

Academic Program [Oral A] | 17. Biofunctional Chemistry, Biotechnology : Oral A

📅 Tue. Mar 19, 2024 9:00 AM - 11:40 AM JST | Tue. Mar 19, 2024 12:00 AM - 2:40 AM UTC 🏢 H934(934, Bldg. 9 [3F])

[H934-2am] 17. Biofunctional Chemistry, Biotechnology

Chair: Kazunori Matsuura, Masayuki Tera

🇯🇵 Japanese

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

[H934-2am-01]

Analysis of the hydration structure of oligosaccharides based on molecular dynamics simulations

○Masayasu Furuhashi¹, Hiroaki Tatsuoka¹, Takumi Yamaguchi^{1,2,3} (1. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology, 2. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3. Exploratory Research Center on Life and Living Systems(ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences)

🇯🇵 Japanese

9:10 AM - 9:20 AM JST | 12:10 AM - 12:20 AM UTC

[H934-2am-02]

Creation of artificial virus capsids budding from membranes

○Kazunori Matsuura¹, Miu Hirahara¹, Kentaro Sakamoto¹, Hiroto Furukawa¹, Hiroshi Inaba¹ (1. Tottori University)

🇯🇵 Japanese

9:20 AM - 9:30 AM JST | 12:20 AM - 12:30 AM UTC

[H934-2am-03]

Development of a Method for Evaluating Interactions between Glycosyltransferases and Dynamic Conformational Ensembles of Glycans

○Takehito Seki^{1,2,3}, Takumi Yamaguchi^{3,4,5}, Yagi Hirokazu^{3,4}, Koichi Kato^{1,2,3,4} (1. The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI, 2. Institute for Molecular Science, 3. Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 4. Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences, 5. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

🇯🇵 Japanese

9:30 AM - 9:40 AM JST | 12:30 AM - 12:40 AM UTC

[H934-2am-04]

Efficient synthesis of disaccharide 1-phosphate repeating structure found in lipophosphoglycan of *Leishmania* protozoa

○Kazuki Kawato¹, Kazuki Sato¹, Takeshi Wada¹ (1. Tokyo University of Science)

🇯🇵 Japanese

9:40 AM - 9:50 AM JST | 12:40 AM - 12:50 AM UTC

[H934-2am-05]

Development of formation system of lipid asymmetry in liposomes by external stimulations and protein accumulation in asymmetric liposomes

○Sumin Lee¹, Koki Kamiya¹ (1. Grad. Sch. Sci. & Tech., Gunma Univ.)

🇯🇵 Japanese

9:50 AM - 10:00 AM JST | 12:50 AM - 1:00 AM UTC

[H934-2am-06]

Molecular transports via mechanosensitive channel by the changes in tension of asymmetric lipid-protein membrane

○Kotaro Baba¹, Masato Suzuki¹, Koki Kamiya¹ (1. Graduate School of Science and Technology, Gunma University)

◆ Japanese

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

[H934-2am-07]

Protein accumulation on the vesicle membranes with the amphiphilic protein layer

○Masato Suzuki¹, Koki Kamiya¹ (1. Gunma University)

◆ Japanese

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

[H934-2am-08]

Formation of membranes co-existing phospholipids and amphiphilic proteins

○Yuki Nagai¹, Koki Kamiya² (1. School of Science and Technology, Gunma Univ., 2. Graduate School of Science and Technology, Gunma Univ.)

10:20 AM - 10:30 AM JST | 1:20 AM - 1:30 AM UTC

Break

◆ English

10:30 AM - 10:40 AM JST | 1:30 AM - 1:40 AM UTC

[H934-2am-09]

Formation of cell-encapsulating gel with azide-modified hyaluronic acid and water-soluble cyclooctadiyne

○ALEJANDRA Liliana HERNANDEZ PANIAGUA¹, Fumiya Sato¹, Arvind Singh Chandel², Yuta Iijima¹, Natsuko Inagaki², Taichi Ito², Daisuke Yoshino¹, Masayuki Tera¹ (1. Tokyo Univ. of Agri. and Tech., 2. The Univ. of Tokyo)

◆ Japanese

10:40 AM - 10:50 AM JST | 1:40 AM - 1:50 AM UTC

[H934-2am-10]

Development of rapid flow-based glycopeptide synthesis

○Shintaro Yamaguchi¹, Yuta Maki^{1,2}, Ryo Okamoto^{1,2}, Bradley L Pentelute³, Yasuhiro Kajihara^{1,2} (1. Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., 2. FRC, Grad. Sch. Sci., Osaka Univ., 3. Dept. Chem., MIT)

◆ Japanese

10:50 AM - 11:00 AM JST | 1:50 AM - 2:00 AM UTC

[H934-2am-11]

Study for the elucidation of the correlation between sialoglycans and protein-protein interaction by using chemical synthesis of proteins.

○Risa Iwasaki¹, Ryo Okamoto^{1,2}, Yuta Maki^{1,2}, Yasuhiro Kajihara^{1,2} (1. Grad. sch. Sci., Osaka Univ., 2. FRC, Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.)

◆ Japanese

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

[H934-2am-12]

Development of a preparation method of functional bispecific antibodies using dimerization motif and refolding procedure

○Yuka Kitayama¹, Linko Hirono¹, Izumi Kumagai¹, Ryutaro Asano¹ (1. Tokyo University of Agriculture and Technology)

◆ Japanese

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

[H934-2am-13]

Preparation of functional small cancer therapeutic bispecific antibodies using cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803

○Miku Kobe¹, Gota Kasai¹, Shunichi Kobayashi¹, Koki Makabe², Koji Sode³, Ryutaro Asano¹ (1. Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. Yamagata University, 3. University of North Carolina at Chapel Hill)

◆ Japanese

11:20 AM - 11:30 AM JST | 2:20 AM - 2:30 AM UTC

[H934-2am-14]

Release of tail-binding proteins induced by stretch of intermediate filament nestin

○Ayana Yamagishi^{1,2}, Rina Tokuoka², Masumi Iijima³, Shun'ichi Kuroda⁴, Chikashi Nakamura^{1,2} (1. AIST, 2. Tokyo Univ. Agric. Technol., 3. Tokyo Univ. Agric., 4. Osaka Univ.)

◆ English

11:30 AM - 11:40 AM JST | 2:30 AM - 2:40 AM UTC

[H934-2am-15]

Investigating antibodies as CLIC1 blockers to inhibit chloride ion channel and cancer cell invasion in human breast cancer.

○Samrat Mukherjee^{1,2}, Ayana Yamagishi^{2,1}, Chikashi Nakamura^{2,1} (1. Tokyo University of Agriculture and Technology, 2. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

分子シミュレーションを用いた糖鎖の水和構造解析

(北陸先端大マテリアル¹・名市大院薬²・自然科学研究機構 ExCELLS³)

○古原 正康¹・龍岡 博亮¹・山口 拓実^{1,2,3}

Analysis of the hydration structure of oligosaccharides based on molecular dynamics simulations (¹*School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology*, ²*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University*, ³*Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences*)

○Masayasu Furuhashi,¹ Hiroaki Tatsuoka,¹ Takumi Yamaguchi^{1,2,3}

Oligosaccharides are involved in various biological phenomena including quality control of glycoproteins through interactions with lectins. In addition to the chemical and three-dimensional structures, the hydration structure of oligosaccharides is presumably important for the recognition of oligosaccharides by lectins. However, details of the hydration behavior of oligosaccharides remain unclear. In this study, we analyzed hydration structures of a high mannose type G1M9 oligosaccharide in solution, which interacts with lectin chaperones to promote folding of glycoproteins in the endoplasmic reticulum. By molecular dynamics simulations, we found that hydration waters bridging between carbohydrate residues exhibited characteristic behaviors. Employing a partial structure of G1M9, Glc α 1-3Man α 1-2Man α trisaccharide, it was suggested that water molecules strongly associated with the oligosaccharide promote the structuring of the surrounding water.

Keywords : Oligosaccharide, Hydration, Molecular dynamics simulation

生体内の糖鎖は、レクチンとの相互作用を通して、糖タンパク質の品質管理をはじめとする様々な生命現象に関わっている。レクチンによる糖鎖の認識には、その化学構造や立体構造に加え、水和構造が重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、糖鎖の水和構造に関する知見は限定的である。本研究では、分子動力学（MD）シミュレーションを用いて、溶液中の糖鎖の水和構造の解析に取り組んだ。

非還元末端にグルコース 1 残基をもつ高マンノース型糖鎖 G1M9 は、レクチンシヤペロンと相互作用し、小胞体での糖タンパク質のフォールディング促進に寄与する。G1M9 糖鎖の水中の MD シミュレーションを実施し、水分子との間の水素結合を調べたところ、糖残基間を架橋する水分子が末端グルコース残基の近傍に顕著に見られた。そこで G1M9 の部分構造となる三糖 Glc α 1-3Man α 1-2Man α (Figure 1) を対象に、MD シミュレーションによる水和解析を行なった。その結果、糖残基間を架橋する水分子が存在するときには、糖鎖近傍の水分子間の相互作用が強まることが示唆された。これらの結果から、G1M9 糖鎖のグルコース残基は、周囲の水分子の構造化を促すために重要であることが考えられる。

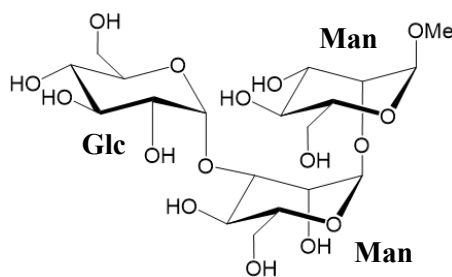


Figure 1. Representation of the Glc α 1-3Man α 1-2Man α trisaccharide

膜から出芽する人工ウイルスキャプシドの創製

(鳥取大院工) ○松浦 和則・平原 未海・坂本 健太郎・古川 寛人・稲葉 央

Creation of Artificial Virus Capsids Budding from Membranes (*Graduate School of Engineering, Tottori University*) ○Kazunori Matsuura, Miu Hirahara, Kentaro Sakamoto, Hiroto Furukawa, Hiroshi Inaba

Enveloped viruses are budded the nucleocapsid structure by covering lipid bilayer from host cell. We have previously created artificial viral capsids by self-assembly of β -annulus peptide derived from tomato bushy stunt virus. In this study, we developed an artificial viral capsid bearing alkyl anchor on the external surface. When the artificial viral capsid bearing alkyl anchor was added to outside giant liposome comprising of POPC, budding of the capsids inside the liposome was observed. On the other hand, encapsulation of the artificial viral capsid bearing alkyl anchor in giant liposome induced budding of the capsids inside-to-outside the liposome.

Keywords : Budding; Artificial viral capsid; Alkyl anchor; Giant liposome

インフルエンザウイルスや HIV 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の周りを脂質二分子膜で覆われることで宿主細胞から出芽する。当研究室では、Tomato bushy stunt virus 由来の 24 残基 β -Annulus ペプチドを水中で自己集合させることで、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⁾。最近、表面がアニオン性の人工ウイルスキャプシドとカチオン性脂質二分子膜の複合化により、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²⁾。本研究では、アルキルアンカーを外部表面に有する人工ウイルスキャプシドを構築し、ジャイアントリポソーム(GUV)に添加することで、膜からの出芽を誘起できることを見出した(Fig.1)。

C 末端側に octyl 鎖を有する β -Annulus-SS-octyl ペプチドの自己集合により、アルキルアンカーを有する人工ウイルスキャプシドを構築した。界面通過法により調製した GUV の内部と外部にそれぞれアルキルアンカーを有する TMR ラベル人工ウイルス

キャプシドを添加し、GUV の形態変化を CLSM 観察した。その結果、内側に添加した場合、GUV の周りにペプチド由来の TMR 蛍光を含む小胞が連なった像が観察された。

一方、外側に添加した場合、GUV の内部へのキャプシドの出芽が観察された。

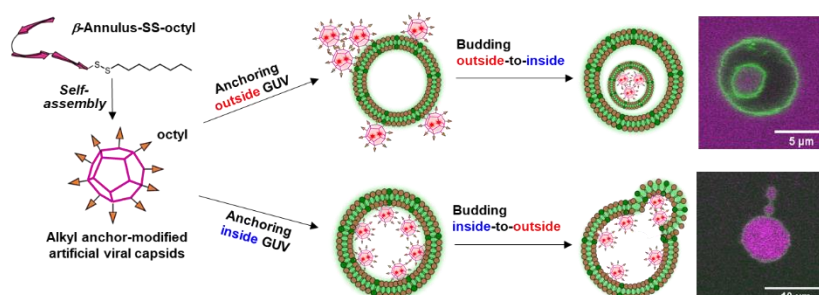


Fig. 1 Illustration and CLSM images of artificial viral capsid with alkyl anchor budding outside-to-inside and inside-to-outside of GUV.

1) K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **54**, 8944 (2018)

2) H. Furukawa et al., *Chem. Commun.*, **56**, 7092 (2020)

糖鎖の動的立体構造アンサンブルと糖転移酵素の相互作用評価法の開発

(総研大¹・分子研²・名古屋市薬³・自然科学研究機構 ExCELLS⁴・北陸先端大マテリアル⁵) ○関 健仁^{1,2,3}・山口 拓実^{3,4,5}・矢木 宏和^{3,4}・加藤 晃一^{1,2,3,4}

Development of a Method for Evaluating Interactions between Glycosyltransferases and Dynamic Conformational Ensembles of Glycans (¹*The Graduate University for Advanced Studies, SOKENDAI*, ²*Institute for Molecular Science*, ³*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University*, ⁴*Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), National Institutes of Natural Sciences*, ⁵*School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology*) ○Takehito Seki,^{1,2,3} Takumi Yamaguchi,^{3,4,5} Hirokazu Yagi,^{3,4} Koichi Kato,^{1,2,3,4}

Glycan dynamics significantly influence enzyme reactivity in glycan biosynthesis. Existing methods to assess these dynamics are limited, prompting the development of a computational approach. Our method focuses on analyzing interactions between glycosyltransferases and highly flexible glycans. Using a model system with a tri-antennary glycan **1** and glucuronyltransferase (GlcAT), we observed varying reactivity across branches despite a shared Galβ1→4GlcNAc unit. Molecular dynamics simulation revealed diverse conformation of glycan **1**. Integrating this ensemble with the crystal structure of GlcAT, we created a complex model. Assessing steric hindrance between glycan **1** and GlcAT, we successfully estimated differences in GlcAT reactivity among glycan branches. This methodology offers a valuable framework for exploring the intricate relationship between glycan conformational dynamics and enzyme reactivity, shedding light on the complexity of glycan biosynthesis processes.

Keywords : *Molecular Dynamics Simulation; Glycan; Glycosyltransferase*

糖鎖の3次元構造は水溶液中で激しく揺らいでおり、そのダイナミクスは生体内分子認識に重要な役割を担っている。糖鎖は、様々な糖転移酵素の作用により生合成されるため、糖鎖の揺らぎは酵素の反応性にも影響を及ぼしていると考えられる。しかし、酵素の反応性を理解する上で、糖鎖の構造ダイナミクスを考慮する手法は現状限られている。そこで我々は、グルクロン酸転移酵素 (GlcAT) による3分岐糖鎖 **1** (Figure 1) への糖転移反応をモデルとして、動的な糖鎖と糖転移酵素の相互作用を計算科学を用いて評価する手法の開発を試みた。糖鎖 **1** は3つの分岐鎖末端に共通の Galβ1→4GlcNAc ユニットを持ち (Figure 1)、各枝に対する GlcAT の反応速度は一樣ではないことが報告されている (Yagi et al. *Open Glycoscience*, 2008, **1**, 8-18.)。

本手法では、糖鎖 **1** について、網羅的な構造サンプリングを行うために分子動力学計算を行った。これにより得られた **1** の構造アンサンブルと GlcAT の結晶構造から複合体構造をモデリングし、糖鎖-酵素間の立体障害を評価した。その結果、糖鎖 **1** の各枝に対する GlcAT の反応性の違いを見積ることに成功した。酵素反応における糖鎖のダイナミクスを考慮する本手法は、糖鎖生合成の制御メカニズムの構造基盤を理解するための有力な方法論となり得る。

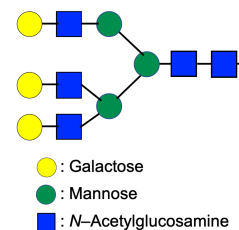


Figure 1.
The representation of tri-antennary glycan **1**.

Leishmania 原虫の糖衣糖 1-リン酸繰り返し構造の効率的な合成法の開発

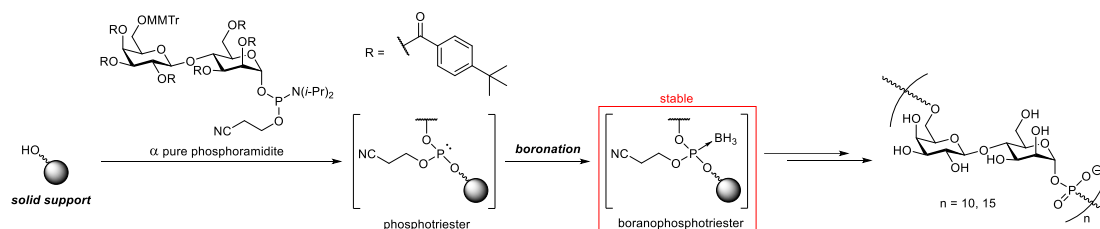
(東京理科大学薬¹) ○川戸 一輝¹・佐藤 一樹¹・和田 猛¹

Efficient synthesis of disaccharide 1-phosphate repeating structure found in lipophosphoglycan of *Leishmania* protozoa (¹Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of science) ○Kazuki Kawato, ¹Kazuki Sato, ¹Takeshi Wada¹

Leishmania has a disaccharide α -1-phosphate repeating structure on their cell surface and the structure would be an attractive target for vaccine development. We have already succeeded in synthesizing a molecule containing the five repeating units by using a disaccharide phosphoramidite building block via a glycosyl boranophosphate as a stable intermediate. However, further elongation was difficult due to the poor solubility of an α -isomer of the building block with a high anomeric purity to reaction solvents. In this study, we conducted solid-phase synthesis using highly pure α -isomer of a *t*-butylbenzoyl protected disaccharide phosphoramidite, which has improved solubility to the solvents. We successfully synthesized molecules containing ten and fifteen repeating units.

Keywords : Glycosyl phosphate; *Leishmania*; Solid-phase synthesis; Borano phosphate

Leishmania 原虫の細胞表面には、二糖 α -1-リン酸繰り返し構造が存在しており、ワクチンの候補分子として期待される。しかし、糖 1-リン酸誘導体の合成においては、合成中間体が非常に不安定であるため、鎖長の繰り返し構造の合成は困難を極める。当研究室では、核酸化学の分野で汎用されているホスホロアミダイト法を用い、安定な中間体としてボラノホスフェートを経由する合成法を開発し、*Leishmania* 原虫が有する繰り返し構造を 5 箇所含む分子の固相合成に成功した¹。しかし、立体化学純度の高い α 体の二糖ホスホロアミダイトは反応溶媒への溶解性が低く、さらなる鎖長伸長が困難であった。本研究では、糖水酸基の保護基として *t*-ブチルベンゾイル基²を有し、反応溶媒への溶解性が向上した二糖ホスホロアミダイトを合成した後、高純度に精製した α 体のみを用いて固相合成を行った。これにより、繰り返し構造を 10 箇所および 15 箇所含む分子の合成に成功した。



- 1) Sato, K. *et al. Org. Lett.* **2023**, 3927–3931.
- 2) Asano, S. *et al. Org. Lett.* **2019**, 21, 4197–4200.

外部刺激に応答したリポソームの非対称膜形成システムの開発とタンパク質集積への応用

(群馬大院理工) ○李 水民・神谷 厚輝

Development of formation system of lipid asymmetry in liposomes by external stimulations and protein accumulation in asymmetric liposomes (*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Sumin Lee, Koki Kamiya

Asymmetric lipid vesicles that emulate cellular membrane composition have been used to understand cellular functions. We develop a system to convert lipid symmetry to lipid asymmetry of liposome membranes by external stimulations. In this system, phospholipase D (PLD)-cording riboswitch and cell-free protein synthesis systems are encapsulated into PC symmetric liposomes. When a chemical signal is added to the outer solution, the expressed PLD hydrolyze PC to PA in the inner leaflet. This system converting symmetric liposomes to asymmetric liposomes has the potential to observe consecutive phenomena caused by lipid asymmetry. Furthermore, we investigated accumulation of proteins on the liposome membrane using this system. We demonstrated the control of the protein accumulation by the PLD enzymatic function.

Keywords : lipid asymmetry vesicles; cell-free protein synthesis systems; riboswitch

真核生物の細胞膜は内側と外側で構成するリン脂質の組成が異なるという非対称性をもつことが特徴的であり、非対称膜に起因する細胞機能を解明するため、細胞膜の組成を模倣した非対称膜リポソームを用いた研究が盛んに行われている。本研究では、対称膜リポソームを外部刺激によって非対称膜リポソームへと変換するシステムを開発することで、連続的な観察による非対称の機能の追跡が可能になると考えた。

フッ素イオンに応答して遺伝子発現を制御するリボスイッチ DNA¹⁾の下流に、ホスファチジルコリン (PC) をホスファチジン酸 (PA) に加水分解する酵素であるホスホリパーゼ D (PLD) をコードすることで、非対称膜形成システムの構築を目指した (Fig.1A)。無細胞タンパク質発現系を封入した PC 対称膜リポソームを作製し、外液に NaF を添加することで PLD が発現して、内側が PA の非対称膜リポソームに変換することを観察した (Fig.1B)。さらにこのシステムを応用し、タンパク質の膜集積を外部刺激によって制御できることを実証した。

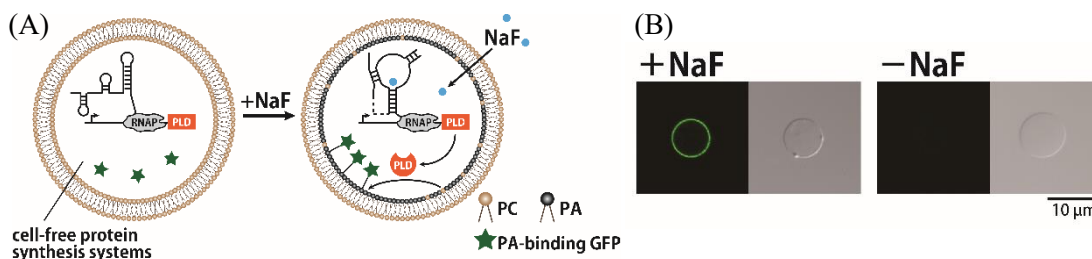


Fig.1 リポソームの非対称膜形成システムの模式図 (A) と顕微鏡画像 (B)

1) Boyd et al., Sci. Adv. 9, eadd6605 (2023)

脂質-タンパク質非対称膜の張力変化による機械刺激依存性チャネルを介した分子輸送観察

(群大院理工¹) ○馬場 康太郎¹・鈴木 允人¹・神谷 厚輝¹

Molecular transports via mechanosensitive channel by the changes in tension of asymmetric lipid-protein membrane (¹*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*)

○Kotaro Baba,¹ Masato Suzuki,¹ Koki Kamiya¹

Asymmetric lipid-protein vesicles containing phospholipids and amphiphilic proteins (oleosin) in the outer and inner leaflets, respectively¹⁾, allow for protein accumulation on the inner leaflets. Mechanosensitive channel of large conductance (MscL) nanopores reconstituted into these vesicles can transport 10 kDa molecules by changes in membrane tension due to the insertion of lysophosphatidylcholine (LysoPC) into the lipid leaflets. In this study, to create the membrane tension sensing system that converts the changes in membrane tension into the biomolecular transports into the vesicles, we demonstrated a recovery of protein function by peptide transports into the asymmetric lipid-oleosin vesicles via MscL (Fig.1a). As a result, when LysoPC and sfGFP₁₁ (β -strand 11) were added to the outer solution of MscL reconstituted asymmetric lipid-oleosin vesicles containing sfGFP₁₋₁₀, the number of fluorescent vesicles were increased compared to without LysoPC (Fig.1b). Therefore, we have succeeded in the conversion of the changes in membrane tension into the peptide transports into the asymmetric lipid-oleosin vesicles.

Keywords : *Asymmetric lipid-protein vesicles; Mechanosensitive channels; Artificial cell model*

脂質-タンパク質非対称膜小胞は外膜がリン脂質、内膜が両親媒性タンパク質オレオシンから構成され¹⁾、内膜上へのタンパク質集積が可能である。この小胞に再構成された、大腸菌由来の機械刺激依存性チャネル MscL は、脂質膜に LysoPC を挿入して生じる膜張力の変化を感知して物質を輸送する。本研究では、膜張力の変化を MscL を介した脂質-タンパク質非対称膜小胞内への生体分子輸送に変換することで、膜上に集積したタンパク質との相互作用による効率的な酵素反応の起動を目指す。今回は、Split-GFP の蛍光回復システムを利用し、sfGFP₁₋₁₀ を封入した非対称膜小胞内への、MscL を介した sfGFP₁₁ の輸送観察を行った(Fig.1a)。その結果、LysoPC を添加することで GFP 由来の蛍光を持つ小胞数が増加したことから、膜張力を感知した MscL による脂質-タンパク質非対称膜小胞内へのペプチド輸送に成功した(Fig.1b)。

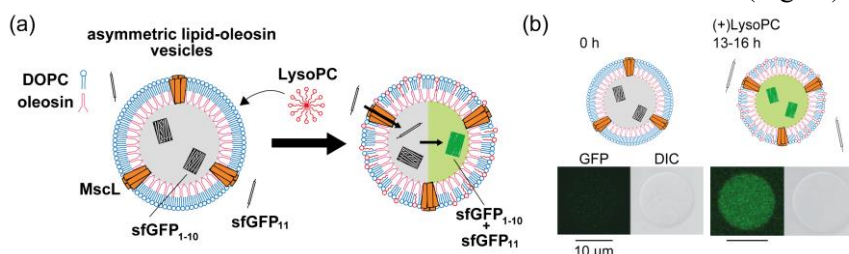


Fig.1 MscL を介した非対称膜小胞内へのペプチド輸送観察実験の(a)概略図と(b)結果
1) M. Suzuki, and K. Kamiya, *iScience*, 26, 106086 (2023)

両親媒性タンパク質膜による小胞膜上でのタンパク質集積

(群馬大院理工¹) ○鈴木 允人¹・神谷 厚輝¹

Protein accumulation on the vesicle membranes with the amphiphilic protein layer (¹*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Masato Suzuki,¹ Koki Kamiya,¹

Liposomes composed of a phospholipid bilayer have been used for the studies of artificial cell models because of the similar properties of cell membranes (function of membrane protein and membrane fluidity). Recently, vesicles formed by amphiphilic proteins have been reported. An advantage of protein vesicles is the modification of membrane properties by genetic recombination technologies. In this study, we formed two types of asymmetric vesicles composed of different shapes of amphiphilic proteins on the inner leaflet and phospholipids on the outer leaflet using a droplet transfer method. First, we measured the protein membrane fluidity of the lipid-protein vesicles and discussed the effect of the difference in protein shape on the difference in protein-membrane fluidity. Finally, we investigated the methods for protein accumulations on the inner leaflet of the vesicles using a chemically inducible dimerization (CID) system through the amphiphilic proteins (Figure 1).

Keywords : *Liposomes; Amphiphilic protein; Protein accumulation; Artificial cell model*

リン脂質二重膜からなるリポソームは膜流動性、膜タンパク質再構成可能などの細胞膜と酷似した性質を持つことから人工細胞研究に応用されている。近年、両親媒性タンパク質で構成された小胞が多く報告されている。タンパク質小胞の大きな利点として、遺伝子組み換え技術による膜の性質の改変や、目的タンパク質の付加が可能な点があげられる^[1]。今回、私たちは二種類の両親媒性タンパク質を用いて内膜をタンパク質、外膜をリン脂質で構成した非対称膜小胞を形成した。まず、形状の異なる二種類の両親媒性タンパク質から内膜を構成する脂質-タンパク質小胞を界面通過法によって作製した。次に、脂質-タンパク質小胞の膜流動性を測定し、二種類の両親媒性タンパク質分子の形状の違いによる膜流動性の差異を観察した。最後に両親媒性タンパク質を介した **chemically inducible dimerization (CID)**による小胞内膜上でのタンパク質集積法の検討を行った(Figure 1)。

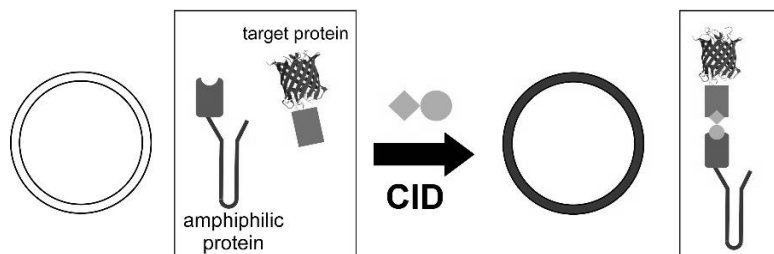


Figure 1. 両親媒性タンパク質を介した小胞膜上でのタンパク質集積

[1] D. R. Dautel, J. A. Champion, *Biomacromolecules* **2021**, 22, 116–125.

両親媒性タンパク質を用いた脂質混在膜の作成

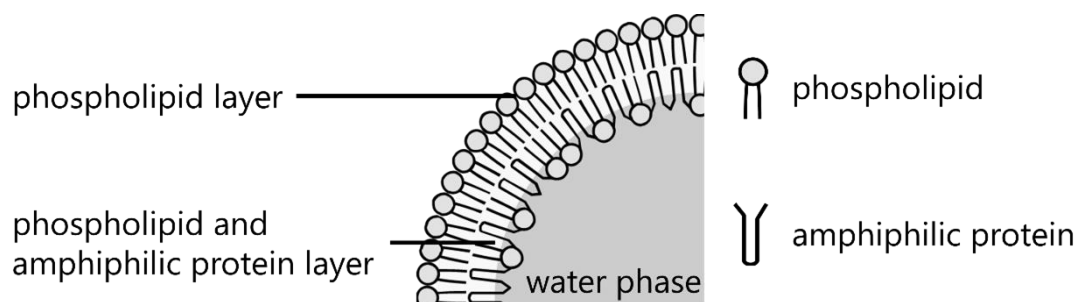
(群馬大理工¹・群馬大院理工²) ○長井 佑樹¹・神谷 厚輝²

Formation of membranes co-existing phospholipids and amphiphilic proteins (¹*School of Science and Technology, Gunma Univ.* ²*Graduate School of Science and Technology, Gunma Univ.*) ○Yuki Nagai¹, Koki Kamiya²

Cell-sized asymmetric phospholipid-amphiphilic protein vesicles that are composed of a phospholipid membrane in the outer leaflet and an amphiphilic protein membrane in the inner leaflet are formed. A vesicle membrane that co-exists in a phospholipid bilayer and an asymmetric phospholipid-amphiphilic protein bilayer will contribute to determining whether biomolecules are functionalized by which of the two types of bilayers. In this study, we generated asymmetric membrane vesicles containing the phospholipids and amphiphilic proteins in the inner leaflet and the phospholipids in the outer leaflet by applying the method for creating asymmetric phospholipid-amphiphilic protein vesicles by transferring emulsions formed from amphiphilic proteins through a lipid monolayer. In the presentation, we will report on the behavior of membrane proteins in response to the asymmetric membrane vesicles.

Keywords : *phospholipid; amphiphilic protein; vesicle*

内膜が両親媒性タンパク質、外膜がリン脂質から構成されるリン脂質-両親媒性タンパク質非対称膜ベシクルの形成に成功している¹⁾。このベシクルは、タンパク質小胞とリポソームの利点をもつ。このベシクルの膜構造とリポソームの膜構造を組み合わせた、リン脂質二重膜とリン脂質-両親媒性タンパク質非対称膜が共存した膜は、どちらの膜で生体分子が機能し易いかを検討できることが期待される。本研究は、両親媒性タンパク質から形成されるエマルションをリン脂質平面膜に界面通過させて非対称膜ベシクルを作成する方法を改良し、内膜が両親媒性タンパク質とリン脂質、外膜がリン脂質から構成される非対称膜ベシクルを形成した。当日は、この非対称膜ベシクルへ膜タンパク質の再構成を行い、その機能の観察も報告する予定である。



- 1) Cell-sized asymmetric phospholipid-amphiphilic protein vesicles with growth, fission, and molecule transportation, M. Suzuki, K. Kamiya, *iScience*,. **2023**, 26, 3.

Formation of cell-encapsulating gel with azide-modified hyaluronic acid and water-soluble cyclooctadiyne

(¹Grad. School of Eng., Tokyo Univ. of Agri. and Tech., ²Grad. School of Eng., Tokyo Univ.)

○ Alejandra Liliana Hernandez Paniagua¹, Fumiya Satoh¹, Takumi Aono², Yuta Iijima¹, Natsuko Inagaki², Taichi Ito², Daisuke Yoshino¹, Masayuki Tera¹

Keywords: Bio-orthogonal reaction, 3D culture, Spheroid, Hydrogel, Hyaluronic Acid

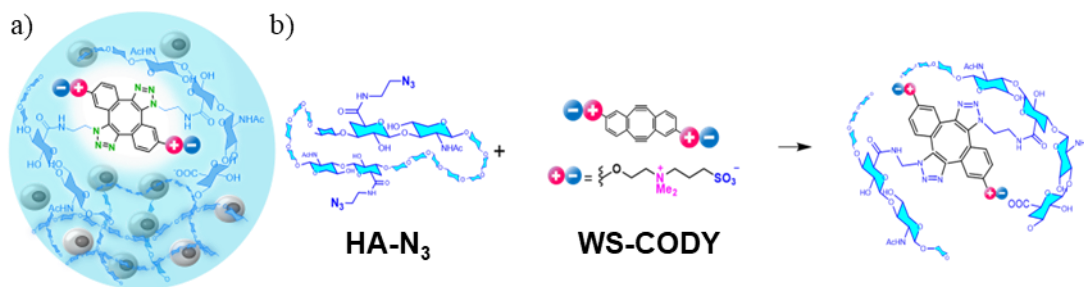


Figure 1: (a) Schematic representation of the hydrogel structure encapsulating cells, formed by crosslinking azide-modified hyaluronic acid (HA-N₃) with water-soluble cyclooctadiyne (WS-CODY). (b) Depiction of the chemical crosslinking reaction between HA-N₃ and WS-CODY.

Cell encapsulation technologies have emerged as key tools for replicating the intricate interplay between cells and their extracellular matrices, driving advances in organ model development and pharmaceutical screening. However, traditional approaches have been limited by the inherent cell adhesion properties of the cell types used. To overcome this limitation, we have developed novel extracellular scaffolds by combining azide-modified hyaluronic acid (HA-N₃) with water-soluble cyclooctadiyne (WS-CODY)¹, which serves as a bioorthogonal reagent for crosslinking two azide groups in aqueous solutions (Figure 1).

In this study, we demonstrated that mixing WS-CODY (1 mM) with HA-N₃ (0.75%) and a cell suspension, followed by its introduction into a hemispherical Teflon mold, yields a homogeneous cell-encapsulating hydrogel, limited only by the confines of the mold. The gel matrix forms independently of the native adhesion capabilities of the cells and exhibits permeability to small molecules and proteins. In addition, we have shown that our encapsulation protocol not only promotes cell proliferation, but also ensures robust cell viability; over 90% of encapsulated cells remain functional after 72 hours, with cell survival confirmed after 20 days (Figure 2). Notably, the scaffold can be dissolved using hyaluronidase, allowing gentle recovery of the encapsulated cells without compromising their integrity. Through this methodology, we propose a versatile scaffold that can be seamlessly integrated with different cell types, increasing the utility of cell encapsulation in biomedical applications.

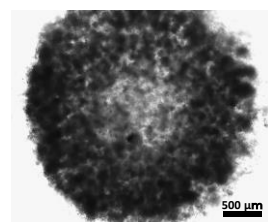


Figure 2: Image of the spheroid of PC-9 cells using our encapsulation method, at day 20.

Reference

¹ K. Kitagawa, F. Satoh, M. Tera, et al. (2023) Ion-Pair-Enhanced Double-Click Driven Cell Adhesion and Altered Expression of Related Genes *Bioconjugate Chem.* 34 (4), 638-644.

フロー法を用いた迅速糖ペプチド合成法の開発

(阪大院理¹・阪大院理フォアフロント研究センター²・マサチューセッツ工科大学化学学科³) ○山口 真太郎¹・真木 勇太¹・岡本 亮^{1,2}・Bradley L. Pentelute³・梶原 康宏^{1,2}

Development of rapid flow-based glycopeptide synthesis (¹*Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.*, ²*FRC, Grad. Sch. Sci. Osaka Univ.*, ³*Dept. Chem. MIT*) Shintaro Yamaguchi¹, Yuta Maki^{1,2}, Ryo Okamoto^{1,2}, Bradley L. Pentelute³, Yasuhiro Kajihara^{1,2}

Chemical synthesis of homogeneous glycoproteins is important for investigating glycan functions. However, traditional solid-phase synthesis of glycopeptides is time-consuming and requires about 60 minutes for each peptide elongation step. The flow-based solid-phase peptide synthesis (SPPS) enables peptide elongation within 3 minutes under flow and high temperature conditions¹⁾. In our presentation, we would like to discuss our results regarding preparation of oligosaccharyl asparagine derivative and fast flow-based synthesis of glycopeptides.

Keywords : glycoprotein, peptide synthesis, flow synthesis

均一な構造の糖タンパク質を化学合成することは、糖鎖機能を解明する上で重要である。しかし、従来の糖ペプチド固相合成法はペプチド伸長に長い時間を要している。本研究では、ペプチドを高速で伸長できるフロー高速固相合成法¹⁾を利用することでアスパラギン結合型糖鎖を有する糖ペプチドの迅速な合成を検討した。

フロー合成に用いるアセチル保護した糖アスパラギン誘導体はアシアロ糖鎖アスパラギン²⁾から3段階で合成した。そして、Fmoc法によるフロー高速固相合成法を利用することで、アミノ酸25残基(AA)からなる糖ペプチドを2時間程度で合成することに成功した。



1) Mark D. Simon, *Chem. Bio. Chem.*, **2014**, 15, 713-720.

2) Kajihara, Y. *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 971-985.

化学合成法を利用したシアリル糖鎖とタンパク質間相互作用相関関係の解明研究

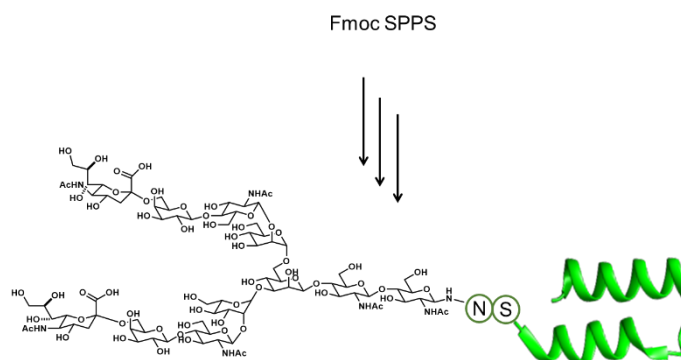
(阪大院理¹・阪大院理フォアフロント研究センター²) ○岩崎理沙¹・岡本亮^{1,2}・真木勇太^{1,2}・梶原康宏^{1,2}

Study for the elucidation of the correlation between sialylglycans and protein-protein interaction by using chemical synthesis of proteins (¹*Grad. Sch. Sci., Osaka Univ.*, ²*FRC, Grad. Sch. Sci. Osaka Univ.*) ○Risa Iwasaki,¹ Ryo Okamoto,^{1,2} Yuta Maki,^{1,2} Yasuhiro Kajihara^{1,2}

生体内の多くの分泌型タンパク質は、末端にシアル酸を有するシアリル糖鎖で修飾されている。そして、このシアリル糖タンパク質は、多様な生命現象に関わっている。最近我々は、糖タンパク質上の糖鎖が、タンパク質部分と受容体との結合親和性を変化させる機能を持つことを示す新しい知見を得た。^[1] そこで本研究では、シアリル糖鎖がタンパク質間相互作用に与える影響を明らかにする事を目的とし、新規なシアリル糖タンパク質の化学合成とその機能解析を行った。まず、土台となるタンパク質として IgG 抗体の Fc 領域に特異的に結合する小型シアリル糖タンパク質の合成を行った。Fmoc 固相合成法(Fmoc SPPS)を基盤として、11 個の単糖で構成されたシアリル糖鎖が結合した小型糖タンパク質 **1** の合成に成功した。さらにこの糖タンパク質を基質として受容体タンパク質との親和性解析を行ったところ、シアリル糖鎖によって結合親和性に有意な差が生じることを明らかにした。

Secreted proteins are frequently modified with sialylglycans and are involved in various biological events. Recently, we found that glycans affect protein binding affinity. In this study, we aimed to elucidate the effects of sialylglycans on protein-protein interactions using a newly synthesized small sialylglycoprotein. First, using Fmoc-solid phase peptide synthesis, we synthesized a small sialylglycoprotein that specifically binds to the Fc region of IgG antibodies. Analysis of the binding affinity revealed that the sialylglycan affected the binding affinity between the synthetic glycoprotein and the receptor protein.

Keywords : Glycan,; Glycoprotein; Peptide; Hydration



(Reference) [1] 第 103 回日本化学会春季年会(D1411-3am-02)

二量体化モチーフと巻き戻し法を利用した二重特異性抗体の調製法の開発

(東農工大工¹) 廣野 琳子¹・○北山 友香¹・熊谷 泉¹・浅野 竜太郎¹

Development of a preparation method of functional bispecific antibodies using dimerization motif and refolding procedure (¹*Faculty of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology*) Linko Hirono¹, ○Yuka Kitayama², Izumi Kumagai¹, Ryutaro Asano¹

Bispecific antibodies (BsAbs) consisting of two different antibodies can be applied to cancer therapies by designing to cross-link cancer cells and immuno cells. However, because the function of BsAbs is dependent on the combination of antibody clones, development of their rapid screening technology is required.

Here, we focused on SARAH motif [1], a dimerization motif with intermolecular disulfide bond. We fused each SARAH motif to two different single-chain fragment variables (scFvs). BsAb prepared from bacterial insoluble fraction through a refolding procedure after mixing stoichiometrically two scFvs under denaturing conditions showed cancer growth inhibition effects as expected.

Keywords : *dimerization motif; small bispecific antibodies; refolding procedure*

二重特異性抗体 (BsAb) は、2 種類の抗体を組み合わせで創出される人工抗体であり、がん細胞と免疫細胞を架橋するように設計することで、がん治療に応用することができる。しかしながら、用いる抗体の組み合わせに応じて活性が変化し得るため、機能的な BsAb の取得にはこれらを迅速にスクリーニングする技術が求められている。一方、一本鎖抗体 (scFv) を大腸菌で組換え発現させる際、しばしば不溶性画分からの巻き戻し法を用いた調製が余儀なくされる。そこで我々は、巻き戻し法を用いた機能的な BsAb のスクリーニング手法の開発を目指し、ジスルフィド結合を介してヘテロ二量体を形成する SARAH モチーフに注目した[1]。

まず、異なる 2 種類の一本鎖抗体 (scFv) に、システインの導入位置が異なる SARAH モチーフをそれぞれ融合させた発現ベクターを構築した。続いて、大腸菌発現系を用いて不溶性画分から変性条件下で個々に精製した後、等量混合し、巻き戻し操作を行った。得られた二重特異性抗体を評価した結果、期待するがん細胞傷害活性を有することが確認された (Fig. 1)。

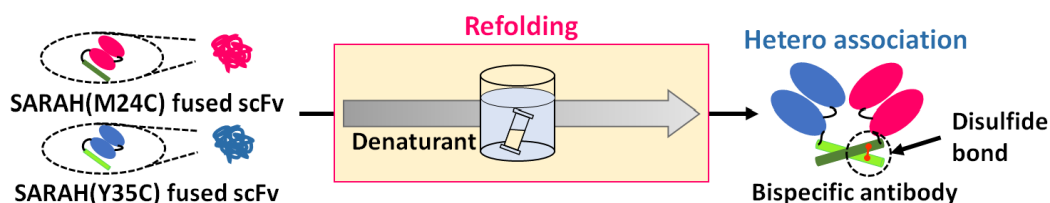


Figure 1. Preparation of BsAbs by integrating a SARAH motif and refolding

[1] Arimori *et al.*, *Structure.*, 25, 1611-1622 (2017)

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を用いた機能的な低分子二重特異性がん治療抗体の調製

(東農工大工¹・山形大理工²・ノースカロライナ大学チャペルヒル校/ノースカロライナ州立大/生命医工³)

葛西 豪太¹・○光部 美紅¹・小林 俊一¹・真壁 幸樹²・早出 広司³・浅野 竜太郎¹

Preparation of functional small cancer therapeutic bispecific antibodies using cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (¹*Faculty of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology*, ²*Faculty of Science & Engineering, Yamagata University*, ³*Joint Department of Biomedical Engineering, University of North Carolina at Chapel Hill, North Carolina State University*) Gota Kasai¹, ○Miku Kobe¹, Shunichi Kobayashi¹, Koki Makabe², Koji Sode³, Ryutaro Asano¹

To establish a cost-effective production for cancer-therapeutic small bispecific antibodies, we focused on cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PCC 6803) as a recombinant host, being able to grow via photosynthesis. In this study, we investigated the expression of two types of bispecific antibodies using PCC 6803. As the results, the bispecific antibodies composed of two variable domains of heavy chains derived from camelid heavy chain antibodies (VHHs), were produced with relatively high yield by PCC 6803, which showed cancer growth inhibition effects.

Keywords : *Cyanobacteria; Small bispecific antibody; Recombinant production*

異なる2種の抗体から生成される二重特異性抗体は、がん細胞と免疫細胞を架橋するようにデザインすることでがん治療薬となり得る。シアノバクテリアは、二酸化炭素と光、および僅かな栄養素で物質生産が可能である。そこで我々は、抗体の抗原結合部位のみで構成される低分子二重特異性がん治療抗体の安価な組換え生産を目指し、シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 株を用いた調製検討を行ってきた。本研究では、VH と VL で構成される一般的な抗体の抗原結合部位に加えて、単ドメインで結合を示すラクダ科由来の VHH 抗体を用いた検討を行った。

まず、がん細胞に結合する抗体と T 細胞に結合する抗体の VH と VL を組み合わせた低分子二重特異性抗体 (Fig. 1a) の発現ベクターを構築後、PCC 6803 株を形質転換した。SDS-PAGE 及び Western blotting による発現確認とフローサイトメトリーによる結合評価の結果、PCC 6803 による発現量は低く、生産された抗体は結合能もほとんど認められなかった。そこで、がん細胞に結合する VHH 抗体と NK 細胞に結合する VHH 抗体を組み合わせた低分子二重特異性抗体 (Fig. 1b) を同様に調製したところ、発現量が高く、また両標的細胞に対する結合能やがん細胞傷害活性が認められた。以上の結果から PCC 6803 株での生産には、VHH 抗体を組み合わせた二重特異性抗体が適していることが示された。この結果は、VHH 抗体の構造安定性に起因すると予想された。

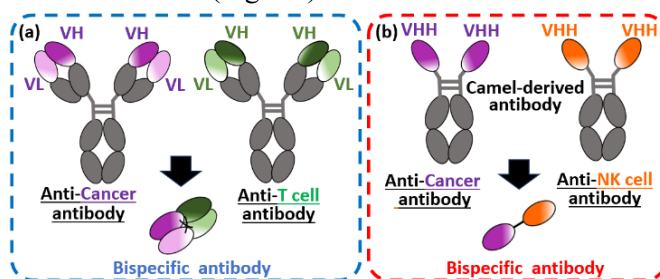


Figure 1. Schema of small bispecific antibodies

中間径フィラメントネスチンのテール領域伸展が誘起するテール結合タンパク質の解離

(産総研細胞分子工学¹・農工大院工²・東農大応生科³・阪大産研⁴) ○山岸彩奈^{1,2}・徳岡里奈^{1,2}・飯嶋益巳³・黒田俊一⁴・中村 史^{1,2}

Release of Tail-binding Proteins Induced by Stretch of Intermediate Filament Nestin (¹*Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST*, ²*Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.*, ³*Dept. Nutr. Sci. & Food Safety, Tokyo Univ. Agric.*, ⁴*SANKEN, Osaka Univ.*) ○Ayana Yamagishi,^{1,2} Rina Tokuoka,^{1,2} Masumi Iijima,³ Shun'ichi Kuroda,⁴ Chikashi Nakamura^{1,2}

Intermediate filament nestin has been reported to be highly expressed in highly invasive cancer cells, but the function of the huge 170 kDa tail domain, which is exposed outside the nestin filament, is unclear. We have shown that the C-terminus of the tail domain binds to actin filaments, and that the domain contributes to the metastatic ability of cancer cells by making them flexible through its large extensibility. We further hypothesized that the stretched tail domain has a spring-like function to restore the cytoskeleton. We have demonstrated the existence of a repeating stretching structure in the single tail domain by analysis using AFM. On the other hand, the tail domain has been reported to serve as a scaffold for binding proteins. If the tail domain is stretched by an external force, the bound proteins may be dissociated and released. We first focused on the chloride ion channel CLIC1, which regulates cell volume by exporting the ions, and found a strong correlation between CLIC1 and nestin expression. Alpha Fold2 analysis suggested that CLIC1 also binds to the tail domain. Fishing force measurement, in which anti-CLIC1 antibody-modified nanoneedles were inserted in cell to mechanically detect CLIC1, showed that CLIC1 binds to nestin. We are now confirming whether CLIC1 dissociation occurs when the tail domain is stretched by external force applied to the cell.

Keywords : *Intermediate filament; Nestin; Atomic force microscope*

中間径フィラメントのネスチンは、高浸潤性のがん細胞に高発現であることが報告されているが、ネスチン繊維本体から外部に露出している 170 kDa もの巨大なテール領域がどのような機能を持つのか不明であった。我々はテール領域の C 末端側が細胞表層のアクチン繊維に結合しており、弱い力で大きく伸展する構造を持つことで細胞を柔軟化し、がんの転移能に寄与することを明らかにしてきた。さらに、伸展したテール領域が自発的に収縮するすなわち骨格を復元するバネ様の機能を有すると考えた。我々は AFM を用い 1 分子のテール領域を繰り返し伸展する解析により、伸展-収縮を繰り返す構造が存在することを証明した。一方このテール領域は、様々なタンパク質を結合する足場となることが報告されている。外力によりテール領域が伸展するならば、これにより結合タンパク質は解離すると考えられる。まず我々は、塩化物イオンを排出し細胞の容積を調節するイオンチャネル CLIC1 に注目した。CLIC1 はネスチンとの強い発現相関が認められ、Alpha Fold2 解析によりテール領域との結合も示唆された。抗 CLIC1 抗体修飾ナノニードルを細胞内に挿入し、CLIC1 を力学的に検出する Fishing force 測定を行った結果、CLIC1 とネスチンの結合が示された。細胞への外力印加刺激によりテール領域を伸展することで、CLIC1 解離が生じるかどうか現在確認している。

Investigating antibodies as CLIC1 blockers to inhibit chloride ion channel and cancer cell invasion in human breast cancer.

(¹Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, ²Cellular and Molecular Biotechnology Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) ○Samrat Mukherjee,^{1,2} Ayana Yamagishi,^{1,2} Chikashi Nakamura^{1,2}

Keywords: Breast cancer, Monoclonal antibody, Chloride ion channel

Chloride intracellular channel 1 (CLIC1), is overexpressed in the various types of cancer cells and involved in cancer cell invasion. Previously, we found that CLIC1 is activated by the stretching of the cell membrane due to external mechanical force. The efflux of chloride ions via CLIC1 during a process known as regulatory volume decrease (RVD), leads to cell volume reduction and shrinkage of cancer cells. We hypothesized that a mechanical stress causes the cell membrane to stretch due to cell deformation as cancer cells invade through narrow spaces and thereby promoting cancer cell invasion via RVD. Based on this hypothesis, CLIC1 blockers are expected to inhibit cancer cell invasion. We investigated whether IAA-94, an inhibitor of chloride ion channel including CLIC1 can inhibit ion efflux thereby halting the invasion of human breast cancer cell line MDA-MB-231 through external force applied using atomic force microscopy. However, the IAA-94 could not inhibit chloride ion efflux induced when cells are applied a large force.

In this study, we evaluated whether an anti-CLIC1 monoclonal antibody that recognizes the transmembrane region of the CLIC1 could inhibit chloride ion efflux. The inhibition effect of CLIC1 antibodies was evaluated using MQAE, a fluorescent indicator which is quenched in the presence of chloride ions. When external force is applied using a flat cantilever with an atomic force microscope, the export of chloride ions through CLIC1 leads to an increase in fluorescent intensity. As a result, the fluorescence intensity of MQAE was lower in cells with CLIC1 antibody when mechanical force was applied compared to cells without antibody. Thus, it was shown that CLIC1 antibody can inhibit chloride ion efflux during mechanical stimulation. We are currently evaluating the effect of this antibody in inhibiting invasion of cancer cell.