HPLC 電気化学分析の迅速化

上原 亜久理[1]・森 大輝[1]・永瀬 翠[1]・○横山 憲二[1]（[1]東京工科大応用生物）

Rapid HPLC electrochemical detection of labelled Leu and Ile (School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology[1]) UEHARA, Akuri[1]; MORI, Taiki[1]; NAGASE, Midori[1]; YOKOYAMA, Kenji[1]

【緒言】アミノ酸の分析には、一般的に HPLC 分析法が用いられる。しかし、ロイシン（Leu）やイソロイシン（Ile）などの分岐鎖アミノ酸を高感度で分析するには、蛍光物質や電気化学活性種でラベル化する必要がある。演者らはこれまでに高い電気化学活性と酸化還元安定性を有するフェロセンカルボン酸-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル(FcNHS)を用いて、アミノ基をラベル化し、電気化学検出器を用いた逆相 HPLC 分析を行ってきた。しかし、フェロセンラベル化 Leu (Fc-Leu) と Fc-Ile を分離するには、長い溶出時間が必要であった。そこで本研究では、移動相の pH を最適化することにより、Fc-Leu、Fc-Ile の溶出時間に差を出し、HPLC 分析の迅速化を図ることを目的とした。



【実験方法】Leu または Ile 溶液(リン酸緩衝溶液 pH8.7)と FcNHS のジメチルスルホキシド溶液を混合し、50℃、60～120 分間ラベル化反応を行った。反応停止剤を用いる場合には、n-ブチルアミンを使用した。次に得られた Fc-Leu、Fc-Ile を C18 逆相 HPLC で分析した。移動相の緩衝溶液とアセトニトリルの比は 70:30(V/V)などとし、緩衝溶液には 0.1 M リン酸緩衝液(pH2.0)、0.1 M 酢酸緩衝液(pH4.4 または pH5.0)を用いた。検出器には、UV 検出器 263 nm、電気化学検出器 ECD1(上流)300 mV vs Pd、ECD2(下流)-400 mV vs Pd を用いた。さらにサプリメント中の Leu、Ile の測定を行った。

【結果と考察】Table 1 に pH2.0、4.4、5.0 の緩衝溶液を移動相に用いたときの Fc-Leu、Fc-Ile の保持時間を示す。この結果から、pH を上げることにより、カルボキシル基が解離し、保持時間が短くなった場合においても、Fc-Leu と Fc-Ile を十分に分離できることがわかった。ただし、pH5.0 の場合、副生成物の大きなピークと一部重なることがわかったので、緩衝溶液/アセトニトリルの比を 72/28 としたところ、保持時間は少々長くなったが、副生成物と Fc-Ile のピークが十分に分離できることがわかった（Fig.1）。

実サンプルとして Amino-Value(大塚製薬)に含まれる Leu、Ile のラベル化、HPLC 分析を行ったところ、それぞれの溶出時間にピークが検出された。

Table 1 Retention time of Fc labelled amino acids

	pH2.0	pH4.4	pH5.0
Fc-Leu (min)	36.5	11.5	6.6
Fc-Ile (min)	34.7	9.7	5.7

Flow rate: 1.0 mL/min, buffer/acetonitrile: 70/30

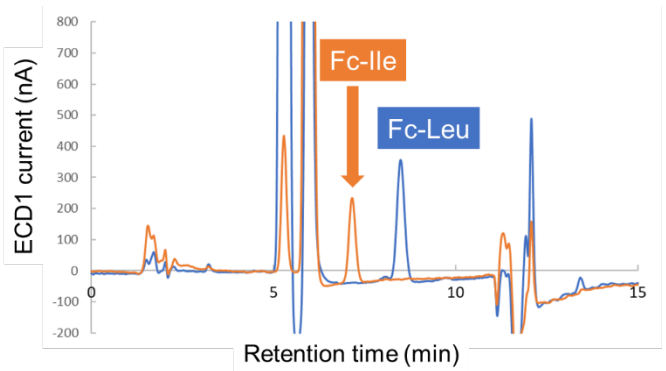


Fig. 1 Chromatogram of Fc-labelled branched chain amino acids
Mobile phase: 0.1 M acetate buffer pH5.0 / acetonitrile = 72 / 28
Flow rate 1.0 mL/min, ECD1: 300 mV vs Pd

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会

前方静的・動的光散乱のリアルタイム計測によるリゾチーム凝集化分析

○若松孝[1]・尾形慎[2]・植英規[3]（[1]茨城高専、[2]福島大食農学類、[3]福島高専）

Characterization of Lysozyme Aggregation by monitoring Forward Static and Dynamic Light Scattering

(Ibaraki KOSEN[1], Faculty of Food and Agricultural Sciences, Fukushima University[2], Fukushima KOSEN[3])
WAKAMATSU, Takashi[1]; OGATA, Makoto[2]; UE Hidenori[3]

抗体医薬品などのバイオ医薬品では、高濃度のタンパク質溶液が使用される。そのため、溶液中のタンパク質の変性や凝集等の高感度な分析評価が必要であり、タンパク質状態をリアルタイムで分析できる技術開発が求められている。

これまでに我々は、タンパク質の凝集体形成に対して高感度な低角度の前方静的光散乱(F-SLS)を時間分解で計測できる装置を開発し[1]、結晶化前のリゾチームの凝集体構造（フラクタル次元）を分析して凝集体形成を追跡した[2]。さらに最近、前方散乱光の動画像から、F-SLSと前方動的光散乱(F-DLS)の同時に分析できる計測技術の開発に取り組んでいる[3]。すなわち、レーザ光照射（λ=473nm）による測定サンプルからの前方散乱光(F-LS)を、レンズでコリメートし、平行F-LS像をCMOSイメージセンサで動画撮影して、F-LS動画像から抽出したF-DLS成分とF-SLS成分に基づきそれぞれ自己相関関数とべき関数解析を行い、拡散係数と構造パラメータ（フラクタル次元）を評価する。

ここでは、開発中のF-SLS・F-DLS同時計測装置[4]で分析評価した、結晶化前のリゾチーム凝集化について報告する。F-DLS解析から、NaCl 4%(w/v)添加の結晶化するニワトリ卵白リゾチーム(HEWL,30 mg/mL)についての拡散係数の経時変化(Fig.1)が示すように、NaCl混合直後(5～15分)から拡散係数D_Tが減少し始め、時間経過でD_Tの揺らぎ自体も小さくなった。また、F-SLS解析から評価した構造パラメータβは、D_Tの経時変化振舞と異なり、遅い時間帯(60分後)で大きくなった。一方、結晶化しないNaCl 2%(w/v)添加のHEWL(30 mg/mL)の溶液では、このような経時的変化は見られなかった。これは、電解質添加直後に形成された小さなHEWL凝集体が成長し、疎な構造から密な構造体に経時変化したと解釈できる。あるいは、電解質イオンの作用により、溶液中にHEWL濃度の高い小さなドロップレットが形成され、その後、ドロップレットのHEWL濃度がより高くなり、HEWLの凝集化が進行したとも考えられる。

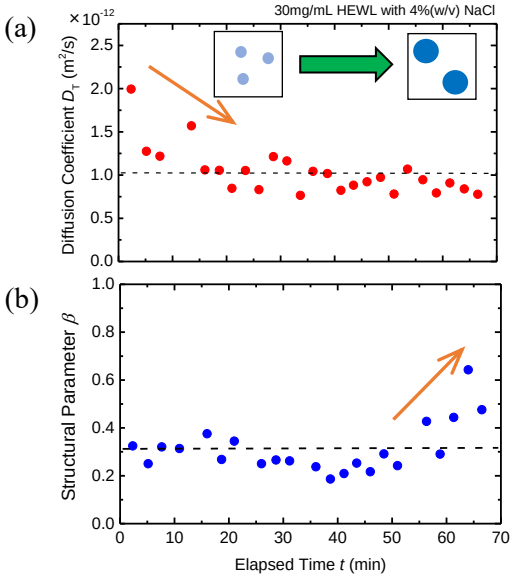


Fig. 1 Time-Change of Estimated Parameters for HEWL Crystalline solution: (a) Diffusion Coefficient (b) Structural Parameter.

[1] 特許第6757964号
[2] T. Wakamatsu, T. Onoda and M. Ogata, *Jpn. J. Appl. Phys*. **57**, 058003(1-3) (2018).
[3] 若松, 尾形, 植, 第69回応物春季講演会, 26p-E302-8 (2022)
[4] 特願2022 - 27118

顕微ラマン分光計を用いた *Streptomyces avermitilis* の形態分化における avermectin の局在解析

○堀井俊平[1,2]・安藤正浩[3]・中島琢自[3]・Ashok Zachariah Samuel[3]・高橋洋子[3]・竹山春子[1,2,3,4]（[1]早大院先進理工、[2]産総研 CBBD-OIL、[3]早大ナノライフ創新研、[4]早大先進生命動態研）

Subcellular localization of avermectin during morphological differentiation in *Streptomyces avermitilis* using Raman microspectroscopy (Graduate school of Advanced Science and Engineering, Waseda University[1], Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory, AIST-Waseda University[2], Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University[3], Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University[4]) HORII, Shumpei[1,2]; ANDO, Masahiro[3]; NAKASHIMA, Takuji [3]; Ashok Zachariah Samuel[3]; TAKAHASHI, Yoko[3]; TAKEYAMA, Haruko[1,2,3,4]

放線菌 *Streptomyces* 属は、有用な抗生物質の約 70-80%を生産しており、その生活環の中で複雑な形態的分化を行い、これが二次代謝産物の生産と密接に関連することが報告されている [1)]。しかし、形態分化に伴う二次代謝産物の時間的産生や局在が明らかでないため、抗生物質生産を活性化するための形態分化誘導はほとんど未解明である。そこで、放線菌の形態分化時における二次代謝産物の時空間分布を評価することができれば、抗生物質生産の向上に繋がる。顕微ラマン分光法は、非標識・低侵襲に物質の分子構造を明らかにし、生体分子の細胞内分布を可視化できる。本研究では、顕微ラマン分光計を用いて、放線菌が産生する二次代謝産物の形態分化における細胞内局在を可視化した。

二次代謝産物 avermectin の生産菌である放線菌 *Streptomyces avermitilis*MA4680^T を研究対象とし、液体(24h~168h)及び固体(48h~144h)培養における経日的な菌体ラマンスペクトル測定を行った。スペクトル解析手法として多変量スペクトル分解法(MCR-ALS)を用い、複雑なラマンスペクトルから単一の生体成分に由来するスペクトル成分及び各成分の強度分布情報の抽出を行った。

MCR-ALS 解析によって、avermectin に由来する特定のバンドは、タンパク質や脂質などの他のバンドと区別することができ、菌体内検出及び分布の可視化に成功した。液体培養では、培養 168h の菌糸ペレット中央部において avermectin の分布が観察された。一方で、固体培養では、avermectin は 96h 以降の胞子形成期に生産され、有胞子菌糸及び螺旋胞子鎖に局在していることが明らかとなった（Fig. 1）。また、胞子形成期の寒天培地上に菌体外小胞(EV)が観察され、ラマンイメージングの結果、タンパク質及び脂質が生体成分として検出され、一部の EV では avermectin の分布が確認された。

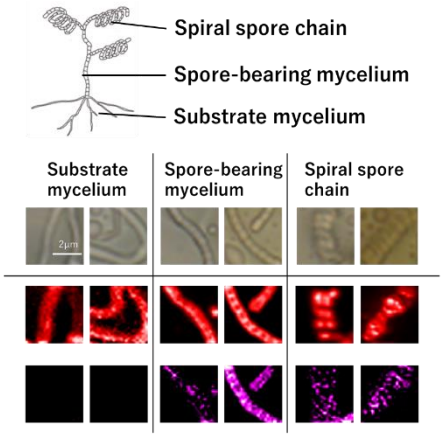


Fig 1. Raman microspectroscopy and MCL-ALS analysis of subcellular components on solid culture. Morphological parts of actinomycete and distribution maps corresponding to protein and avermectin obtained from MCR-ALS analysis.

1) Manteca A, Alvarez R, Salazar N, Yagüe P, Sanchez J, Appl Environ 74(12), 2008

ラマン分光法によるダイズ関連微生物スクリーニングに向けた生体成分解析

○諏訪駿之介[1]，安藤正浩[2]，中島琢自[2]，堀井俊平[1, 3]，松本厚子[2]，穴井豊昭[4]，竹山春子[1,2,3,5]（早大院・先進理工[1]，早大ナノライフ創新研究機構[2]，産総研・早大 CBBD-OIL[3]，九大院・農[4]，早大先進生命動態研究所[5]）

Raman spectroscopic analysis of Soybean related microbes for metabolite based screening (Graduate school of Advanced Science and Engineering, Waseda University[1], Research organization for Nano and Life Innovation[2], Waseda University Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory[3], Graduate school of Agriculture, Kyushu University[4], Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University[5]) SUWA, Shunnosuke[1]; ANDO, Masahiro[2]; NAKASHIMA, Takuji[2]; HORII, Shunpei[1,3]; MATSUMOTO, Atsuko[2]; ANAI, Toyoaki[4]; TAKEYAMA, Haruko[1,2,3,5];

植物と微生物の相互関係には、両者の多様な代謝産物が介在することが報告されている。植物の根圏には、植物から分泌されている代謝産物に誘引される微生物叢が形成され、さらにはそれらが植物の生育を促進することも知られている。本研究では、根圏微生物から有用な二次代謝産物の効率的なスクリーニングを行うことを目的とした。

微生物の二次代謝産物解析には、一般的には液体クロマトグラフィー（HPLC）や質量分析（MS）が用いられている。しかし，大量のサンプル調整が必要であり，時間を要すること，さらには、多サンプルを迅速に解析するのは難しい。本研究では，細胞内代謝産物の *in situ* 測定が可能な顕微ラマン分光法を用いて，ダイズ根圏微生物の二次代謝産物の検出を試みるとともに，二次代謝産物に基づく微生物のスクリーニング方法を検討した。

ダイズの根，根圏土壌から分離された放線菌４株（*Streptomyces thermocarboxydus*, *Streptomyces coelicolor A*, *Saccharopolyspora* . sp, *Thermomonospora* . sp,）を寒天培地で培養し，形成したコロニーのラマンスペクトルを測定した。得られたスペクトルで主成分分析（PCA）を行い，菌の生体成分に基づく菌株の分類を行った。また，培養における二次代謝産物の経時的な変化も測定した。得られたスペクトルが生体成分由来のスペクトラムに重畳している場合，スペクトル分解（MCR-ALS）により二次代謝産物スペクトルの取得を試みた。

PCA 解析の結果，タンパク質やサイトクロム，カロテノイド由来のピークを持つスペクトルによって菌株ごとにクラスターを形成することを確認した。本結果から，ラマン分光法による放線菌の *in situ* 測定により菌株の分類を行える可能性が示唆された。また，*Saccharopolyspora* sp. の MCR-ALS 解析によりエステル結合を有する脂肪酸スペクトルが検出された。得られた成分の経時的な変化を確認するため，培養 2 日目から 10 日目までコロニーのラマンスペクトルを取得し，MCR-ALS 解析を行ったところ，培養 2 日目に比べ培養 5，10 日目で著しく検出強度が上昇した。他の菌株においても培養初期では見られない特異な分子成分が検出され，二次代謝産物の経時的な変化を in situ 検出できることが示唆された。

本研究は，内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業（管理法人：生研支援センター）によって実施された。

ウイルスのエンベロープ構造を標的とした蛍光性プローブの設計と機能評価

○畑中 優作[1]、佐藤 雄介[1]、長名 シオン[2]、永富 良一[2]、西澤 精一[1]（東北大学大学院理学研究科[1]、東北大学大学院医工学研究科[2]）

Development of envelope-binding fluorescent probes for virus detection

(Graduate School of Science, Tohoku University[1], Graduate School of biomedical engineering, Tohoku University[2]) HATANAKA, Yusaku[1]; SATO, Yusuke[1]; OSANA, Shion[2]; NAGATOMI, Ryoichi[2]; NISHIZAWA, Seiichi[1]

【序論】

2019 年末から新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の世界的流行により、感染症対策は最重要課題となっている。現在、ウイルス感染診断には、内包ゲノム検出に基づく PCR 法や表面・内包タンパク質検出に基づくイムノアッセイが広く用いられている。これら既存の検出法は、検出時間及び操作性に課題を抱えており、新たなウイルス検出法の開発が必要である。

本研究では脂質膜から成るエンベロープ構造を有するウイルスを迅速かつ簡便に検出しうる分子ツールの創出を目指し、エンベロープ構造を標的とした蛍光性プローブの開発を試みた(図 1)。ウイルスが直径 100 nm 程度の高曲率性脂質膜を有している点に着目し、高曲率性脂質膜表面にある脂質パッキング欠損を選択的に認識する両親媒性 α-helix ペプチド(Amphipathic helical: AH ペプチド）に環境感受性色素 Nile Red(NR)を連結したプローブ [1] を設計・合成し、このプローブを用いたウイルス検出能を評価した。

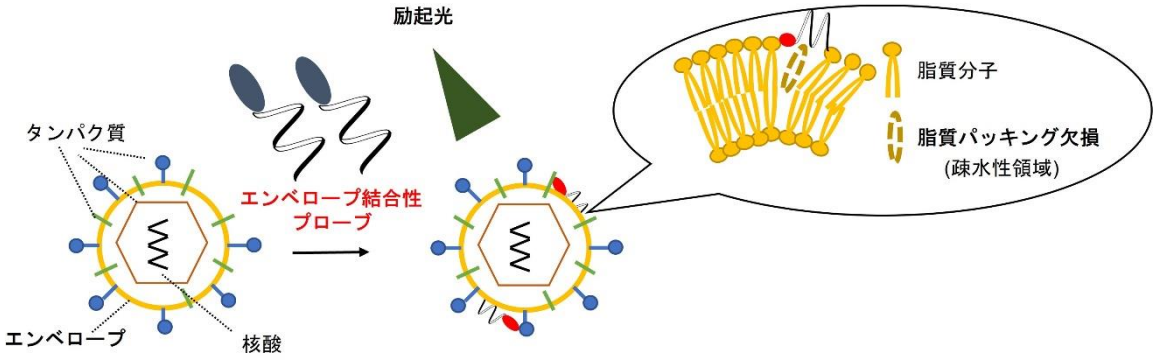


図 1： 本研究におけるエンベロープウイルス検出原理

【結果と考察】

高曲率性脂質膜に対する結合選択性を有する 3 種類の AH ペプチド配列（M2 : RLFFKSIYRFFEHGLKRG, ApoC : PVLESFKVSFLSALEEYTKKLN, Arf1 : LGNIFANLFKGLFGKKEL）を用いた蛍光性プローブを合成し、ヒト風邪コロナウイルス HCoV-229E に対する蛍光応答を評価した。その結果、いずれのプローブもウイルス添加により、迅速に発蛍光応答を示すことが分かった。これは AH ペプチド部位がウイルスのエンベロープ構造にある脂質パッキング欠損に結合し、結合に伴い NR 部位がエンベロープ近傍の疎水性環境に近接したことに起因すると考えられる。このうち、インフルエンザ M タンパク質由来の AH ペプチド(M2)を用いたプローブ(M2-NR)は最も優れた蛍光検出能を示し、HCov-229E に対する検出限界(LOD)は 1.4×10^2 ($TCID_{50}$/mL) と算出された。本手法の検出感度は抗体を用いた Western blot 法と比べ 1 桁高く、さらにはプローブとの混合のみでウイルスを迅速に検出しうる利点がある。また、M2-NR は HCoV-229E と同様のエンベロープウイルスである A 型インフルエンザウイルスに対しても高い検出能を示すことから (LOD : 3.6×10^2 ($TCID_{50}$/mL)) 、エンベロープウイルスに対して汎用的な蛍光検出プローブとして機能することが示唆された。

[1] Y. Sato, K. Kuwahara, K. Mogami, K. Takahashi, S. Nishizawa, *RSC Adv.*, **2020**, *10*, 38323-38327.

QCM と電気化学測定を用いた生分解性ポリマーの分解過程の解析

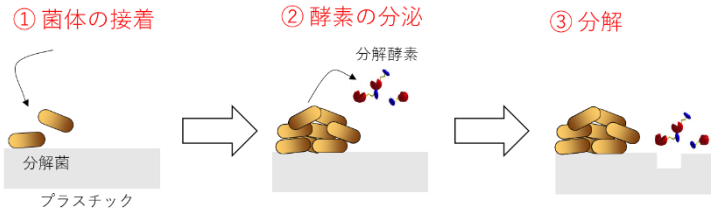
○大槻拓馬[1]・竹中康将[2]・平石知裕[2]・阿部英喜[2]・朝倉則行[1]（[1]東工大院生命理工、[2]理研 CSRS）

Measurement of microbial degradation of biodegradable polymer by QCM and electrochemistry

(Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology[1], RIKEN CSRS[2]) OTSUKI, Takuma[1]; TAKENAKA, Yasumasa[2]; HIRAISHI, Tomohiro[2]; ABE, Hideki[2]; ASAKURA, Noriyuki[1]

生分解性プラスチックは持続可能な循環型高分子材料として注目を集めている。さらに、機能や製造コストの問題を解決し、石油由来プラスチックの代替となることが期待されている。機能における問題として、海水や土壌など環境の違いによって分解される場合とされない場合があることが知られており、特定の環境下において分解が誘発されるプラスチックの開発が必要である。この問題の解決のためには、生分解のメカニズムを明らかにすることが重要である。現在、分解過程の観測に広く利用されている BOD 試験では、分解量の測定が可能であるものの、分解過程のメカニズムを調べることはできない。

そこで、本研究では、プラスチックの重量変化を QCM（水晶振動子マイクロバランス）法で測定し、それと同時に電気化学測定を行って分解のメカニズムを明らかにすることを目的とした。



Scheme 1 Microbial degradation process

プラスチックの生分解は、Scheme 1 に示すように、分解菌のプラスチック表面への接着、分解酵素の分泌を経て進行すると考えられる。これらについて調べるために QCM と電気化学の測定を利用して分解初期の解析を行った。生分解性ポリマーとして PHBH（ヒドロキシブタン酸とヒドロキシヘキサン酸を共重合したポリマー）を用いた。PHBH 膜を水晶振動子の金表面に作製した。これを無機培地中に静置し、分解菌 *Comamonas testosteroni* を添加後、24 時間の QCM 測定を行った。測定結果を Fig.1 に示す。青は分解菌を添加しなかったとき、赤は添加したときの振動数変化である。赤線を見ると添加後 5 時間では振動数が減少した。これは、金表面上の重量が増加していることを示しており、菌体が金表面上の PHBH 膜に接着したことがわかる。5 時間以降では、振動数の増加がみられたことから、PHBH 膜の分解により、重量が減少したことがわかった。

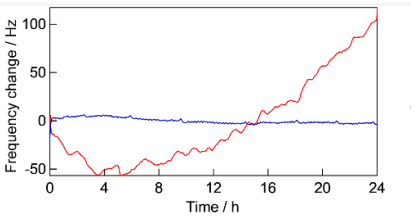


Fig.1 Time dependence of QCM response.

しかし、菌体の接着による重量増加と PHBH 膜の分解による重量減少は同時に進行するので、重量の増減からこれらを区別することは困難である。そこで、電気化学測定により、膜厚の変化を測定した。Fig.2 の青は菌体接着前、赤は菌体を添加して 24 時間後のサイクリックボルタモグラム(CV)である。これらを比較すると、添加後の CV においてアノード、カソードともに電流の増加が見られた。このことから、金表面が一部露出したことがわかり、PHBH 膜が局所的に分解されたことが明らかとなった。

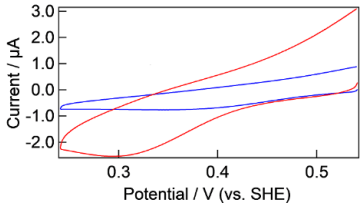


Fig.2 Cyclic Voltammograms of Quartz Crystal electrode before (blue) / after (red) PHBH biodegradation.

赤色光で活性化されるラマンプローブ 9CN-テルルピロニン誘導体

○河谷稔[1]・Spratt Spencer[2]・藤岡礼任[3]・浦野泰照[3,4]・小関泰之[2]・神谷真子[1]（[1]東工大生命理工、[2]東大院工、[3]東大院薬、[4]東大院医）

9-Cyano-10-tellurium-pyronin derivative as red light activatable Raman probe (School of Life Science and Technology, Tokyo Institution of Technology[1], Graduate School of Engineering, University of Tokyo[2], Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo[3], Graduate School of Medicine, University of Tokyo[4]) KAWATANI, Minoru[1]; SPRATT, Spencer[2]; FUJIOKA Hiroyoshi[3]; URANO Yasuteru[3, 4], OZEKI, Yasuyuki[2], KAMIYA, Mako[1]

ラマンイメージングは，分子振動に由来するラマン散乱を用いたイメージング技術である．蛍光法と比較して多重検出能に優れており，さらに非線形光学現象である誘導ラマン散乱（SRS）と，前期共鳴効果により強いラマン信号を発するラマンプローブを用いることで，多様な生体分子の同時観察が可能である[1]．近年，我々の研究グループでは，色素の吸収波長を制御することで，前期共鳴効果によるラマン信号強度の Off/On 制御が可能であると考え，酵素反応により吸収スペクトルの長波長化とラマン信号の増大を示す activatable 型酵素活性検出ラマンプローブを開発した[2]．上記の9CN-ピロニン誘導体を母核とした設計では，吸収波長の変化を誘起する反応点がキサンテン環 3, 6 位であったが，この反応点を拡張することができれば，吸収波長の変化を活用した機能性ラマンプローブの分子設計の幅が広がると考えた．（Fig.1）．

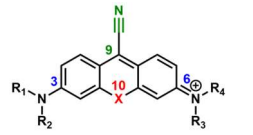


Fig 1. Chemical Structure of 9CN-pyronin derivatives.

今回，我々はキサンテン環 10 位元素を反応点とした新たな分子設計で，赤色光照射で SRS 信号が増大する機能性ラマンプローブの開発を行った．10 位にテルル（Te）を導入したローダミン誘導体は Te の酸化にともなって吸収スペクトルが 60 nm 以上長波長化することが知られている[3]．そこで，まず9CN-テルルピロニン誘導体でも Te の酸化に伴い吸収スペクトルが長波長化するか，またそれに伴い SRS 信号強度が増大するか検討した．設計・合成した 5 種類の 9CN-テルルピロニン誘導体のうち，julolidine 骨格を有する 9CN-diMeJTeP は次亜塩素酸による酸化後も高い安定性を有しており，酸化に伴って最大吸収波長が 67 nm 長波長化した．また自己増感能を有する Te ローダミン類と同様に，9CN-diMeJTeP は赤色光（650 nm）照射によって水溶液中で光酸化され(Fig2. A)，吸収スペクトルが長波長化し(Fig2. B)，光照射に伴う SRS 信号強度の増強が確認された(Fig2. C)．SRS イメージングの励起光（pump/stokes 光：843/1030 nm）では 9CN-diMeJTeP は光酸化されなかったことから，観察と光酸化による信号増強は独立に行うことができ，9CN-diMeJTeP は赤色光で SRS 信号が増強する activatable 型ラマンプローブとして機能すると考えられた．

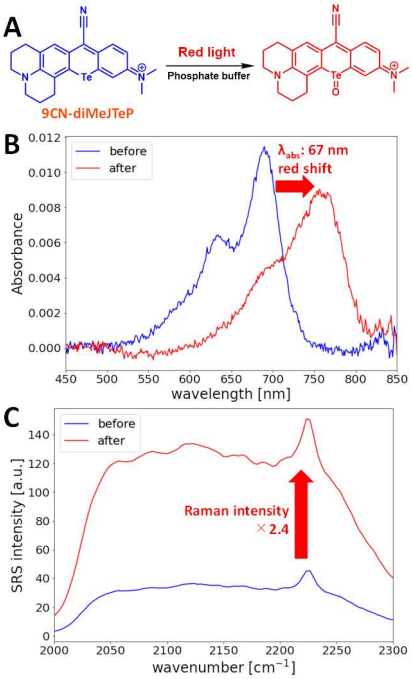


Fig 2. (A) Reaction scheme of photooxidation of 9CN-diMeJTeP. (B) Change in absorption spectra upon photooxidation of 9CN-diMeJTeP, and (C) that in SRS spectra.

1) L. Wei et al., *Nature* **2017**, *544*, 465. 2) H. Fujioka et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 20701. 3) Y. Koide et al., *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3091.

エクソソーム分析を指向した陽極酸化アルミナ細孔への脂質小胞の担持と放出

○岡田正大[1]・佐藤雄介[1,2]・伊藤徹二[3]・西澤精一[1]（[1]東北大院理、[2]JST PRESTO、[3]産総研）

Encapsulation and Release of Lipid Vesicles into and from Pores of Anodized Aluminum Oxide toward Development of Exosome Analysis (Graduate School of Science, Tohoku University[1], JST PRESTO[2], AIST[3])
OKADA, Masahiro[1]; SATO, Yusuke[1,2]; ITOH, Tetsuji[3]; SEIICHI, Nishizawa[1]

【背景】ナノメートルサイズの細孔内に置かれた分子はバルクとは大きく異なる特性や機能が発現することがある。これまで多くの研究で、細孔内でのタンパク質等の生体分子の相互作用を理解・制御することで多孔材料を用いたセンサーや分離・精製技術の開発が試行されてきた。しかし、細孔内に脂質小胞を封入するという試みはほとんどなされていない。近年、細胞が分泌する脂質小胞の一種であるエクソソームが、癌を始めとする様々な疾病に関連していることが明らかになってきており、エクソソームの分析技術の開発が求められている。本研究では、エクソソームの分離技術や検出センサーの開発を指向して、エクソソームを模した人工の脂質小胞（リポソーム）を用いて均一で直線的な細孔をもつ陽極酸化アルミナ（AAO; Anodized Aluminum Oxide）への吸着挙動を解析した(**Fig. 1**)。

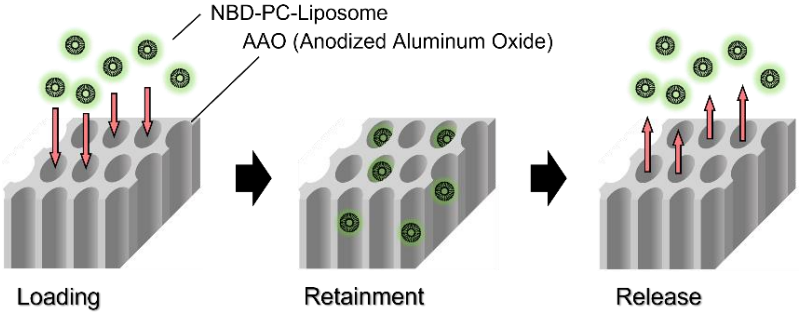


Fig. 1 The concept of this study: encapsulation and release of NBD-PC-Liposomes into and from AAO.

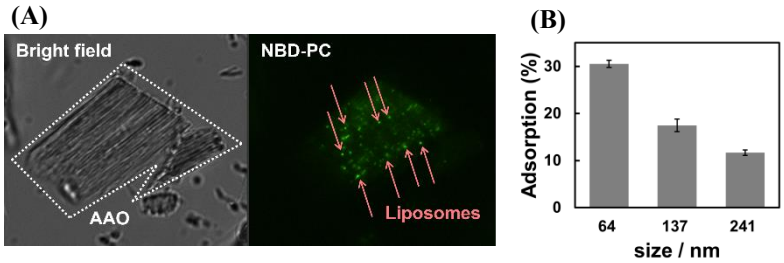


Fig. 1 (A) A fluorescence image of AAO loaded with NBD-PC-Liposome. **(B)** Quantity adsorption versus vesicle size calculated by fluorescence intensity.

【結果と考察】初めに押し出し法により作成した蛍光色素（Calcein）内包リポソームを用いて AAO とのインキュベート条件を検討したところ、8 の字振盪器を用いた場合にリポソームが崩壊せず、効率的に AAO に取り込まれることを見出した。次に、蛍光ラベル化脂質（NBD-PC）を含むリポソーム(NBD-PC-Liposome)を用いて 8 の字振盪器で撹拌しながら AAO と 24 時間インキュベートした後に、AAO を破砕し蛍光顕微鏡により観察した。その結果、**Fig. 2 (A)**に示すように AAO の細孔内に多くの輝点が観察された。これは AAO にリポソームが取り込まれ、AAO 細孔内に吸着しているものと考えられる。次に、異なる直径を有するリポソーム（直径 64 nm, 137 nm, 241 nm）を用いたところ、サイズが小さいリポソームほど多く吸着していることが分かった (**Fig. 2 (B)**)。また、リポソームは AAO 細孔で 24 時間以上安定に存在する一方で、超音波照射により AAO 細孔から回収できることが示唆され、AAO を用いたエクソソームのサイズ分離やセンサー開発、ストレージ化などの応用が期待できる。

3 次元透明化イメージングのための酵素活性検出蛍光分子プローブの開発

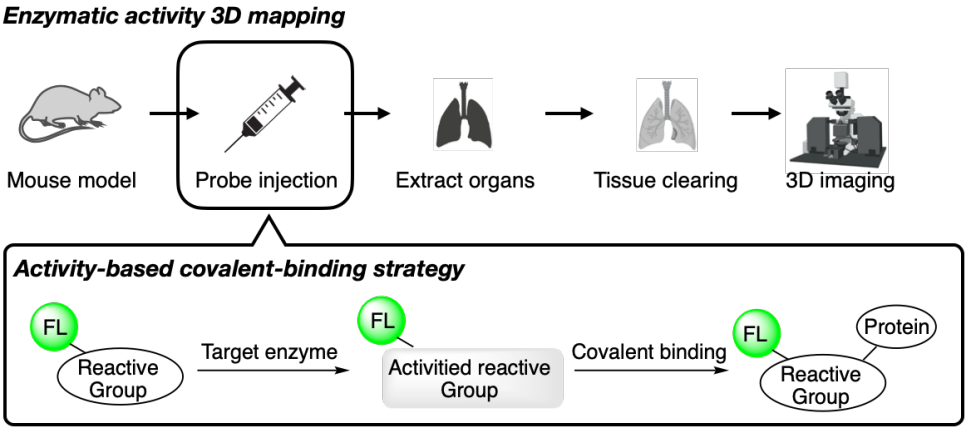
○伊博 [1]・坂本大地 [1]・田村伊織 [1]・齋藤雄太朗 [1]・山田直生 [1]・久保田晋平 [2]・田井中一貴 [3]・山東信介 [1]（[1] 東大院工、[2] 北大遺伝子病制御研究所、[3] 新大脳研究所）

Development of activity-based fluorescent probes for tissue-clearing-based imaging (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo[1], Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University[2], Brain Research Institute, Niigata University[3]) YI, Bo[1]; SAKAMOTO, Daichi[1]; TAMURA, Iori[1]; SAITO, Yutaro[1]; YAMADA, Naoki[1]; KUBOTA, Shimpei[2]; TAINAKA, Kazuki[3]; SANDO, Shinsuke[1];

Enzymes are pivotal components of most physiological processes and are consequently involved in various pathologies. Therefore, high-resolution mapping of enzyme activities in three-dimensional space is a powerful tool for elucidating the causes of a range of diseases. To date, various approaches for enzymatic activity mapping have been developed. However, high-resolution whole-organ 3D mapping of enzymatic activities remains challenging.

The combination of activity-based fluorescence small-molecular probe and tissue clearing method has shown the potential for high-resolution whole-organ 3D mapping of enzymatic activities. However, most small molecules are washed out from the tissue due to the severe washing steps during the tissue clearing treatment, such as delipidation and refractive index matching. Conventional fluorescence probes are also washed away during these steps, thus impeding the utilization of small molecule probes in tissue clearing studies.

The main goal of this work is the rational design of activity-based fluorescence probes compatible with tissue clearing. Activity-based covalent-binding strategy has been set up as a solution to the washing away-problem of small molecule probes in the tissue clearing. Based on the design strategy, probes targeting myeloperoxidase (MPO) or aminopeptidase N (APN) were developed. The enzymatic activity-based staining abilities of these probes were confirmed by cell staining experiments. Furthermore, the staining properties of the probes were verified by animal experiments.



逆平行結合抑制ペプチドペアを用いたクエンチ抗体の構築と評価

○安田貴信[1]・笹本佳那[2]・北口哲也[1]・上田宏[1]（[1]東工大化生研、[2]東工大院生命）

Construction and evaluation of Quenchbody made with a pro-parallel coiled-coil peptide pair (CLS, IIR, Tokyo Tech.[1], Grad. Sch. Life Sci. Technol., Tokyo Tech.[2]) YASUDA, Takanobu[1]; SASAMOTO, Kana[2]; KITAGUCHI, Tetsuya[1]; UEDA, Hiroshi[1]

以前、我々のグループは測定対象を試薬と混ぜるだけで検出可能な免疫測定素子としてQuenchbody (Q-body)[1]を見出した。Q-body は、抗体可変領域の適当な位置を蛍光色素修飾することで構築でき、クエンチ状態の複合体に抗原を添加する事により蛍光輝度が増加する。最近我々は強固なヘテロ 2 量体(コイルドコイル)形成ペプチドペア E4/K4 を利用し、簡便に Q-body (Coiled Q-body あるいは CQ-body と命名)を構築することに成功している[2]。すなわち E4 配列を N 末端に導入した組換え抗体断片と C 末端を蛍光色素 TMR で標識した K4-TMR ペプチドを混合する事で、精製操作なしに高収率で Q-body を得ることが出来た(Fig. 1A)。一方でグループ内の研究から E4/K4 ペアは平行だけでなく逆平行状態の結合も形成し、CQ-body において蛍光バックグラウンドの原因となる可能性が示唆されている。そこで本研究では CQ-body について E4/K4 が逆平行の結合を形成するか検証すると共に、逆平行状態での結合が抑制されるペプチドペアの設計を行った。

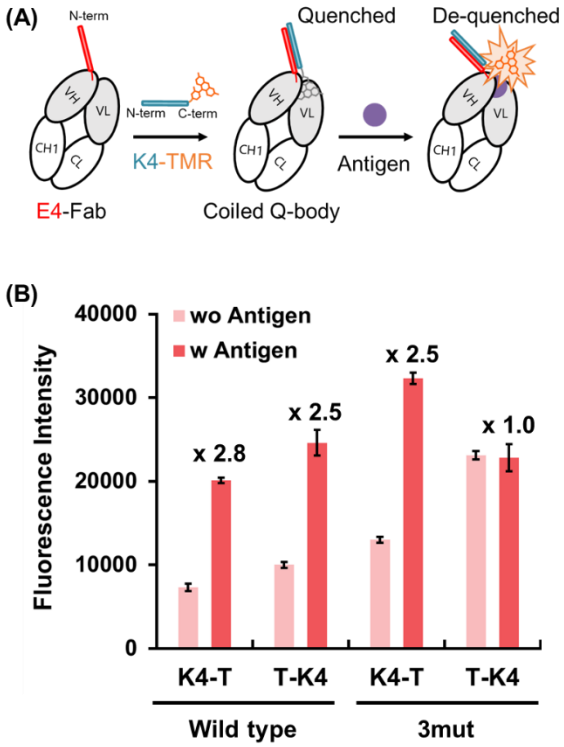


Fig. 1. (A) Schematic representation of the process for constructing a Coiled Q-body using coiled-coil peptide conjugated E4 peptide and TMR labelled K4. **(B)** Fluorescence intensities of 1 nM CQ-bodies in the presence of 1 μM BGP-C7.

まず、E4 が H 鎖 N 末端に融合された Fab 断片を大腸菌を用いて調製し、N 末端あるいは C 末端が蛍光色素 TMR で標識された K4 ペプチド(K4-T、T-K4)を固相法により合成した。E4-Fab と K4-T (あるいは T-K4)を混合し抗原有無の条件で蛍光強度を測定したところ、T-K4 を用いた場合でも抗原添加による輝度変化が観察され E4/K4 が逆平行状態で結合することが示唆された(Fig. 1B, Wild type)。

続いて、このような E4/K4 の逆平行の結合形成を抑制する目的で Gradisar らによるコイルドコイル形成ペプチドの設計指針[3]と bCIPA (http://www.syntbio.net/bCIPA/) による T_m 値の予測に基づき 3 つの変異を導入した E4(3mut)/K4(3mut)を設計した。この変異体についても上述の試験と同様に評価したところ、T-K4 を用いた場合では抗原添加による蛍光輝度変化は観察されず E4/K4 の逆平行状態の結合の抑制が示唆された(Fig. 1B, 3mut)。

以上の結果から、CQ-body では E4/K4 が逆平行でも結合可能でありペプチド配列への変異導入によりこれを抑制可能なことが示された。今後は、BLI を使った E4/K4 の親和性の評価などによりペプチド配列への変異導入が CQ-body の抗原応答に与える影響を詳しく調べる予定である。

1) R. Abe et al., *J. Am. Chem. Soc*. **133**, 17386-17394 (2011).
2) T. Yasuda, A. Inoue, T. Kitaguchi and H. Ueda, *Chem. Commun*. **57**, 8206-8209 (2021).
3) H. Gradisar and R. Jerala, *J. Pept. Sci.* **17**, 100-106 (2010).

©日本化学会 生体機能関連化学部会・バイオテクノロジー部会