

アカデミックプログラム [A講演] | 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー：口頭A講演

2024年3月18日(月) 9:00 ~ 11:20 会場 H931(9号館 [3階] 931)

[H931-1am] 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー

座長：松尾 和哉、天池 一真

◆ 日本語

9:00 ~ 9:10

[H931-1am-01]

光照射により構造にねじれを生じる分子を活用する帯電分子の細胞内送達

○森 優一郎¹、Wenting Huo¹、三木 康嗣¹、Huiying Mu¹、大江 浩一¹ (1. 京都大学)

◆ 日本語

9:10 ~ 9:20

[H931-1am-02]

ペリレン誘導体による哺乳類細胞へのタンパク質輸送

○清水 大輔¹、天池 一真²、伊丹 健一郎^{2,3} (1. 名古屋大学 理学部、2. 名古屋大学 理学研究科、3. トランスフォーマティブ生命分子研究所)

◆ 日本語

9:20 ~ 9:30

[H931-1am-03]

5-FU 担持型ナノ炭素 DDS 製剤の開発および抗がん活性

○古川 杏珠¹、掘 優香¹、豊田 昌宏²、北岡 賢³、信岡 かおる² (1. 大分大学大学院工学研究科、2. 大分大学理工学部、3. 近畿大学工学部)

◆ 日本語

9:30 ~ 9:40

[H931-1am-04]

シクロデキストリン修飾PAMAM dendrimerの合成とその脳内移行に関する検討

○田中 美帆子¹、中上 敦貴¹、立川 桃菜¹、有馬 英俊²、北岸 宏亮¹ (1. 同志社大学、2. 第一薬科大学)

◆ 日本語

9:40 ~ 9:50

[H931-1am-05]

細胞膜透過を志向した臭素化ドデカボレートの新規修飾化法開発

○山本 哲士¹、木村 睦^{1,2}、北沢 裕² (1. 信大繊維、2. 信大RISM)

◆ 日本語

9:50 ~ 10:00

[H931-1am-06]

ホウ素クラスターアニオンによる蛍光性核酸色素の膜透過性変化

○牧田 佳真¹、平井 悠哉¹、藤原 真一¹ (1. 大阪歯科大学)

10:00 ~ 10:10

休憩

◆ 日本語

10:10 ~ 10:20

[H931-1am-07]

低酸素細胞で駆動する新規BNCT用薬剤：ニトロイミダゾール修飾BPAの合成と評価

○小笹 達也¹、水谷 美優¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学)

◆ 日本語

10:20 ~ 10:30

[H931-1am-08]

細胞内チオール種を超硫黄化する試薬の開発

○岡井 翔輝¹、松尾 和哉¹、和久 友則¹、小堀 哲生¹ (1. 京都工芸繊維大学)

◆ 日本語

10:30 ~ 10:40

[H931-1am-09]

アクロレインを用いた標的タンパク質分解による選択的がん治療法の開発

○長谷川 佳奈¹、プラディプタ アンバラ¹、田中 克典^{1,2} (1. 東京工業大学・物質理工学院・応用化学系、2. 理化学研究所・開拓研究本部・田中生体機能合成化学研究室)

◆ 日本語

10:40 ~ 10:50

[H931-1am-10]

がん代謝物アクロレインを原料とした生体内金属触媒反応の検討

○奥村 昂也¹、プラディプタ アンバラ¹、張 宗哲¹、田中 克典^{1,2} (1. 東京工業大学・物質理工学院・応用化学系、2. 理化学研究所・開拓研究本部・田中生体機能合成化学研究室)

◆ 日本語

10:50 ~ 11:00

[H931-1am-11]

患者腫瘍移植モデルにおけるがん代謝産物との[3+2]付加環化反応とがん治療研究

○高橋 ゆりあ¹、寺島 一輝¹、プラディプタ アンバラ¹、田中 克典^{1,2} (1. 東京工業大学・物質理工学院・応用化学系、2. 理化学研究所・開拓研究本部・田中生体機能合成化学研究室)

◆ 日本語

11:00 ~ 11:10

[H931-1am-12]

細胞膜インナーリーフレットに特異的に局在する合成モチーフの開発

○王 笑桐¹、澤田 隼佑¹、吉川 優¹、飯島 共女¹、筒井 啓太¹、築地 真也¹ (1. 名工大院工)

◆ 日本語

11:10 ~ 11:20

[H931-1am-13]

タンパク質局在移行誘導ツールを利用した上皮成長因子受容体 (EGFR) 活性化システムの開発

○大平 修也¹、田原 海²、吉川 優²、築地 真也² (1. 名工大工、2. 名工大院工)

光照射により構造にねじれを生じる分子を活用する帯電分子の細胞内送達

(京大院工)○森優一郎・HUO WENTING・三木康嗣・MU HUIYING・大江浩一

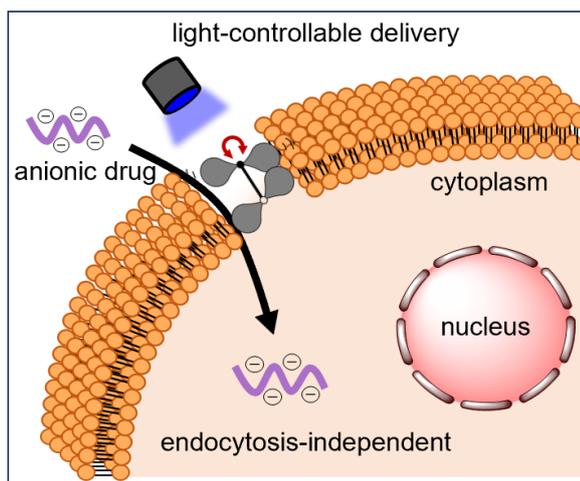
Light-Triggered Twistable Agents for Intracellular Delivery of Charged Molecules

(Graduate School of Engineering, Kyoto University) ○Yuichiro MORI, Wenting HUO, Koji MIKI, Huiying MU, Kouichi OHE

The delivery of negatively charged drugs like small interfering RNAs (siRNA) across cytoplasmic membrane are extremely difficult due to their size and hydrophilicity, and the electrostatic repulsion with cell membrane. Nevertheless, in the treatment of cancer, neurodegenerative diseases, and some rare diseases, such cell impermeable drugs have great potential. The increased cell uptake of negatively charged drugs is expected to dramatically promote the development of medicine and pharmacy. We developed a series of light-triggered twistable tetraphenylethene (TPE) derivatives which possess ionizable amino groups and hydrophobic alkyl chains to facilitate the intracellular delivery of charged molecules through disturbance of cell membrane. We investigated a role of the amino group and the length of hydrophobic alkyl chains in the attachment to the cell membrane.

Keywords : tetraphenylethene; cell membrane; light irradiation; drug delivery

siRNAのような負に帯電した薬剤は、がんや神経変性疾患の治療において大きな期待が寄せられているが、分子の大きさや親水性、負に帯電した細胞膜との静電反発などが原因で細胞内に送達することが極めて困難である。負に帯電した分子を細胞内に効率よく送達できれば医学や薬学の進歩につながると考えられる。当研究室では励起状態においてねじれた構造をとるテトラフェニルエチレン(TPE)に水溶液中で正に帯電するアミノ基と疎水性長鎖アルキル基を導入したTPE誘導体(TPE-C8-N)を開発し、このTPE-C8-Nが光照射下細胞膜を攪乱することで負に帯電した分子を細胞内へ送達できることを見出した。アミノ基の有無やアルキル鎖の長さの違いが送達効率に及ぼす影響を報告する予定である。



ペリレン誘導体による哺乳類細胞へのタンパク質輸送

(名大理¹・名大院理²・名大 WPI-ITbM³) ○清水大輔¹・天池一真²・伊丹健一郎^{2,3}
 Protein Delivery by Perylene derivatives into Mammalian cells (¹*School of Science, Nagoya University*, ²*Graduate School of Science, Nagoya University*, ³*Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University*) ○ Daisuke Shimizu¹, Kazuma Amaike², Kenichiro Itami^{2,3}

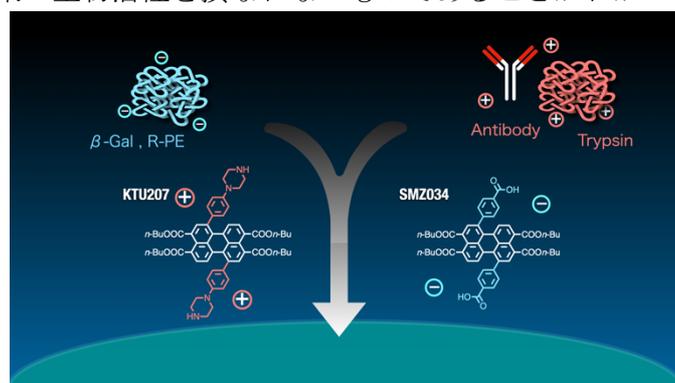
Proteins have attracted much attention in recent years as pharmaceuticals and genome editing tools. However, due to their large size and complex surface charge, it is difficult to introduce them into cells. Delivery methods using cell-penetrating peptides¹, lipid nanoparticles², and polymers³ have been reported, but there are still issues about safety and low delivery efficiency. Therefore, there is a need for the development of completely new delivery carriers.

In this study, we discovered perylene derivatives for protein delivery into mammalian cells. In this method, either cationic or anionic perylene derivatives according to the isoelectric point of a protein of interest were employed. The delivered proteins maintained their function, indicating that this method does not impair the biological activity of the protein of interest.

Keywords : Protein delivery; Molecular nanocarbon; Isoelectric point; Endocytosis; Antibody

近年、医薬品やゲノム編集ツールとしてタンパク質が注目を集めているが、その大きさや表面電荷の複雑さによって細胞内への導入が困難であることが問題になっている。これまでに膜透過ペプチド¹や脂質ナノ粒子²、ポリマー³などを担体とした輸送方法が報告されているが、安全性や低い輸送効率が課題として挙げられる。そのため全く新しい輸送担体の開発が求められている。

今回、我々は哺乳類細胞へのタンパク質輸送における新たな担体分子としてペリレン誘導体を見出した。タンパク質の等電点に合わせてカチオン性またはアニオン性のペリレン誘導体を使い分けることでタンパク質輸送が可能である。また輸送されたタンパク質は細胞質内で細胞死誘導などの本来の機能を示したことから、この輸送方法はタンパク質本来の生物活性を損なわないものであることがわかった。



1) M. Akishiba *et al. Nat. Chem.* **2017**, *9*, 751–761. 2) J. A. Zuris *et al. Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 73–80. 3) Y. Y. Cheng, *Acta Polym. Sin.* **2017**, *8*, 1234–1245.

5-FU 担持型ナノ炭素 DDS 製剤の開発および抗がん活性

(大分大院工¹・大分大理工²・近畿大³)○古川杏珠¹・堀優香¹・豊田昌宏²・北岡賢³・信岡かおる²

Designing Nano-Carbon DDS Loaded with 5-Fluorouracil (¹Graduated School of Engineering, Oita University, ²Faculty of Science and Technology, Oita University, ³Faculty of Engineering, Kindai University)○Anju Furukawa¹, Yuka Hori¹, Masahiro Toyoda¹, Satoshi Kitaoka², Kaoru Nobuoka¹

We have studied the application of carbon materials to drug delivery system (DDS), especially the DDS for anti-cancer drugs. The nano-sized carbon with cisplatin derivatives specifically accumulated in the tumor cells via the EPR effect and exhibited anti-cancer activity. Then we investigated the incorporation of 5-FU into the nano carbons. The nano carbons conjugated with 5-FU via amide bonds showed low cytotoxicity against Hela cells. In the present study, we investigated the loading of 5-FU to nano carbon materials via ester bonds and disulfide bond for effective release of the drug.

Keywords : Drug Delivery System; Nano Carbon Materials

我々のグループでは DDS キャリアとしてのナノ炭素材料の応用に取り組んでおり、これまでに抗がん剤であるシスプラチンを搭載した DDS 製剤を報告した。続いてシスプラチンと並用して用いられる 5-FU の DDS 製剤化を試みたが、接合部構造にアミド結合を用いたため十分な抗がん活性を得られなかった。そこで本研究ではエステル結合 (DDS1, Fig.1(a)) や、生体中のグルタチオンにより切断されるジスルフィド結合 (DDS2, Fig.1(b)) を用いた DDS 製剤を合成した。DDS2 は、低濃度でも GSH を等量以上添加することで抗がん活性が確認でき、グルタチオン添加によるジスルフィド結合の切断効率の向上を確認した。発表では DDS1 についても合わせて報告する。

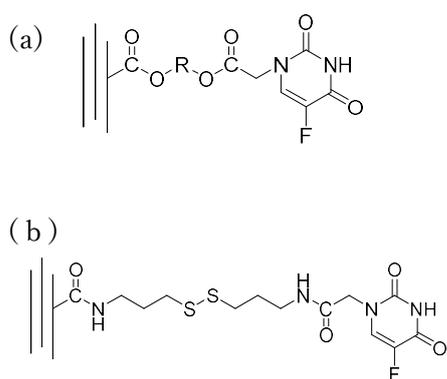


Fig.1 DDS1(a) and DDS2(b).

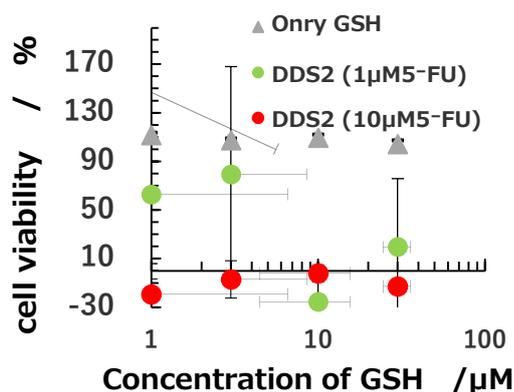


Fig. 2 Dependence of GSH Concentration on the Cytotoxic effect of Hela cells. (Assay Conditions: 72 h, 37°C, 5% CO₂)

シクロデキストリン修飾 PAMAM デンドリマーの合成とその脳内移行に関する検討

(同志社大理工¹・第一薬科大²) ○田中美帆子¹・中上敦貴¹・立川桃菜¹・有馬英俊²・

北岸宏亮¹

Synthesis of cyclodextrin modified PAMAM dendrimer and its transfer into the brain

(¹Faculty of Science and Engineering, Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Doshisha University, ²Daiich University of Pharmacy) ○Mihoko Tanaka¹, Atsuki Nakagami¹, Momona Tatsugawa¹, Hidetoshi Arima², Hiroaki Kitagishi¹

The number of patients with Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases is increasing worldwide due to lifestyle changes and aging populations. However, there is currently no permanent cure in the biomedical field, and research for the development of therapeutic agents is being conducted worldwide. One of the reasons for the difficulty in treatment is the presence of the blood-brain barrier (BBB). Our brain is equipped with a mechanism that controls the penetration of substances called the BBB, which makes drug delivery to the brain very difficult. While all substances are known to be difficult to penetrate, PAMAM dendrimers have been found to be permeable to the BBB due to their unique structure. In addition, the glucose transporter (GLUT1) expressed in brain endothelial cells has been shown to take up sugar into the brain, and among them, lactose-modified nanocarriers were found to have a high delivery rate into the brain. Therefore, we synthesized a novel drug delivery carrier (3G den-CD-Lac-FITC) by modifying 3GPAMAM dendrimer with β -cyclodextrin, lactose and FITC. Furthermore, animal experiments were conducted to study the delivery of the carriers in the brain.

Keywords : cyclodextrin, dendrimer, blood brain barrier, drug delivery, drug delivery carrier

アルツハイマー型認知症をはじめとする神経変性疾患は、生活習慣の変化や高齢化に伴い、世界的に患者数が増加している。しかし、現在のところ生物医学の分野で恒久的な治療法は存在しておらず、治療薬開発に向けた研究が世界中で行われている。

治療が困難な原因として、血液脳関門 (BBB) の存在が挙げられる。我々の脳には BBB と呼ばれる物質の透過を制御する仕組みが備わっており、これにより脳への薬剤送達是非常に困難である。あらゆる物質が透過困難であることが知られる中、PAMAM デンドリマーはその特異的な構造により BBB 透過性が認められてきた¹。また、脳内皮細胞に発現されるグルコーストランスポーター (GLUT1) は糖を脳内に取り込むことが分かっており、中でもラクトース修飾ナノキャリアは脳への高い送達率をもつことが明らかとなった²。そこで、本研究では 3G PAMAM デンドリマーに薬物送達分子としての機能を有する β シクロデキストリン、ラクトース、そして蛍光物質 FITC を修飾させた新規のドラッグデリバリーキャリア 3G den-CD-Lac-FITC (Figure 1) を合成し、さらに動物実験によりキャリアの脳内送達についての検討を行った。

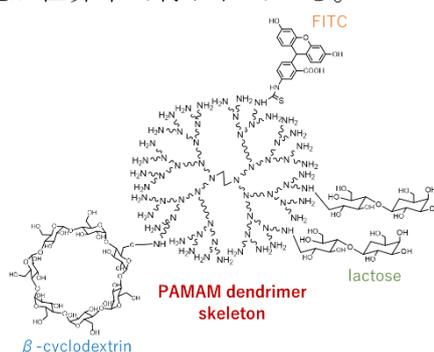


Fig. 1. Structure of 3G den-CD-Lac-FITC.

1) V. Leiro, S. D. Santos, A. P. Pêgo, *Adv. Funct. Mater.*, **2018**, 28, 1700313.

2) R. Yokoyama, T. Taharabaru et al., *J Control Release.*, **2020**, 328, 722.

細胞膜透過を志向した臭素化ドデカボレートの新規修飾化法開発

(信大繊維¹・信大 RISM²) ○山本 哲士¹・木村 睦^{1,2}・北沢 裕²

Development of New Molecular Design Based on Brominated Dodecaborate Anion Towards the New Membrane Transport Carrier

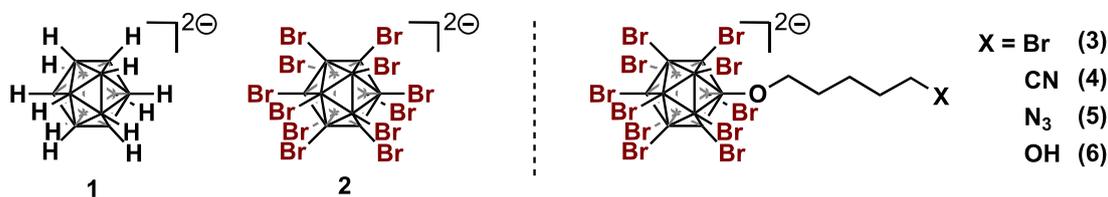
^{(1)Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, ²Research Initiative for Supra-Materials) ○Satoshi Yamamoto,¹ Mutsumi Kimura,^{1,2} Yu Kitazawa²}

Polyhedral *closo*-dodecaborates $B_{12}X_{12}^{2-}$ have attracted attention because of their chaotropic nature in the field of membrane transport carriers. To extend the utility of this new transport mechanism, versatile derivatization of globular boron clusters is important; however, it has thus far generally been limited to simple halogenation. In this work, we developed a new molecular design based on the linkage approach, which achieves the control of solubility and affinity to biological molecules.

Keywords: Dodecaborate, Membrane transport, Chaotropic

ドデカボレート ($B_{12}H_{12}^{2-}$ **1**) は負電荷を 2 個有するアニオン性ホウ素クラスター分子である⁽¹⁾。近年ハロゲン化ドデカボレート (臭素化体 **2**) がカオトロピック性を発現し、新規細胞膜透過法に応用できることが報告されている⁽²⁾。しかし、現状ではすべての頂点がハロゲン化された単純な分子設計での検討に限られており、透過させることができるカーゴ (細胞膜透過させたい分子) も低分子に限定されている。「カオトロピック性膜透過法」の一般性を拡張する上で重要になるのが、ハロゲン化ドデカボレートに対して置換基を付与することによる機能化である。本研究では、臭素化ドデカボレートに着目し、アルキル鎖を介して種々の官能基を導入したリンカー型分子を開発したので報告する。

まず、前駆体となる水酸化体 ($B_{12}Br_{11}OH^{2-}$) の新規合成法を開発し、既存の方法と比較して選択的かつ高収率を達成した⁽³⁾。種々検討の結果、塩基存在下、 $B_{12}H_{11}OH^{2-}$ に対してアルキルブロミドを反応させることで、末端に臭素を有するリンカー体 (**3**) を合成できることを見出した。さらに、**3** と種々の求核剤を作用させることで末端にシアノ基 (**4**)、アジド (**5**)、水酸基 (**6**)、など様々な官能基の導入が可能であった。さらに、水に対して高い溶解性を示す水酸化体 **6** に着目して、細胞膜透過性能や細胞毒性を評価したので、併せて報告する。

(1) Spokoyny, A. M. *et al. Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 2333–2350.(2) Nau, W. M. *et al. Nature* **2022**, *603*, 637–642.(3) Nau, W. M. *et al. Org. Lett.* **2022**, *24*, 9184–9188.

ホウ素クラスターアニオンによる蛍光性核酸色素の膜透過性変化

(大阪歯科大学) ○牧田 佳真・平井 悠哉・藤原 眞一

Membrane Permeability Changes of Fluorescent DNA-Staining Dyes by Boron Cluster Anions
(Osaka Dental University) ○Yoshimasa Makita, Yuya Hirai, Shin-ichi Fujiwara

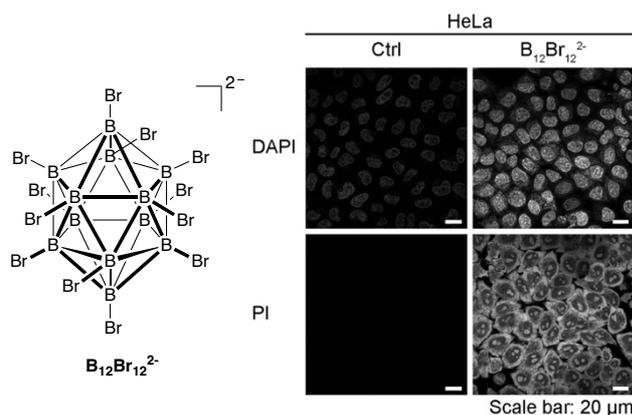
Dodecaborate clusters ($B_{12}X_{12}^{2-}$), one of boron clusters, form stable icosahedral dianions, and are widely used in pharmaceuticals and functional materials. Recently, it was reported that $B_{12}Br_{12}^{2-}$ exhibits strong chaotropic properties and has a new function of penetrating cell membranes when mixed with membrane-impermeable small molecules¹.

We focused on fluorescent nucleic acid dyes to examine the effect of $B_{12}Br_{12}^{2-}$ on the membrane permeability of cationic small molecules. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and Propidium iodide (PI) are generally used for nuclear staining of dead cells because they have difficulty penetrating the cell membranes of living cells. It was found that when $B_{12}Br_{12}^{2-}$ is mixed with DAPI or PI at the time of addition, it penetrates the cell membrane of living cells². On the other hand, it was found that the fluorescence of the membrane-permeable fluorescent dye Acridine orange is extinguished when mixed with $B_{12}Br_{12}^{2-}$.

Keywords: Boron Cluster Anions; Membrane Permeability; Fluorescent Dyes

ホウ素クラスターの一つドデカボレートクラスター ($B_{12}X_{12}^{2-}$) は、安定な正二十面体構造のジアニオンを形成することから、医薬品や機能材料に広く利用されている。ごく最近、 $B_{12}Br_{12}^{2-}$ が強いカオトロピック性を示し、膜不透過な小分子と混合することで細胞膜を透過する新たな機能が報告された¹。

我々は $B_{12}Br_{12}^{2-}$ がカチオン性の小分子の膜透過性に与える影響を検討するために、蛍光性核酸色素に着目した。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) や Propidium iodide (PI)は生細胞の細胞膜を透過しにくいことから、一般に死細胞の核染色に用いられている。 $B_{12}Br_{12}^{2-}$ を DAPI や PI の添加時に混合すると、生細胞の細胞膜を透過することが明らかとなった²。一方、膜透過性の蛍光色素 Acridine orange は $B_{12}Br_{12}^{2-}$ を混合すると、蛍光が消光することが明らかとなった。



- 1) A. Barba-Bon, G. Salluce, I. Lostalé-Seijo, K.I. Assaf, A. Hennig, J. Montenegro, W.M. Nau. *Nature* **2022**, *603*, 637.
- 2) Y. Hirai, Y. Makita, J. Asaoka, Y. Aoyagi, A. Nomoto, H. Okamura, S. Fujiwara. *ACS Omega* **2023**, *8*, 35321.

低酸素細胞で駆動する新規 BNCT 用薬剤：ニトロイミダゾール修飾 BPA の合成と評価

(青学大理工¹) ○小笹 達也¹・水谷 美優¹・西原 達哉¹・田邊 一仁¹

Novel BNCT agents driven by hypoxic cells: preparation and evaluation of BPA derivatives with nitroimidazole unit (¹Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) ○Tatsuya Ozasa,¹ Miu Mizutani,¹ Tatsuya Nishihara,¹ Kazuhito Tanabe¹

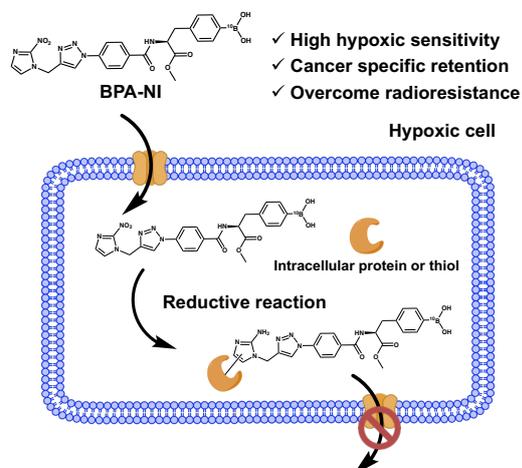
Hypoxic cells are formed in solid tumor and are known to cause cancer malignancy and radioresistance. BNCT is the fifth cancer therapy that utilizes nuclear reactions between boron atoms and thermal neutrons. However, drugs for BNCT that target hypoxic cells have not yet been developed. In this study, we coupled the nitroimidazole (NI) group, which has the property of accumulating in hypoxic cells, and BPA, a drug for BNCT by click reaction. The synthesized compound, BPA-NI showed high cytotoxicity activity in hypoxic cells upon thermal neutron irradiation.

Keywords : Hypoxic Cell; Click Chemistry; Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)

ホウ素中性子補足療法 (BNCT) は、ホウ素原子と熱中性子との間で起こる核反応を利用するがん治療法であり、患者へのダメージの少ない治療法として注目が集まっている。現行の BNCT では、ボロノフェニルアラニン (BPA) 等の薬剤を用いて、治療を行うが、既存薬剤のがん細胞に対する滞留性の低さが指摘されており、その解決は喫緊の課題である。そこで本研究では、がんで形成される低酸素細胞に着目し、低酸素細胞に集積する性質を持つニトロイミダゾール (NI) 基を BPA に導入して、低酸素細胞に蓄積特性をもつ BNCT 薬剤を創出することを目指した。NI 基は低酸素細胞内で選択的に還元された後、細胞内タンパク質と結合することで低酸素細胞に蓄積する。これまでに様々な低酸素集積分子に導入されている機能性官能基である。

NI 基の BPA への導入には Huisgen 反応を活用した。BPA のアミノ基にベンジルアジド基を導入した後、アセチレン基を導入した NI 基と銅触媒存在下で縮合した。得られた BPA-NI は NMR および MS スペクトルを用いて同定した。

次に、BPA-NI を用いた中性子照射による殺細胞効果の評価を行った。BPA-NI をヒト扁平上皮がん細胞 SAS に投与し、各酸素濃度 (有酸素: O₂ 21%、低酸素: O₂ 0.3%) で培養した。続いて、熱中性子線を照射したところ、低酸素細胞では高い殺細胞効果を示した一方、有酸素細胞では、その効果は限定的であった。この結果は、BPA-NI が低酸素細胞に選択的に蓄積し、中性子線の照射下で毒性を発現したことを示している。



細胞内チオールを光ケージド超硫黄化する試薬の開発

(京工織大¹) ○岡井 翔輝¹・松尾 和哉¹・和久 友則¹・小堀 哲生¹
 Development of Photocaged Persulfidation Reagents (¹Kyoto Institute of Technology) ○Shoki Okai,¹ Kazuya Matsuo,¹ Tomonori Waku,¹ Akio Kobori¹

Recent progress in bioanalysis technology has revealed that supersulfide species (R-S_n-H) with sulfur catenation have a significant role in sulfur respiration. They are also key regulators in redox environments and antioxidant activity *in vivo*, since supersulfide species work as not only nucleophiles but also electrophiles. However, few chemical tools have been reported to analyze and regulate supersulfide species in cells due to their intrinsic instability.

Here, we report our photocontrollable tool “Al-caged-Py” for the persulfidation of thiols based on photocaged and bioconjugation chemistry. Using Al-caged-Py, reduced glutathione (GSH) and thiol groups on in-cell proteins were efficiently converted into photocaged persulfide molecules, which released persulfides by irradiation of 405 nm of light.

Keywords : thiols; supersulfidation; photocaged chemistry; bioconjugation chemistry;

近年の生体解析技術の向上に伴い、生体内における硫黄の新たな性質として、硫黄原子 (S) がカテナーションした超硫黄種 (R-S_n-H)^{1,2} の存在が明らかとなってきた。超硫黄種は、求核剤としても求電子剤としても機能することで、生体内のレドックス環境や抗酸化機能に関与しており、ミトコンドリアにおける「硫黄呼吸」の存在も指摘される。しかしながら、超硫黄種が化学的に不安定であるため、その機能を解析・制御するツールが極めて不足しているのが現状である。そこで、本研究では、この課題に対し、細胞内のチオール種を光ケージド型超硫黄化することで、光刺激によって超硫黄種の発生を自在に制御できる分子ツール Al-caged-Py (図 1) の開発を目指した。

Al-caged-Py は、還元型グルタチオン (GSH) と効率よく反応し、405 nm の光照射によって、超硫黄型グルタチオン (GSSH) が発生することを確認した。さらに、細胞内チオール種の網羅的超硫黄化法へと展開した結果、複数種のタンパク質のチオール基で超硫黄化されることが確認できた。また、HeLa 細胞に対し、過酸化水素由来の酸化ストレスを与えると細胞死が起こるが、Al-caged-Py による超硫黄化によって、酸化ストレスを消去し、細胞死を抑制できることが示唆された。

本発表では、Al-caged-Py およびその応用の詳細に関して報告し、議論する。

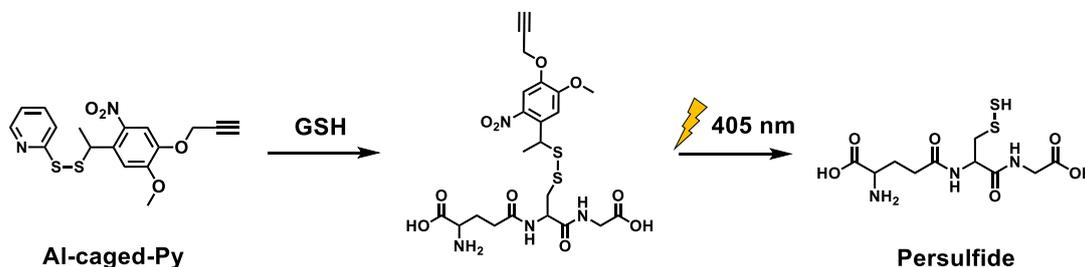


図 1. Al-caged-Py と還元型グルタチオン (GSH) との反応スキーム

References. 1. T. Akaike *et al.* *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1177. 2. T. Akaike *et al.* *Antioxid. Redox Signal.* **2022**, *36*, 327–336.

アクロレインを用いた標的タンパク質分解による選択的がん治療法の開発

(東工大物質理工¹・理研 開拓研究本部 田中生体研²) ○長谷川 佳奈¹・プラディプタ アンバラ¹・田中 克典^{1,2}

Targeted Protein Degradation in cancer using Acrolein (¹*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology*, ²*Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN*) ○Kana Hasegawa,¹ Ambara R. Pradipta,¹ Katsunori Tanaka^{1,2}

In a previous study conducted in our laboratory, it was discovered that cancer cells produced a high level of acrolein, while healthy cells only gave a negligible amount of acrolein. Additionally, it was found that by introducing phenyl azide to cancer cells, the reaction with endogenous acrolein produced a diazo compound derivative. This diazo derivative immediately formed a covalent bond with intracellular molecules within the cancer cells. The objective of this study is to selectively induce cancer cell death while preserving healthy cells viability. This could be achieved by using chimeric compounds that contain degradation tags. Synthesis and cell evaluation of the chimeric compounds will be reported in the symposium.

Keywords: Proteolysis; Cancer; Acrolein; [3+2] Cycloaddition; Aryl azide

タンパク質分解経路を標的とする新治療薬「タンパク質分解誘導薬」が注目されている。これらの薬剤は従来の低分子薬が対象とする活性部位に依存せず、広範なタンパク質を標的にできるため、創薬における新たな可能性を秘めている。しかし、標的細胞に選択的に作用しない場合、正常細胞に対する副作用が生じるリスクが存在する。当研究室では、がん細胞におけるアクロレインの過剰発生と、これとフェニルアジドとの1,3-双極子環化反応によりがん細胞内に滞留する技術を開発した。本研究では、この現象を応用してアクロレインに反応する新規キメラ化合物を開発し、オートファジー・リソソーム系を介してがん細胞内でのタンパク質分解を誘導することを試みたので、これらの成果について報告する。

- 1) T. Tanei, A. R. Pradipta, K. Morimoto, M. Fujii, M. Arata, A. Ito, M. Yoshida, E. Saigitbatalova, A. Kurbangalieva, J.-I. Ikeda, E. Morii, S. Noguchi and K. Tanaka, *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1801479.
- 2) A. R. Pradipta, M. Taichi, I. Nakase, E. Saigitbatalova, A. Kurbangalieva, S. Kitazume, N. Taniguchi and K. Tanaka, *ACS Sens.* **2016**, *1*, 623-632.

がん代謝物アクロレインを原料とした生体内金属触媒反応の検討

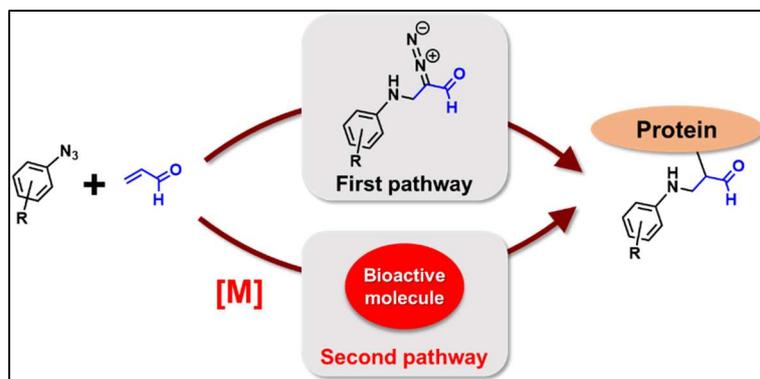
(東工大物質理工¹・理研 開拓研究本部 田中生体研²) ○奥村 昂也¹・張 宗哲¹・プラディプタ アンバラ¹・田中 克典^{1,2}

Investigation of metal-catalyzed reactions in vivo using cancer metabolites (¹*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology*, ²*Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN*) ○Koya Okumura,¹ Tsung-Che Chang,¹ Ambara R. Pradipta,¹ Katsunori Tanaka^{1,2}

Cancer cells have been found to overexpress acrolein, which can react with an azide compound to form a diazo compound.¹⁾ Confirmation of the binding of the diazo compound to the protein has been done using a fluorescence-labeled azide compound.^{2,3)} The current study aims to synthesize bioactive molecules from these diazo compounds using a bioorthogonal metal catalyst and evaluate their reactivity with proteins.

Keywords: Cancer therapy; Acrolein; Diazo compound; Bioactive compound; In vivo synthesis

我々は以前、がん細胞で特異的にアクロレインが発現していることを発見し、アジド化合物とこのアクロレインを反応させることでジアゾ化合物を合成することに成功している¹⁾。また、蛍光色素の結合したアジド化合物を用いることで、このジアゾ化合物がタンパク質との結合に関与していることを明らかにした^{2,3)}。そこで、このジアゾ化合物から生体寛容性金属触媒を用いて生理活性分子を合成する研究を行うとともに、その生理活性分子のタンパク質に対する反応性について評価したので、これらの成果について報告する。



- 1) A. R. Pradipta, M. Taichi, I. Nakase, E. Saigitbatalova, A. Kurbangalieva, S. Kitazume, N. Taniguchi, K. Tanaka, *ACS Sens.* **2016**, *1*, 623.
- 2) T. Tanei, A. R. Pradipta, K. Morimoto, M. Fujii, M. Arata, A. Ito, M. Yoshida, E. Saigitbatalova, A. Kurbangalieva, J. Ikeda, E. Morii, S. Noguchi, K. Tanaka, *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1801479.
- 3) A. R. Pradipta, H. Michiba, A. Kubo, M. Fujii, T. Tanei, K. Morimoto, K. Shimazu, K. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2022**, *95*, 421.

患者腫瘍移植モデルにおけるがん代謝産物との[3+2]付加環化反応とがん治療研究

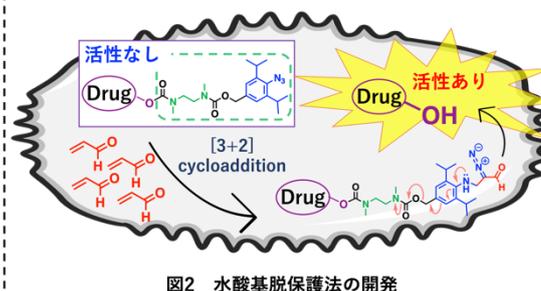
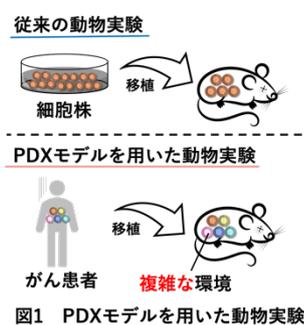
(東工大物質理工¹・理研 開拓研究本部 田中生体研²) ○高橋 ゆりあ¹・寺島 一輝¹・プラディプタ アンバラ¹・田中 克典^{1,2}

Cancer Treatment through [3+2] Cycloaddition Reaction with Patient-Derived Cancer Metabolites in Mouse Models (¹*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology*, ²*Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN*) ○Yuria Takahashi,¹ Kazuki Terashima,¹ Ambara R. Pradipta,¹ Katsunori Tanaka^{1,2}

Previously, we reported that acrolein is highly generated in cancer cells and phenyl azide reacts specifically with acrolein.¹⁾ Based on this reaction, we have developed a method for selectively releasing drug compounds in cancer tissue.²⁾ In this study, we evaluated this prodrug's efficiency in patient-derived xenograft models. Also, we prepared the prodrug applicable to a broader range of drugs. The details will be discussed at the symposium.

Keywords : Cancer therapy; Prodrug; Acrolein; [3+2] Cycloaddition; In vivo synthesis

我々はこれまでに、がんの種類を問わずにアクロレインが特異的に発現していることを明らかにした¹⁾。さらに、このアクロレインがフェニルアジドと選択的に反応することを見出した。このアジド-アクロレインの[3+2]環化反応を利用してアミノ基が脱保護される機構を開発し、がん細胞を選択的に標的とするプロドラッグの合成に成功した²⁾。本研究では、従来から広く用いられているがん細胞株を移植したマウスモデル (図1 上部) ではなく、ヒト患者由来のがんを移植した PDX モデル (図1 下部) を用いてプロドラッグの活性評価を行った。加えて、より広範な抗がん剤のプロドラッグ化を目指し、水酸基が脱保護される化合物に関する新たな検討を行ったので、これらの経緯について報告する (図2)。



- 1) T. Tomonori, A. R. Pradipta, K. Morimoto, M. Fujii, M. Arata, A. Ito, M. Yoshida, E. Saigitbatalova, A. Kurbangalieva, J.-I. Ikeda, E. Morii, S. Noguchi, K. Tanaka, *Adv. Sci.* **2019**, 6, 1801479.
- 2) A. R. Pradipta, P. Ahmadi, K. Terashima, K. Muguruma, M. Fujii, T. Ichino, S. Maeda, K. Tanaka, *Chem. Sci.* **2021**, 12, 5438.

細胞膜インナーリーフレットに特異的に局在する合成モチーフの開発

(名工大院工) ○王 笑桐・澤田 隼佑・吉川 優・飯島 共女・筒井 啓太・築地 真也
Development of a synthetic motif that specifically localizes to the inner plasma membrane leaflet (*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*) ○Xiaotong Wang, Shunsuke Sawada, Masaru Yoshikawa, Tomome Iijima, Keita Tsutsui, Shinya Tsukiji

The inner leaflet of the plasma membrane (iPM) is an important cellular site where various signaling molecules are activated to regulate dynamic cellular processes. Therefore, tools that can deliver chemical probes specifically to the iPM will be highly valuable to manipulate and visualize various signaling and biological processes that occur at the iPM. To this end, we focused on KRas4B, a small GTPase that localizes to the iPM via its C-terminal tail. In this study, by chemically synthesizing several derivatives of the C-terminal tail of KRas4B, we successfully developed a synthetic lipopeptidomimetic motif that is cell-membrane permeable and localizes specifically to the iPM. Upon conjugation with the synthetic motif, small-molecule and peptide ligands were efficiently delivered and localized to the iPM of living cells. In this presentation, we will report on the development and application of this novel lipopeptidomimetic tool for iPM-targeted delivery of various small molecules and peptides.

Keywords: Peptidomimetics, Inner plasma membrane leaflet, Intracellular delivery, Membrane penetration, Localization

細胞膜の内側である“細胞膜インナーリーフレット (iPM)”は、細胞生理機能を制御する重要な領域である。この領域は、様々なシグナル伝達分子の活性化の場となるばかりでなく、葉状仮足形成や小胞出芽といったダイナミックな細胞膜構造変化の制御にも関与している。そのため、小分子リガンドや蛍光色素などの任意の化学プローブを iPM 特異的に局在化させる技術は、iPM が起点となる生命現象を解析・操作するための強力なケミカルバイオロジーツールになるものと期待される。これまでに、SNAP-tag や Halo-Tag などのタグタンパク質を介した化学プローブの iPM 局在化法が報告されているが、この手法はタグタンパク質を外発発現させた細胞にしか適用できない。そこで本研究では、化学プローブとなる化合物そのものを直接 iPM に局在化させる技術の開発に取り組んだ。我々が着目したのは、iPM に局在化するタンパク質 KRas4B である。KRas4B はその C 末端にリジン残基の連続配列とファルネシル基を有しており、このモチーフを利用して iPM に特異的に局在化する²⁾。本研究ではこのモチーフを化学合成および構造展開することで、細胞膜透過性を持ち、さらに iPM に特異的かつ安定に結合することのできる合成リポペプチドミメティックモチーフを開発することに成功した。今回開発した合成モチーフに任意の小分子やペプチドを共有結合的にコンジュゲーションすることで、本来膜透過性のない分子でも iPM に送達することが可能であった。本発表では、一連の成果について詳細を報告する。

1) C. A. Hoelzel et al., *ChemBioChem*, **2020**, 21, 1935. 2) T. Yeung et al., *Science*, **2008**, 319, 210.

タンパク質局在移行誘導ツールを利用した上皮成長因子受容体 (EGFR) 活性化システムの開発

(名工大工¹・名工大院工²) ○大平 修也¹・田原 海²・吉川 優²・築地 真也^{1,2}
Development of a chemogenetic EGFR activation system using an inducible protein translocation tool (¹*Faculty of Engineering*, ²*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*) ○Shuya Ohira¹, Kai Tahara², Masaru Yoshikawa², Shinya Tsukiji^{1,2}

Chemogenetic activation of specific receptor tyrosine kinases (RTKs) is a powerful approach for studying and controlling cellular functions. However, because existing methods control oligomerization of engineered RTKs (over)expressed at the plasma membrane (PM), they often suffer from increased basal activities due to spontaneous RTK oligomerization. Here, we report a novel approach for chemogenetic RTK activation using an inducible protein translocation tool, SLIPT-PM. We demonstrate that an engineered eDHFR-tagged intracellular domain of epidermal growth factor receptor (EGFR) shows no background activity but is efficiently activated upon recruitment from the cytoplasm to the PM by the small-molecule m^DcTMP.

Keywords: Receptor tyrosine kinases, Epidermal growth factor receptor, Self-localizing ligand, Protein translocation, Signal transduction

細胞膜上に存在する「受容体型チロシンキナーゼ (RTK)」は、成長因子などの細胞外リガンドを認識すると、オリゴマー化とそれに続く自己リン酸化を介してさまざまな細胞応答を誘導する。特定の RTK を天然リガンド非依存的かつ特異的に活性化する方法は、RTK の機能解明や細胞機能操作における強力なツールとなる。これまでに、ペプチドや小分子からなる化学二量化剤を用いて細胞膜上の RTK のオリゴマー化・活性化を誘導する化学遺伝学的手法が開発されてきた^{1,2)}。しかし、従来の手法では、遺伝子工学的に改変した RTK を細胞膜上に外来 (過剰) 発現させるため、RTK の膜上での自発的なオリゴマー化による初期活性レベルの亢進が起こりやすい。

そこで本研究では、従来法とは異なる新たな原理に基づいた RTK 活性化技術の開発を目指した。その基盤となるのが、当研究室が開発したタンパク質局在制御ツール「SLIPT-PM」である^{3,4)}。SLIPT-PM では、細胞膜インナーリーフレットに局在する合成リガンド m^DcTMP を用いることで、タグタンパク質 eDHFR 変異体を融合した任意のタンパク質を細胞質から細胞膜へ特異的に局在移行させることができる。本研究ではこのツールを利用して、RTK の一種である上皮成長因子受容体 (EGFR) の活性化を検討した。まず、eDHFR 変異体を融合した EGFR の細胞内ドメイン (EGFR_{ICD}) を細胞質に発現させたところ、初期活性化は全く起こらないことが確認された。次に m^DcTMP を用いて EGFR_{ICD} を細胞膜に局在移行させると、EGFR_{ICD} の多重リン酸化と EGFR 下流シグナルの活性化を誘導することができた。本発表では、細胞膜への局在移行を基盤とする EGFR 活性化システムの詳細について報告する。

1) I. Nakase et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 7464. 2) J. Yang et al. *Curr. Biol.*, **1998**, 8, 11. 3) A. Nakamura et al. *ACS Chem. Biol.*, **2020**, 15, 837. 4) S. Suzuki et al. *Cell Chem. Biol.*, **2022**, 29, 1446.