

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 ~ 11:40 H934(9号館 [3階] 934)

[H934-1am] 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー

座長：戸谷 希一郎、森 俊明

◆ 日本語

9:00 ~ 9:10

[H934-1am-01]

UGGTの糖ペプチド特異性解析

○船津 裕子¹、戸谷 希一郎¹ (1. 成蹊大学)

◆ 日本語

9:10 ~ 9:20

[H934-1am-02]

多機能活性基質を用いた PNGase/ENGase 活性バランスの評価

○鎌田 結子¹、齋藤 直暉¹、栗原 大輝²、廣瀬 光了¹、戸谷 希一郎¹ (1. 成蹊大学、2. 大阪国際がんセンター)

◆ 日本語

9:20 ~ 9:30

[H934-1am-03]

カルレティキュリン標的抗がん剤の開発研究

○千野 瑛莉香¹、小林 優佳¹、児島 大河¹、栗原 大輝²、廣瀬 光了¹、戸谷 希一郎¹ (1. 成蹊大学、2. 大阪国際がんセンター)

◆ 日本語

9:30 ~ 9:40

[H934-1am-04]

糖タンパク質品質管理機構の稼働異常を改善する分解促進剤を目指した非天然型三糖の合成

○浅山 萌木¹、海瀬 秀¹、新田 恭平¹、古山 りさ¹、栗原 大輝²、廣瀬 光了¹、戸谷 希一郎¹ (1. 成蹊大学、2. 大阪国際がんセンター)

◆ 日本語

9:40 ~ 9:50

[H934-1am-05]

糖タンパク質品質管理機構の稼働異常を改善するシグナル糖鎖調節剤の開発

○海瀬 秀¹、新田 恭平¹、廣瀬 光了¹、戸谷 希一郎¹ (1. 成蹊大学)

◆ 日本語

9:50 ~ 10:00

[H934-1am-06]

疎水性度を指標とした糖タンパク質の選別に関わる酵素の活性変動の解析

○河野 佑真¹、廣瀬 光了¹、戸谷 希一郎¹ (1. 成蹊大学)

◆ 日本語

10:00 ~ 10:10

[H934-1am-07]

構造化したループ領域をもつグアニン四重らせん構造におけるカチオン結合親和性と構造安定性の相関

○小坂 直暉¹、中田 実紀¹、三好 大輔¹ (1. 甲南大学)

◆ 日本語

10:10 ~ 10:20

[H934-1am-08]

植物-アーバスキュラー菌根菌共生体のマルチモーダル非線形光学イメージング

○祖父江 編¹、宇佐美 慶典¹、竹下 典男²、市橋 泰範³、重藤 真介¹ (1. 関西学院大院理工、2. 筑波大、3. 理研BRC)

10:20 ~ 10:30

休憩

◆ 日本語

10:30 ~ 10:40

[H934-1am-09]

【講演取り下げ】グリコサミノグリカンからなる配向化高分子多糖薄膜の調製

○清水 拓遼¹、梶原 大輝¹、森 俊明¹ (1. 東京工業大学)

◆ 日本語

10:40 ~ 10:50

[H934-1am-10]

相分離性脂質膜の表面解析における観察プローブの開発

○堀家 惇司¹、菅野 雄斗¹、秋山 健人¹、森 俊明¹ (1. 東京工業大学)

◆ 英語

10:50 ~ 11:00

[H934-1am-11]

Dynamics analysis of the interaction between OS-9 lectin and glycans through molecular simulation studies

○Vidushi Aggarwal^{1,4}, Ashutosh Srivastava⁴, Takumi Yamaguchi^{1,2,3} (1. Sch. Materials Sci., JAIST, 2. Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya City Univ., 3. ExCELLS, NINS, 4. IIT Gandhinagar)

◆ 日本語

11:00 ~ 11:10

[H934-1am-12]

細胞デザイナー分子による破骨細胞への可視光応答性ヒドロキシアパタイト認識能の付与

○名倉 亜耶¹、仲本 正彦¹、松崎 典弥¹ (1. 阪大院工)

◆ 日本語

11:10 ~ 11:20

[H934-1am-13]

L-フェニルアラニン含有足場材料の作製とがん細胞選択的な誘導と捕捉への応用

○井谷 瞭斗¹、光安 涼¹、本間 健太¹、松崎 典弥¹ (1. 阪大院工)

◆ 日本語

11:20 ~ 11:30

[H934-1am-14]

糖供与体4,6-O-フェニルボロン酸エステル保護基がグリコシル化反応の立体選択性に与える影響の検証

○梅村 悠太¹、河村 奈緒子²、今村 彰宏^{1,2,3}、石田 秀治^{1,2,3}、安藤 弘宗^{1,2}、田中 秀則^{1,2} (1. 岐阜大院連合農学、2. 岐阜大iGCORE、3. 岐阜大応用生命)

🇯🇵 日本語

11:30 ~ 11:40

[H934-1am-15]

1,5-ラクタム化シアル酸橋頭位ラジカルを利用したC-シアロシド合成法の開発

○小林 萌々香¹、河村 奈緒子²、今村 彰宏^{1,2}、石田 秀治^{1,2}、安藤 弘宗²、田中 秀則² (1. 岐阜大応用生物、2. 岐阜大学iGCORE)

UGGT の糖ペプチド特異性解析

(成蹊大理工¹・大阪国際がんセンター²) ○船津裕子¹・工藤貴弥¹・栗原大輝²・廣瀬光了¹・戸谷希一郎¹

Analysis of glycopeptide specificities of UGGT

(¹Department of Science and Technology, Seikei University, ²Osaka International Cancer Institute) ○Yuko Funatsu,¹ Takaya Kudo,¹ Taiki Kuribara,² Mitsuaki Hirose,¹ Kichiro Totani¹

In the glycoprotein quality control, Man₉GlcNAc₂-type glycoproteins are glucosylated by UGGT to give a signal glycan for refolding. Generally, UGGT recognizes hydrophobic glycoprotein-surface, whereas the glucose-transfer of UGGT increases by recognizing a hydrophilic serine residue more than a hydrophobic Leu residue at the C-terminal of glycosylated-asparagine residue. However, the specific recognizing amino acid residues close to the glycosylation site by UGGT are not identified yet. In this study, we synthesized a series of Man₉GlcNAc₂-tripeptides having various peptide sequences and examine the peptide specificity of UGGT.

Keywords : UGGT; Aglycon; Amino acid; Consensus sequence

糖タンパク質品質管理において、折り畳み不良の Man₉GlcNAc₂ 型糖タンパク質は、UGGT による Glucose 付加を受け折り畳み促進シグナル糖鎖となる。一般に UGGT は折り畳み不良を表す疎水性糖タンパク質表面を認識すると考えられているが、我々は糖鎖付加部位の Asn C 末端に疎水性アミノ酸である Leu よりも、親水性アミノ酸である Ser が存在する場合によく認識する知見を得ている^[1]。しかし、UGGT が認識する糖鎖付加部位近傍のアミノ酸残基の全容は明らかになっていない。そこで、本研究ではコンセンサス配列を中心として様々なアミノ酸配列を持つ Man₉GlcNAc₂ トリペプチドの合成に取り組んだ。具体的には鶏卵卵黄から抽出した Man₉GlcNAc₂-Asn に対して、別途合成したジペプチドを縮合し、各種の Man₉GlcNAc₂-トリペプチド体を得た。また、合成した Man₉GlcNAc₂ トリペプチドに対する UGGT による糖転移活性評価を併せて報告する予定である。

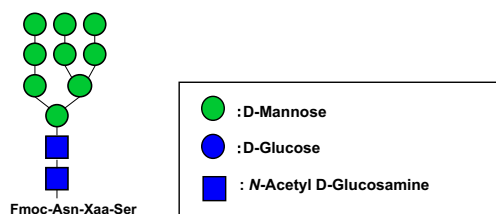


Figure 1. 標的とする糖ペプチドプローブ

[1] Kudo, T.; Hirano, M.; Ishihara, T.; Shimura, S.; Totani, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5563-5567.

多機能活性基質を用いた PNGase/ENGase 活性バランスの評価

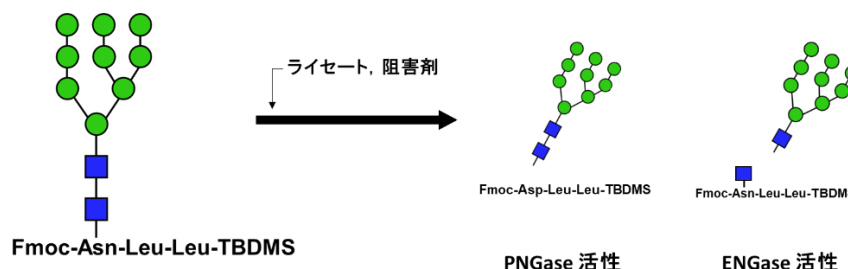
(成蹊大理工¹・大阪国際がんセンター糖鎖オンコロジー部²) ○鎌田 結子¹・齋藤 直暉¹・栗原 大輝²・廣瀬 光了¹・戸谷 希一郎¹

Evaluation of PNGase/ENGase activity balance using multifunctionally active substrates (¹Department of Science and Technology, ²Seikei University, Osaka International Cancer Institute) ○Yuiko Kamata,¹ Naoki Saito,¹ Taiki Kuribara,² Mitsuaki Hirose,¹ Kiichiro Totani¹

In the endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD), deglycan-enzymes such as PNGase and ENGase promote misfolded glycoprotein degradation in cytosol. NGLY1 deficiency, which is related to abnormal ERAD, might be caused by PNGase/ENGase activity balance. However, enzymatic assay system for detection of the balance has not been established. Herein, we target to develop the assay system for revealing the importance of the activity balance. We performed detection of PNGase/ENGase activity balance in a suspension of Wistar rat liver tissue (containing PNGase/ENGase) with the synthetic substrate Man₉GlcNAc₂-Asn(Fmoc)-Leu-Leu-TBDMS. We also examined optimization of the reaction conditions by tuning the peptide moiety of the substrate.

Keywords : Deglycan-enzyme; Endoplasmic reticulum associated degradation; Glycopeptide probe

小胞体関連分解では、糖タンパク質に対する PNGase および引き続く ENGase による脱糖鎖反応が不良糖タンパク質の分解を促す。その脱糖鎖反応の異常によってもたらされる疾患 NGLY1 欠損症では、PNGase/ENGase の活性バランスの変化が疾患を引き起こす要因と考えられている¹⁾。しかし、これらの酵素の活性バランスを定量評価できる解析系は確立されていないため、疾患の発症と酵素活性バランスの相関の詳細は不明なままである。そこで本研究では PNGase/ENGase の活性バランスを評価できる解析系の確立を目指した。我々は、Wistar rat の肝臓組織懸濁液 (PNGase/ENGase を含む) に独自の合成基質 Man₉GlcNAc₂-Asn(Fmoc)-Leu-Leu-TBDMS を作用させ、アッセイ系やライセート画分の調製法を検討し、PNGase/ENGase の活性検出に成功した(下図)。そして、基質のペプチド部位を工夫することで、両酵素の活性検出の最適化を検討している。



- 1) C. Huang. Y. Harada. A. Hosomi, Y. M-. Negishi. J. Seino.; H. Fujihira. Y. Funakoshi. N. Dohmae. T. Suzuki. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2015**, *112*, 1398–1403.

カルレティキュリン標的抗がん剤の開発研究

(成蹊大学理工¹・大阪国際がんセンター²) ○千野 瑛莉香¹・小林 優佳¹・児島 大河¹・栗原 大輝²・廣瀬 光了¹・戸谷 希一郎¹

Developmental research of calreticulin-targeted anticancer drugs (¹*Department of Science and Technology, Seikei University*, ²*Osaka International Cancer Institute*) ○Erika Chino,¹ Yuka Kobayashi,¹ Taiga Kojima,¹ Taiki Kuribara,² Mitsuaki Hirose,¹ Kiichiro Totani¹

Mainstream for cancer chemotherapy is performed by inhibiting DNA and RNA synthesis during cell proliferation. However, the chemotherapy has an issue with inducing non-specific cell death to give side effects. We focused on that cancer cells promote cell proliferation through high expression of molecular chaperones. In our previous study, a first-generation CRT-targeted anticancer drug (G₁M₂-EG₈-Fmoc) was developed that induces cell death by binding tightly to Calreticulin (CRT), a lectin-like molecular chaperone that localizes in the endoplasmic reticulum. However, the toxicity evaluation of this drug on various cancer cells has not been verified. Therefore, we designed a second-generation CRT-targeted anticancer drug (G₁M₂-EG₈-Dns) with a fluorescent group to facilitate evaluation of CRT binding. And herein we synthesized a novel CRT targetted anticancer drug G₁M₂-EG₈-Dns and evaluating its cytotoxicity for various cancer cells. First, the target anticancer drug and the related structural moieties were synthesized. Next, the cytotoxic efficacy of G₁M₂-EG₈-Dns was examined by treating HeLa cells with the glycan moiety G₁M₂, the linker-bound Dns moiety EG₈-Dns, and the anticancer agent G₁M₂-EG₈-Dns, respectively.

Keywords: *Anticancer drug; Calreticulin; Cancer cells; Molecular chaperone*

現在の主要ながん化学療法は、細胞増殖に伴う DNA, RNA の合成を阻害することで抗がん効果を示すことから、非特異的細胞死の誘発による副作用が問題である^[1]。これに対し、がん細胞は分子シャペロンの高発現により細胞増殖を促進する特徴^[2]に着目し、当研究室では小胞体内に局在するレクチン様分子シャペロンである Calreticulin (CRT) と強固に結合し、細胞死を誘発する第一世代 CRT 標的抗がん剤 (G₁M₂-EG₈-Fmoc) を開発した。しかし、本薬剤の多様ながん細胞に対する毒性評価は検証されていない。そこで本研究では、CRT との結合評価を可視化すべく、蛍光基を導入した第二世代 CRT 標的抗がん剤 (G₁M₂-EG₈-Dns) を設計し (Figure 1)、種々のがん細胞に対する細胞毒性を評価することで、CRT を標的とした新規抗がん剤の開発を目的とした。まず、標的抗がん剤および関連する部分構造を合成した。次に、糖鎖部分の G₁M₂、リンカー結合型 Dns 部分の EG₈-Fmoc、標的抗がん剤である G₁M₂-EG₈-Dns を HeLa 細胞にそれぞれ添加処理し、G₁M₂-EG₈-Dns の細胞毒性の有効性を検討した。

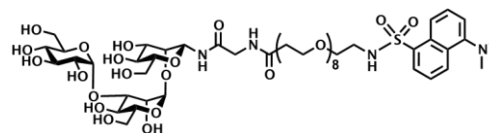


Figure 1. 第二世代 CRT 標的抗がん剤

[1] P. Hoppenz, S. Els-Heindl, A. G. Beck-Sickinger, *Front. Chem.* **2008**, *8*, 571.

[2] J. Sun, H. Mu, K. Dai, L. Yi, *Pharmazie*. **2017**, *72*, 503–510.

糖タンパク質品質管理機構の稼働異常を改善する分解促進剤を目指した非天然型三糖の合成

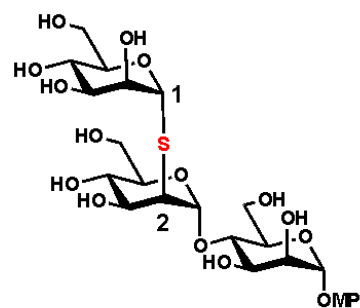
(成蹊大理工¹・大阪国際がんセンター 糖鎖オンコロジー部²) ○浅山 萌木¹・海瀬 秀¹・新田 恭平¹・古山 りさ¹・栗原 大輝²・廣瀬 光了¹・戸谷 希一郎¹

Synthesis of unnatural trisaccharides for degradation promoter to improve abnormal operation of glycoprotein quality control (¹ *Department of Science and Technology, Seikei University*, ² *Osaka International Cancer Institute*) ○Moegi Asayama,¹ Shu Kaise,¹ Kyohei Nitta,¹ Risa Koyama,¹ Taiki Kuribara,² Mitsuaki Hirose,¹ Kiichiro Totani.¹

In the glycoprotein secretory and degradation pathway in the endoplasmic reticulum, the folding state of Man₉GlcNAc₂ (M9)-type glycoproteins controls the selective cleavage of each terminal Man by EDEMs and sorts them into the secretory and degradation pathways. Abnormalities in this mechanism are thought to be responsible for the development of folding diseases. We have synthesized Man α 1-2Man α 1-4Man, an unnatural type of trisaccharide that does not exist on the M9-type glycan chain. We have shown the possibility of pharmacological chaperone activity, in which binding of the trisaccharide to the disease mediated denatured EDEMs modifies the conformation of amino acid residues in the active center and restores the EDEM activity [1]. In this study, we aimed to develop a degradation promoter based on unnatural trisaccharides with the pharmacological chaperone activity to correct the abnormal degradation pathway. We report the established synthetic pathway for unnatural trisaccharides with thio-glycoside bond that is resistant to hydrolysis of EDEMs.

Keywords: EDEM; Unnatural trisaccharide; Pharmacological chaperone; Degradation promoter

小胞体内の糖タンパク質分泌分解経路では、Man₉GlcNAc₂ (M9) 型糖タンパク質のフォールディング状態に応じて、各ブランチ末端 Man の EDEM 類による選択的な切断によって、分泌や分解経路へと選別される。この機構に異常が生じると、フォールディング病が発症すると考えられている。我々はこれまでに、M9 型糖鎖上には存在しない非天然型三糖である Man α 1-2Man α 1-4Man を合成した。これが、疾患により変性した EDEM 類に結合すると、活性中心内のアミノ酸残基の配座が修正され、EDEM 活性を回復させるという薬理的シャペロン活性の可能性を示した^[1]。そこで本研究では、分解経路異常を是正するため、この薬理的シャペロン活性をもつ非天然型三糖を基にした分解促進剤の開発を目指し、EDEM に対する加水分解耐性をもつチオ結合を付与した非天然型三糖（上図）の合成経路を確立したので報告する。



Man α 1-S-2Man α 1-4Man

[1] K. Nitta, T. Kuribara, K. Totani, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 4137–4145.

糖タンパク質品質管理の稼働異常を改善するシグナル糖鎖制御剤の開発

(¹成蹊大理工、²大阪国際がんセンター) ○海瀬 秀¹・新田 恭平¹・栗原 大輝²・廣瀬光了¹・戸谷 希一郎¹

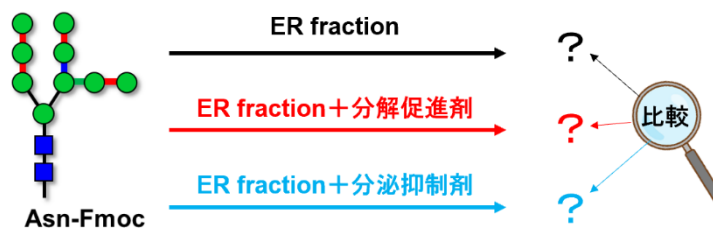
Development of signal glycan regulators that improve abnormal operation of glycoprotein quality control (¹Department of Science and Technology, Seikei University, ²Osaka International Cancer Institute) ○Shu Kaise,¹ Kyohei Nitta,¹ Taiki Kuribara,² Mitsuaki Hirose,¹ Kiichiro Totani¹

EDEM1,2 or 3 selectively cleave the terminal mannoses from Man₉GlcNAc₂-type glycoproteins and divide the glycoproteins into the secretory and the degradation pathways in the ER. Abnormal operation of this mechanism causes development of folding diseases such as diabetes and Alzheimer's disease. The disruption of the mechanism is mainly due to the decrease of degradation signal glycan production and excessive secretory signal glycan production. We have previously reported that chemically synthesized Man α 1-2Man α 1-4Man shows pharmacological chaperone activity on EDEMs responsible for generation of degradation-signal glycan and Man α 1-2Man α 1-4Man is recognized by EDEM responsible for generation of secretion-signal glycan. In this study, we synthesized a degradation promoter having Man α 1-S-2Man α 1-4Man structure and a secretion inhibitor having Man α 1-S-2Man α 1-4Man with a thio-glycoside linkage to resistance to EDEMs, and verified their effects on glycan processing in the ER fraction.

Keywords : Folding disease; Pharmacological chaperone; Inhibitor; EDEM

小胞体内では、Man₉GlcNAc₂型糖タンパク質が EDEM1, EDEM2 および EDEM3 によってマンノース切断を受け、分泌シグナル糖鎖をもつ糖タンパク質と分解シグナル糖鎖をもつ糖タンパク質に分別される。本機構が破綻し、分解シグナル糖鎖産生の減衰や過剰な分泌シグナル糖鎖の産生が起これば、不良糖タンパク質が蓄積し、糖尿病やアルツハイマー病などのフォールディング病の発症に繋がる。これまでに化学合成した Man α 1-2Man α 1-4Man が、分解シグナル糖鎖産生を担う EDEM の活性を促進し、Man α 1-2Man α 1-3Man は分泌シグナル糖鎖産生を担う EDEM に認識されることが報告されている^[1]。これらはそれぞれ分泌シグナル糖鎖促進剤および分解シグナル糖鎖阻害剤としてフォールディング病の予防的治療に有効な化合物と考えられるが、両化合物は小胞体内に共存する EDEM 類に対して抵抗性を示さないため、実用化には改良が必要である。そこで本研究では、マンノシダーゼ耐性のあるチオグリコシド結合を導入した糖タンパク質分解促進剤として Man α 1-S-2Man α 1-4Man、糖タンパク質分泌抑制剤として Man α 1-S-2Man α 1-3Man を化学合成した。また、合成した化合物の効果を検証すべく、小胞体画分内での糖鎖切断プロファイルが本化合物の共存によって変化するか検討した。

[1] Nitta, K.; Kuribara, T.; Totani, K. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 4137-4145.



疎水性度を指標とした糖タンパク質の選別に関わる酵素の活性変動の解析

(成蹊大理工¹) ○河野佑真¹・廣瀬光了¹・戸谷希一郎¹

Analysis of activity variation of enzymes involved in glycoprotein sorting using hydrophobicity as an indicator

(¹*Department of Science and Technology, Seikei University*) ○Yuma Kono,¹ Mitsuaki Hirose,¹ Kiichiro Totani¹

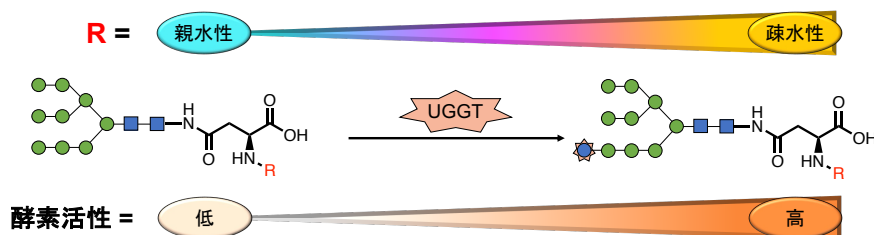
In the ER glycoprotein quality control, the pathway selection for Man₉GlcNAc₂-glycoprotein among secretion, degradation and refolding is regulated by UGGT1 and EDEMs. Particularly, UGGT1 is known to recognize hydrophobic protein moiety [1]. This suggests that the pathway sorting of secretion, degradation and refolding of glycoproteins by UGGT1 and EDEMs involves differences in the surface hydrophobicity at the protein moieties. However, the competitive relationship between these enzymes based on the hydrophobicity on the protein surface has not yet been elucidated. Therefore, we have synthesized glycoprotein mimics with different hydrophobicity of aglycon moieties and analyzed their reactivity with UGGT1 and EDEMs to reveal the competitive relationship between these two enzymes. In this presentation, we focused on UGGT1 and evaluated the influence of the aglycone hydrophobicity on the reactivity.

In fact, the reaction of glycoprotein mimics having different hydrophobicity with the endoplasmic reticulum fraction showed that an increase of the hydrophobicity of the aglycon gradually increases the enzyme activity of UGGT1. The result indicated a positive correlation between the hydrophobicity of the aglycon and the UGGT1 activity.

Keywords : ER glycoprotein quality control; UGGT1; EDEM; Glycoprotein mimics; Aglycon hydrophobicity

小胞体糖タンパク質品質管理機構において、分泌・分解・修正の経路選別は Man₉GlcNAc₂-型糖タンパク質に対して働く糖鎖プロセッシング酵素 UGGT1 や EDEM 類によって制御されている。特に UGGT1 については、疎水性のタンパク質部位を認識することが知られている[1]。このことから UGGT1 と EDEM 類による糖タンパク質の分泌・分解・修正の経路選別には、タンパク質部位の表面疎水性度の違いが関与すると考えられる。しかし、タンパク質表面上の疎水性度を指標としたそれらの酵素の競合関係は未だ解明されていない。そこで我々はアグリコン部位の疎水性度が異なる糖タンパク質ミミックを合成し、それらを基質として用いた UGGT1 および EDEM 類との反応解析から、両酵素の競合関係の解明に取り組んでいる。本発表では UGGT1 に注目し、アグリコンの疎水性度が本酵素の反応性に及ぼす影響を評価した。

実際に、疎水性度の異なる糖タンパク質ミミックを小胞体画分と反応させたところ、アグリコンの疎水性度が増加するにつれて UGGT1 による糖転移活性も増加する正の相関があることが判った。



[1] K. Totani, Y. Ihara, T. Tsujimoto, I. Matsuo, Y. Ito, *Biochemistry* **2009**, 48, 2933–2940.

構造化したループ領域をもつグアニン四重らせん構造におけるカチオン結合親和性と構造安定性の相関

(甲南大 FIRST) ○小坂 直暉・中田 実紀・三好 大輔

Thermodynamics-cation binding relationship in G-quadruplexes with structured loop region
(*Frontiers of Innovative Research in Science and Technology FIRST, Konan University*)

○Naoki Kosaka, Minori Nakata, Daisuke Miyoshi

G-quadruplex (G4) is one of the non-canonical structures of nucleic acids formed from guanine-rich sequences. It is well-known that G4 is stabilized by Hoogsteen hydrogen bonds between four guanines (G-quartet), stacking interaction between G-quartets, and cation coordination to G-quartet. Thus, G4-cation binding affinity has been considered to be dependent of the number and the orientation of G-quartets. Interestingly, it was recently found that the cation binding affinity further depended not only on the G-quartet region but also on linker regions between G-quartets (loop regions)¹⁾. Moreover, G4s with a loop containing hairpin structure (structured loop) have higher thermal stability than that with an unstructured (Fig. 1)²⁾. However, the effect of loop region on cations binding affinity is unclear yet. Here, we systematically studied the cation binding affinity and thermal stability of G4 with the structured loop region. It was found that G4s with the structured loop region have higher cations binding affinity and thermal stability than ones without the structured loop region. Moreover, it was demonstrated that both cation binding affinity and thermal stability of G4s increased with the more stable the hairpin structure at the loop region, indicating that thermal stability of the loop region structure is one of determinants of the overall G4 structure, thermal stability, as well as binding affinity with cations.

Keywords : DNA; G-quadruplex; non-canonical structure; cations; thermal stability

グアニン四重らせん構造(G4)とは、グアニンに富んだ配列から形成される核酸の非標準構造の一つである。4 つもグアニンで形成される G-quartet 内の Hoogsteen 水素結合、G-quartet どうしのスタッキング相互作用、そして G-quartet へのカチオンの配位で G4 は高い熱安定性を獲得する。そのため、G4 とカチオンの結合親和性は G-quartet に依存していると一般的には考えられていた。しかし、カチオンとの結合親和性は G-quartet の領域だけではなく G-quartet の領域どうしを繋ぐ領域(ループ領域)にも依存することが示されている¹⁾。さらに、ヘアピン構造をもつループ領域(構造化したループ領域)をもつ G4 は、構造化したループ領域をもたない G4 よりもカチオンとの結合親和性や熱安定性が高いことも明らかとなっている(Fig. 1)²⁾。しかし、カチオンとの結合親和性に対するループ領域の影響は未だに解明されていない。そこで本研究では、構造化したループ領域をもつ G4 のカチオンとの結合親和性と構造安定性を定量的に検討した。その結果、構造化したループ領域をもつ G4 は構造化したループ領域をもたない G4 よりもカチオンとの結合親和性と熱安定性が高いことが確認された。さらに、ループ領域内の構造の熱安定性が、G4 における鎖配向性、構造安定性、カチオンとの結合親和性に対する決定因子の一つであることが示された。

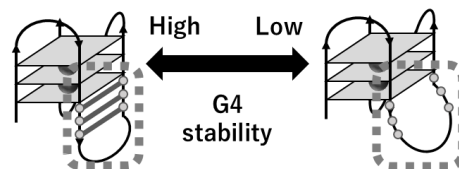


Figure 1. Stability of G4 with a structured loop

1) M. A. Mullen, et al., J. Am. Chem. Soc., **2012**, 134, 812-815

2) K. W. Lim, et al., Biochemistry., **2014**, 53, 247-257

植物-アーバスキュラー菌根菌共生体のマルチモーダル非線形光学イメージング

(関西学院大院理工¹・筑波大²・理研 BRC³) ○祖父江 編¹・宇佐美 慶典¹・竹下 典男²・市橋 泰範³・重藤 真介¹

Multimodal nonlinear optical imaging of plant-arbuscular mycorrhizal fungi associations (¹Kwansei Gakuin Univ., ²Univ. of Tsukuba., ³RIKEN BRC) ○Amu Sofue,¹ Keisuke Usami,¹ Norio Takeshita,² Yasunori Ichihashi,³ Shinsuke Shigeto¹

Plant-arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) symbiotic interactions play crucial roles in agriculture and environmental protection, but spatiotemporal understanding of this symbiosis remains limited. Recently, we have performed label-free molecular imaging of AMF and plant roots using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) and successfully visualized the localization of different biomolecules in each. In this study, we extend our previous work to multimodal imaging with CARS and other useful nonlinear optical effects, such as second harmonic generation (SHG), of plant-AMF associations. Using characteristic Raman bands and signals from nonlinear optical effects, we simultaneously visualized fungal lipids and cell walls of intra- and extraradical hyphae, and cortex cells inside the plant root without staining.

Keywords : coherent anti-Stokes Raman scattering; label-free imaging; mycorrhizal fungi; symbiotic interactions

植物とアーバスキュラー菌根菌 (AMF) の共生関係は農業や環境保全において重要であるが、共生体での物質授受の詳細は未解明である。我々は、ミナトカモジグサ *Brachypodium distachyon* と AMF のモデル種 *Rhizophagus irregularis* の共生体における物質局在の可視化に向け、コヒーレントアンチストークスラマン散乱 (CARS) を用いた AMF のラベルフリー分子イメージングに成功している¹⁾。本研究ではそれを発展させ、CARSに加えて第二高調波発生 (SHG)、3次和周波発生 (TSFG) などの非線形光学応答を観測可能な分光顕微鏡を用いて、ミナトカモジグサと *R. irregularis* の共生体のマルチモーダルイメージングを行った。根に感染した AMF 菌糸 (外生菌糸; 図 1(a)) の結果を図 1(b)–(i) に示す。共生した菌糸の成分に特徴的なラマンバンドだけでなく、SHG および TSFG 信号も初めて観測され、染色の必要なく植物-AMF 共生体の様々な部位を明瞭に可視化できることが示された。

1) 祖父江、竹下、市橋、重藤、日本化学会 第 103 春季年会、K701-4am-10

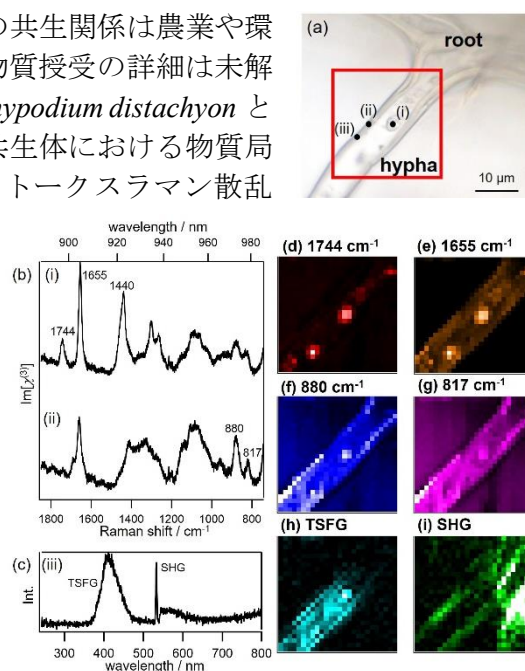


図 1. 根に感染した *R. irregularis* 菌糸のマルチモーダルイメージング。(a)光学顕微鏡像、(b)(i)–(iii)における $\text{Im}[\chi^{(3)}]$ スペクトル (自発ラマンスペクトルに対応)、(c) SHG および TSFG 信号のスペクトル、(d)–(g) CARS イメージ、(h,i) TSFG および SHG イメージ。

グリコサミノグリカンからなる配向化高分子多糖薄膜の調製

(東工大生命理工¹) ○清水 拓遼¹・梶原 大輝¹・森 俊明¹

Preparation of oriented polymer polysaccharide thin films containing glycosaminoglycans
(¹Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) ○Takuharu Shimizu,¹ Hiroki Kajiwar, ¹ Toshiaki Mori¹

Previous research in our laboratory has attempted to fabricate chitin nanofilms, but they are very brittle and water retention has been cited as an issue, and we have been investigating the introduction of glycosaminoglycans with excellent water retention properties. In this study, the Langmuir-Brigitte method, which originally could not be used for water-soluble glycosaminoglycans, was compared with the alternating accumulation method to adjust oriented polymer polysaccharide thin films (Figure 1 (a)) by once hydrophobizing, introducing substances with different electric charges into water, and then detaching the hydrophobic groups of the monolayer in that state. In fact, the height information (Fig. 1 (b)) of 5 accumulated layers of chitosan-hyaluronic acid hybrid film was obtained by AFM, and the height of 10 nm was confirmed for the 5 layers of chitosan-hyaluronic acid hybrid film. The area with a height of more than 10 nm is considered to be due to the accumulation of lipid on the water surface during the accumulation process.

In the future, we plan to compare this method with the alternating accumulation method.

Keywords : Monolayers contained polysaccharide; Polyioncomplex; Cationic lipids; Atomic Force Microscope; Analyses at singlemolecular level

カニやエビの殻の主成分であるキチンおよびキトサンは生分解性、生体適合性に優れており、資源枯渇の可能性が低いことから重要なバイオマス資源として期待されている。しかしながら当研究室の先行研究ではキチンナノフィルムの作製を試みているが、非常に脆く、保水性が課題として挙げられており、保水性に優れたグリコサミノグリカンの導入を検討してきた。本研究では本来水溶性のグリコサミノグリカンでは使えないラングミュア-ブリジット法を一旦疎水化し、電荷が異なる物質を水中に導入し、その状態で単分子膜の疎水基を切り離すことで配向化高分子多糖薄膜を調整する方法(図1(a))を交互累積法と比較、検討してきた。実際に、キトサンヒアルロン酸ハイブリッドフィルムを5層累積したものをAFMで高さ情報(図1(b))を得たところ、キトサンヒアルロン酸ハイブリッドフィルム5層分の高さ10nmを確認できた。高さが10nm以上になっている部分は、累積の際に水面にあった脂質も累積されたからと考えられる。

今後は交互累積法との比較、検討を試みる予定である。

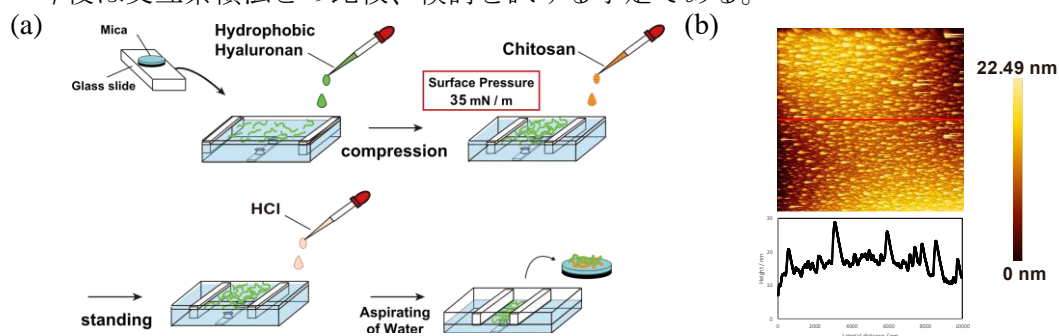


図1(a)キトサンヒアルロン酸ハイブリッドフィルムの積層法 (b)その表面と断面

相分離性脂質膜の表面解析における観察プローブの開発

(東工大生命理工¹) ○堀家 惇司¹・菅野 雄斗¹・秋山 健人¹・森 俊明¹

Development of observation-assist probes for observing degradation behavior of phase-separated lipid membranes (¹Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Tech)
○Junji Horike¹, Yuto Sugano¹, Kento Akiyama¹, Toshiaki Mori¹

Lipid rafts are involved in signal transduction and enzymatic reactions. One observation technique using AFM is to measure the interaction force between the membrane surface and the enzyme, but there was a possibility that deactivation could occur. We applied probes to lipid membranes and observed their surfaces at different heights. We designed probes based on the properties such as ζ -potential and phase transition temperature. We were able to confirm probe binding around the phase-separated region using probes containing cationic lipids.

Keywords: Phase-separated lipid bilayer; Liposome; ζ -Potential; Atomic Force Microscopy; Lipid hydrolase;

脂質膜内の脂質ラフトはシグナル伝達や酵素反応に関与している。AFMを用いた観察手法に脂質膜表面と酵素の相互作用力の測定があるが、脱離や失活が起こる可能性があった。本研究では脂質膜に結合するリポソームをプローブとして脂質膜に作用させ、高さの差をもって表面観察を行ない、脂質膜の ζ ポテンシャルや相転移温度といった特性を元にプローブリポソームを設計し作製した。種々のカチオン性脂質を含んだプローブを用いて Fig. 1 のような固定化二分子膜に作用させたところ、相分離しているあたりにプローブが結合していることを確認することができた。(Fig. 2)

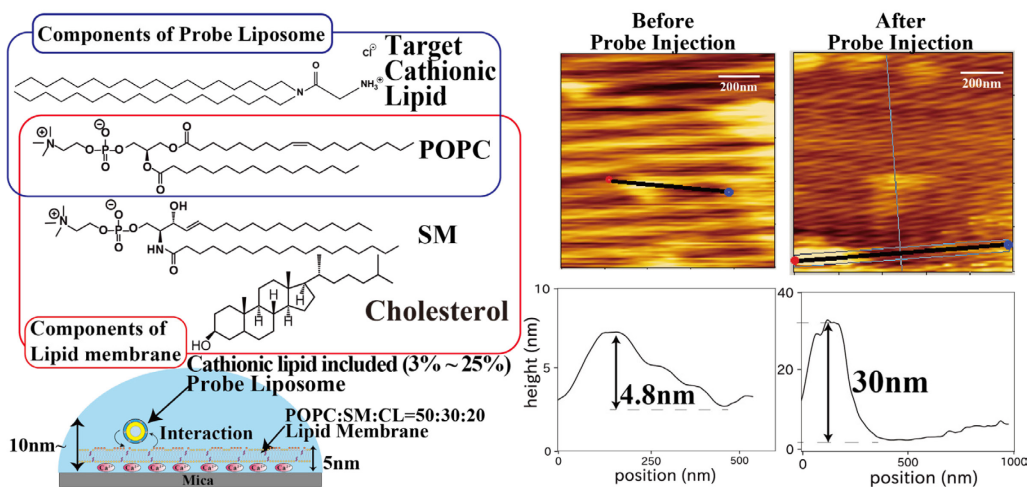


Fig. 1 脂質二分子膜上での結合と脂質 Fig. 2 脂質膜と結合領域の高さの差

Dynamics analysis of the interaction between OS-9 lectin and glycans through molecular simulation studies

(北陸先端大マテリアル¹・名古屋市薬²・自然科学研究機構 ExCELLS³・Indian Institute of Technology Gandhinagar⁴)○Aggarwal Vidushi^{1,4}・Srivastava Ashutosh⁴・山口 拓実^{1,2,3}
(¹*School of Materials Science, JAIST*, ²*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University*, ³*ExCELLS, NINS*, ⁴*IIT Gandhinagar, India*) ○Aggarwal Vidushi,^{1,4} Srivastava Ashutosh,⁴ Yamaguchi Takumi^{1,2,3}

Keywords: Molecular dynamics simulation, OS-9 lectin, N-glycans, ER-associated degradation, Glycosidic linkage

Glycans are involved in various vital processes such as a quality control of proteins in cells through their interaction with lectins. Glycans are highly flexible molecules and exhibit multiple conformations in solution. The conformational dynamics of glycans plays considerable roles in glycan recognition processes. Therefore, a detailed interpretation of dynamic behaviors of glycan-lectin complexes is important to understand the molecular basis of their biological functions.

OS-9 is a lectin critically involved in the endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded glycoproteins. It comprises of a mannose-6-phosphate receptor homology (MRH) domain which interacts with N-glycans exposing α -1,6 linked mannosyl residues. However, the dynamics in its recognition and binding mechanism is not well understood. In this study, we performed molecular dynamics (MD) simulations of the MRH domain of OS-9 in both unbound and bound states with a glycan containing α -1,6 linked mannosyl residues, Man α 1,6Man α 1,6Man.

We analyzed changes in dihedral angles of the glycosidic linkages in Man α 1,6Man α 1,6Man to investigate the conformational changes in the glycan upon interaction with OS-9. By comparison with a crystal structure of the complex, the simulation results indicated a dynamic interaction between the glycan and OS-9 involving conformational selection and induced-fit processes. We further studied structural changes of binding site residues of OS-9 to gain insights into the binding mechanisms. It is reported that OS-9 interacts with Man α 1,6Man α 1,6Man through the double tryptophan motif.¹ In our MD simulations of OS-9, flipping motion of the side chain of a tryptophan residue coupled with the glycan binding was observed. These results could also provide clues to appropriate releasing ways for flexible glycans.

1) Satoh, T., Chen, Y., Hu, D., Hanashima, S., Yamamoto, K., & Yamaguchi, Y. (2010). Structural basis for oligosaccharide recognition of misfolded glycoproteins by OS-9 in ER-associated degradation. *Molecular cell*, 40(6), 905–916.

細胞デザイナー分子による破骨細胞への可視光照射応答性

ヒドロキシアパタイト認識能の付与

(阪大院工¹) ○名倉 亜耶¹・仲本 正彦¹・松崎 典弥¹

Development of osteoclasts with hydroxyapatite recognizable property in response to visible light irradiation by cell designer molecules. (¹Graduate School of Engineering, Osaka University)

○Aya Nagura,¹ Masahiko Nakamoto,¹ Michiya Matsusaki¹

Cutting therapy for bone diseases such as calcification and heterotopic ossification in atherosclerosis is highly invasive. Recently, a decalcification therapy using osteoclasts with bone tissue recognition ability provide by cell membranes modification has been reported¹⁾. However, selective accumulation of cells at the target site has not been achieved. In this study, we designed osteoclasts with bone tissue recognition ability that are activatable by light irradiation (Figure 1A). A polyethylene glycol (PEG)-based cell designer molecule with alendronic acid (ALN) and deoxycholic acid (DCA) as hydroxyapatite (HAp) recognition group and cell membrane insertion group, respectively, named 8PEG40k-ALN50-DCA50 was synthesized (Figure 1B). Osteoclastic progenitor cells modified with 8PEG40k-ALN50-DCA50 was found to adsorb onto HAp (Figures 2). This study provides a strategy for spatially controlled decalcification therapy.

Keywords : biomaterial; cell modification; molecular recognition; designed cells; bisphosphonate

動脈硬化における石灰化や異所骨化等の骨疾患への切削治療は高い侵襲性が課題となる。最近、細胞膜修飾により骨組織認識能を付与した破骨細胞による脱石灰化療法が報告されたが、¹⁾体内に広く分布する骨組織の中で目的箇所のみへの細胞集積は達成されていない。そこで本研究では、破骨細胞に対して光照射により活性化される骨組織認識能を付与したデザイナー細胞を創製した(Figure 1A)。具体的には 8 分岐型ポリエチレングリコール(PEG)にヒドロキシアパタイト(HAp)認識部位としてアレンドロン酸(ALN)を、細胞膜挿入部位としてデオキシコール酸(DCA)を導入することで細胞デザイナー分子 8PEG40k-ALN50-DCA50 を合成した(Figure 1B)。次に蛍光ラベル化 8PEG40k-ALN50-DCA50 による破骨前駆細胞の細胞膜修飾 (Figure 2A) および修飾細胞の HAp への吸着を確認した (Figure 2B)。本研究は空間制御された脱石灰化療法への有用な戦略となる。

1) W. Jin et al., *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6327.

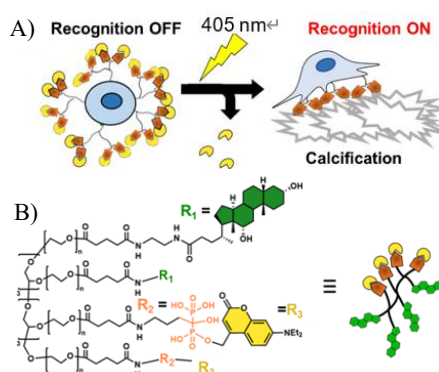


Figure 1. A) Conceptual illustration of this study. B) Chemical structure of PEG derivative with photo-caged ALN and DCA for spatially controlled HAp targeting and cell membrane insertion, respectively: 8PEG40k-ALN50-DEACM-DCA50.

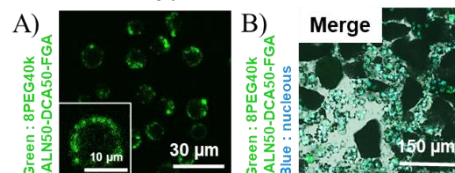


Figure 2. A) Fluorescence image of designed osteoclasts. B) Fluorescence image of the designed osteoclasts adsorbed on HAp. (Black : HAp).

L-フェニルアラニン含有足場材料の作製とがん細胞選択的な誘導と捕捉への応用

(阪大院工¹) ○井谷 瞭斗¹・光安 涼¹・本間 健太¹・松崎 典弥¹

Preparation of L-phenylalanine-containing scaffold materials and their application to selective induction and capture of cancer cells (¹*Graduate School of Engineering, Osaka University*)

○Ryoto Itani,¹ Ryo Mitsuyasu,¹ Kenta Homma,¹ Michiya Matsusaki¹

Metastatic potential is one of the reasons for the high malignancy of cancer. Artificially controlling the metastatic sites of cancer cells, followed by capture and removal of cancer cells is expected to be a new therapeutic approach. This study aims to develop a novel scaffold that can selectively lure cancer cells by a sustained release of CXCL12, which induces chemotactic migration of cancer cells. Additionally, endowing the scaffold with cancer-cell capture ability is expected to provide the necessary functions for the purpose (Figure 1a).

With this scaffold design in mind, we prepared polymeric scaffolds modified with L-phenylalanine. L-Phenylalanine has high affinity towards an amino acid transporter (LAT1) overexpressed on cancer cells. Selective capture of cancer cells (MCF-7) was successfully shown through adhesion tests (Figure 1b; HMEC: normal cell). Moreover, induction of cancer cell migration was confirmed by the gradual release of CXCL12 from a scaffold.

Keywords : Poly (vinyl alcohol); L-Phenylalanine; Semi interpenetrating polymer network (Semi-IPN); Cancer cell capture; Induction of cancer cell migration

がんの悪性度が高い理由として転移能が挙げられる。がん細胞の転移部位を人為的に制御し、がん細胞を捕捉・除去できれば、新たな治療法になると期待される。本研究では、がん細胞捕捉能が期待される足場材料からがん細胞への走化性付与が知られる CXCL12 を徐放することで、がん細胞の誘導と選択的な捕捉を実現する新規足場材料の開発を最終的な目標とした (Figure 1a)¹⁾。

がん細胞の選択的な捕捉のために、がん細胞膜上に過剰発現するアミノ酸トランスポーター (LAT1) に対して高い親和性を有する L-フェニルアラニン修飾足場材料を作製した²⁾。この足場材料を用いてがん細胞の選択的な捕捉を検討したところ、正常細胞 (HMEC) は接着しなかった一方で (Figure 1b)、がん細胞のみ (MCF-7) が接着した。続いて、CXCL12 のがん細胞遊走誘導能を評価したところ、CXCL12 を内包した足場でのみがん細胞の遊走が確認された。

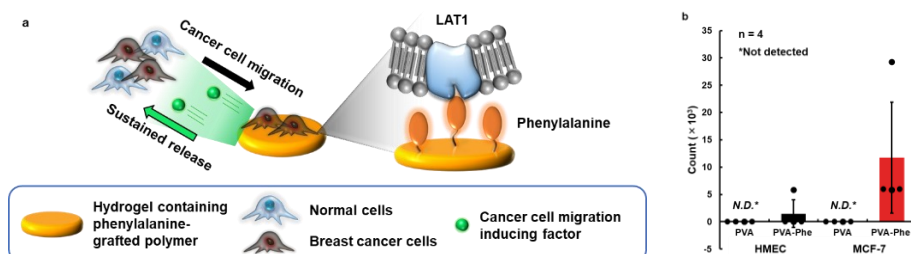


Figure 1. a) Schematic illustration of this study. b) Number of live cells adhered on the polymer.

1) R. Itani *et al.*, in submission. 2) O. Yanagida *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1514, 291.

糖供与体 4,6-O-フェニルボロン酸エステル保護基がグリコシル化反応の立体選択性に与える影響の検証

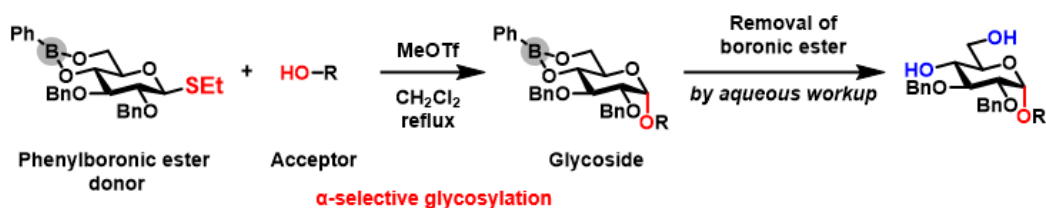
(岐阜大院連合農学¹・岐阜大 iGCORE²・岐阜大応用生命³) ○梅村 悠太¹・河村 奈緒子²・今村 彰宏^{1,2,3}・石田 秀治^{1,2,3}・安藤 弘宗^{1,2}・田中 秀則^{1,2}

Investigation on influence of 4,6-*O*-phenylboronic ester protecting group of glucosyl donor on stereoselectivity in glycosylation (¹*United Grad. Sch. Agr. Sci., Gifu Univ.*, ²*iGCORE, Gifu Univ.*, ³*Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ.*) ○Yuta Umemura¹・Naoko Komura²・Akihiro Imamura^{1,2,3}・Hideharu Ishida^{1,2,3}・Hiromune Ando^{1,2}・Hide-Nori Tanaka^{1,2}

Stereocontrol of glycosylation is one of important tasks in glycan synthesis. Stereoselective 1,2-*trans* glycosidic bond formation involves neighboring group participation of 2-*O*-acyl protecting groups. On the other hand, stereocontrol of 1,2-*cis*-glycosidic bond formation still remains challenging. Based on a previous report by Crich *et al.*¹⁾, we have reported that high 1,2-*cis* selectivity was observed in glycosylation reaction of an inositol acceptor with a 4,6-*O*-phenylboronic ester-protected glucose donor at last annual meeting. In this presentation, we investigated whether the boronic ester protecting group is a determinant of 1,2-*cis* selectivity by performing glycosylation reactions using 4,6-*O*-dibenzyl- and benzylidene-protected glycosyl donors as well as glycosyl acceptors with different steric hindrance and electronic property.

Keywords : Glycosylation; Phenylboronic ester protecting group; Stereocontrol

糖鎖合成において、グリコシル化反応の立体制御は重要な課題の一つである。2-*O*-アシル保護基の隣接基関与で立体選択的な 1,2-*trans* グリコシド結合形成が可能であるが、1,2-*cis* グリコシド結合形成の立体制御は未だ困難である。我々は、Crich らの報告¹⁾を参考にし、4,6-*O*-フェニルボロン酸エステル保護グルコース供与体とイノシトール受容体とのグリコシル化反応において高い 1,2-*cis* 選択性が発現することを昨年度大会で報告した。本発表では、4,6-*O*-ジベンジルおよびベンジリデン保護糖供与体、嵩高さや電子的性質が異なる糖受容体を用いて反応を行い、ボロン酸エステルが 1,2-*cis* 選択性を決定する因子であるかを検証した。



1) Crich, D.; de la Mora, M.; Vinod, A. U. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8142–8148.

1,5-ラクタム化シアル酸橋頭位ラジカルを利用した *C*-シアロシド合成法の開発

(岐阜大応用生物¹・岐阜大学 iGCORE²) ○小林萌々香¹、河村奈緒子²、今村彰宏^{1,2}、石田秀治^{1,2}、安藤弘宗²、田中秀則²

Development of a method for *C*-sialoside synthesis using bridgehead radical of 1,5-lactamized sialic acid (¹*Dept. Appl. Bioorg. Chem., Gifu Univ.*, ²*iGCORE, Gifu Univ.*) ○Momoka Kobayashi¹, Naoko Komura², Akihiro Imamura^{1,2}, Hideharu Ishida^{1,2}, Hiromune Ando², Hide-Nori Tanaka²

C-Glycosides, in which the oxygen atom of the glycosidic bond is replaced by a carbon atom, are metabolically stable analogs. They are expected to be useful for elucidating and improving glycan functions. Although syntheses of *C*-glycosides have made remarkable progress recently, synthesis of *C*-glycosides of sialic acid (*C*-sialosides) is still limited. Our laboratory has achieved stereoselective synthesis of *O*-sialosides by a strategy using 1,5-lactamization [ACIE 2005, 44, 6759–6763]. In this study, we addressed development of a novel method for stereoselective synthesis of *C*-sialoside based on the 1,5-lactam strategy concept. Generation of a radical at the bridgehead of 1,5-lactamized sialic acid and subsequent coupling with a radical acceptor allowed for C–C bond formation at the anomeric position of sialic acid. Using α,β -unsaturated carbonyl and cyano compounds, vinyl sulfone, and vinyl phosphonate as radical acceptors, we successfully synthesized various *C*-sialosides.

Keywords : *Sialic acid; C-Sialosides; Bridgehead radical*

グリコシド結合の酸素原子を炭素原子に置換した *C*-グリコシドは代謝安定アナログであり、糖鎖の機能解明だけでなく高機能化研究で役立つと期待されている。近年 *C*-グリコシド合成は目覚ましい発展を遂げているが、シアル酸の *C*-グリコシド (*C*-シアロシド) 合成は未だ限られている。当研究室では、1,5-ラクタム化を利用した戦略で立体選択的な *O*-シアロシド合成を達成してきた [ACIE 2005, 44, 6759–6763]。本研究では、1,5-ラクタム戦略コンセプトを基に、新たな *C*-シアロシドの立体選択的合成法の開発に取り組んだ。1,5-ラクタム化したシアル酸橋頭位でラジカルを発生させ、ラジカル受容体とのカップリング反応に供したところ、シアル酸アノマー位で炭素-炭素結合が形成された。 α,β -不飽和カルボニル・ニトリル化合物、ビニルスルホン、ビニルホスホン酸エステルをラジカル受容体として用い、様々な *C*-シアロシドの合成に成功した。

