

アカデミックプログラム [A講演] | 16. 天然物化学・ケミカルバイオロジー：口頭A講演

2024年3月19日(火) 9:00 ~ 11:30 会場 H935(9号館 [3階] 935)

[H935-2am] 16. 天然物化学・ケミカルバイオロジー

座長：Pradipta Ambara Rachmat、真鍋 良幸

◆ 日本語

9:00 ~ 9:10

[H935-2am-01]

蛍光標識リピドAの化学合成

○田中 大暉¹、下山 敦史^{1,2}、Davie Kenneth¹、深瀬 浩一^{1,2} (1. 阪大院理、2. 阪大FRC)

◆ 日本語

9:10 ~ 9:20

[H935-2am-02]

ゴルジ体選択的薬物送達法の開発と糖鎖構造制御への応用

○晦日 光希¹、真鍋 良幸^{1,2}、高倉 陽平¹、樺山 一哉^{1,2}、深瀬 浩一^{1,2} (1. 阪大院理、2. 阪大院理フォアフロント研究センター)

◆ 日本語

9:20 ~ 9:30

[H935-2am-03]

固体NMR測定を用いたドリコールとドリコールリン酸の配座・運動性解析

○南 裕介¹、真鍋 良幸^{1,2}、小野 莉紗子¹、平尾 宏太郎¹、梅川 雄一¹、村田 道雄¹、深瀬 浩一^{1,2} (1. 大阪大学大学院、2. 大阪大学フォアフロント研究センター)

◆ 日本語

9:30 ~ 9:40

[H935-2am-04]

血中内でのルイス酸触媒反応の開発

○熊倉 蓮¹、橋本 理一²、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생체機能合成化学研究室)

◆ 日本語

9:40 ~ 9:50

[H935-2am-05]

生体寛容性の有機Lewis酸触媒によるカチオン環化反応の開発

○橋本 理一¹、田中 克典^{1,2} (1. 理化学研究所、2. 東京工業大学)

◆ 日本語

9:50 ~ 10:00

[H935-2am-06]

骨表面pHを測定するFRET型レシオ蛍光イメージングプローブの開発

○三木 初音¹、蓑島 維文¹、菊地 和也^{1,2} (1. 大阪大学大学院 工学研究科、2. 大阪大学 免疫学フロンティア研究センター)

◆ 日本語

10:00 ~ 10:10

[H935-2am-07]

脂質膜のLo/Ld相を判別するレシオメトリック型蛍光プローブの開発

○杉 望未¹、山本 智也^{1,2}、菊地 和也^{1,2} (1. 大阪大学大学院工学研究科、2. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

◆ 日本語

10:10 ~ 10:20

[H935-2am-08]

液滴の成熟を検知する蛍光プローブの開発研究

○森 明日香¹、山本 智也^{1,2}、菊地 和也^{1,2} (1. 大阪大学大学院工学研究科、2. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

10:20 ~ 10:30

休憩

◆ 日本語

10:30 ~ 10:40

[H935-2am-09]

血中アルブミンを用いた体内での生体適合性人工金属酵素の開発とがん治療応用

○今井 恭祐¹、六車 共平²、中村 亜希子²、草刈 百合子²、張 宗哲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

[H935-2am-10]

脳腫瘍治療に向けた金触媒による抗がん活性分子合成研究

○原 萌理¹、大出 雄大¹、江河 泰子²、張 宗哲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

10:50 ~ 11:00

[H935-2am-11]

セラノスティクスを指向したがん細胞応答型光感受性分子—蛍光分子ハイブリッドの創製

○松永 ことの¹、高橋 南美¹、加賀谷 つぐみ¹、高橋 大介¹、戸嶋 一敦¹ (1. 慶應義塾大学)

◆ 日本語

11:00 ~ 11:10

[H935-2am-12]

エンジン系抗生物質N1999A2を基本骨格としたがん細胞応答型光感受性分子の創製

○加賀谷 つぐみ¹、2.高橋 南美¹、3.松永 ことの¹、4.高橋 大介¹、5.戸嶋 一敦¹ (1. 慶應義塾大学)

◆ 日本語

11:10 ~ 11:20

[H935-2am-13]

機械学習を用いたヒトがん細胞に対する化合物の抗がん活性の予測解析

○金子 武史¹、町田 光史¹、中尾 洋一^{1,2}、神平 梨絵¹、清野 淳司^{1,2} (1. 早大先進理工、2. 早大理工総研)

◆ 日本語

11:20 ~ 11:30

[H935-2am-14]

ラマン分光法による放線菌コロニーからの*in situ*生理活性物質スクリーニング技術の開発

○諏訪 駿之介^{1,2}、安藤 正浩³、中島 琢自³、堀井 俊平¹、松本 厚子³、穴井 豊昭⁴、竹山 春子^{1,2,3,5} (1. 早大院・先進理工、2. 産総研・早大 CBBB-OIL、3. 早大・ナノライフ創新研、4. 九大院・農、5. 早稲田大学先進生命動態研究所)

蛍光標識リピド A の化学合成

○田中 大暉¹、下山 敦史^{1,2}、Davie Kenneth¹、深瀬 浩一^{1,2}(1. 阪大院理、2. 阪大 FRC)

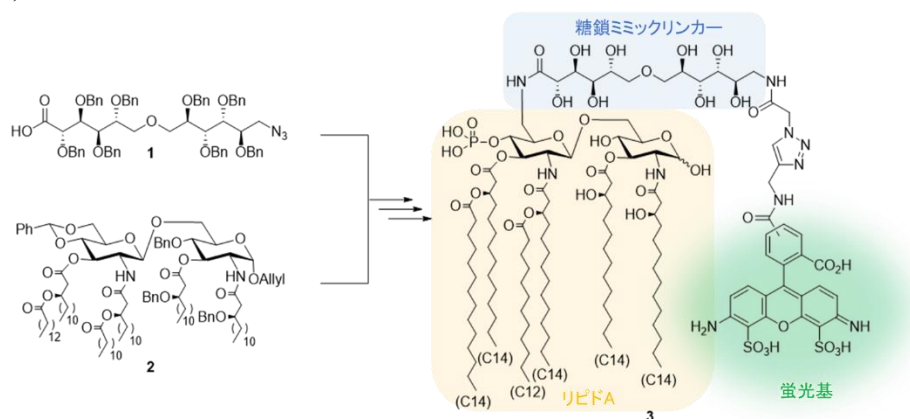
Chemical Synthesis of fluorescent labeled lipid A

○Hiroki Tanaka¹, Atsushi Shimoyama^{1,2}, Davie Kenneth¹, Koichi Fukase^{1,2} (1. Graduate School of Science, Osaka Univ, 2. Forefront Research Center, Osaka Univ)

Gram-negative bacterial outer membrane component lipopolysaccharide is a representative innate immune activator, and its active center is a terminal glycolipid, lipid A. Lipid A induces dimerization of the innate immune receptors TLR4/MD2 and oligomerization of caspase-4,5,11, and activate immune system. In this study, to elucidate the relationship between the chemical structure of lipid A with lipid A's dynamics, localization and function in the immune activation process, we synthesized fluorescent labeled lipid A based on a strategy to mimic natural LPS structure.

Keywords : Lipid A, Fluorescent label, Innate immunity

グラム陰性菌の外膜構成成分であるリポ多糖(LPS)は、代表的な自然免疫活性化因子である。LPS は多糖部の末端に活性中心である糖脂質リピド A が結合した構造をとっている。リピド A は自然免疫受容体 TLR4/MD2 のリガンドであり、受容体二量化を引き起こし、自然免疫を活性化する¹⁾。また近年、カスパーゼ-4,5,11 が細胞質内リピド A 受容体として見いだされ、細胞死誘導に関連することが報告されている²⁾。一方で、これらの過程におけるリピド A の挙動・局在は不明瞭であり、リピド A の化学構造に起因する免疫制御の分子メカニズムは完全には解明されていない。両親媒性糖脂質リピド A の活性発現には分子内の親水性と疎水性のバランスが重要で、修飾基の導入により容易に失活してしまう場合もあり、活性保持可能な修飾法は十分には検討されていない。本研究では、リピド A の可視化を目的として、活性保持のために天然 LPS 構造を模倣し、糖鎖ミミックリンカー¹を介して蛍光基を導入した標識体³(下図)を合成した。現在、³の精製法を検討中である。



1)A.Molinaro, et al., *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 500-519 2)F. Shao, et al., *nature.* **2014**, *514*, 187-192

ゴルジ体選択的薬物送達法の開発と糖鎖構造制御への応用

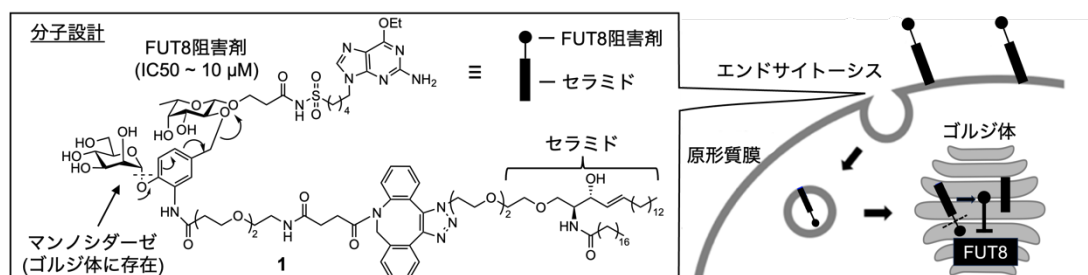
(阪大院理¹・阪大院理 FRC²) ○晦日 光希¹・真鍋 良幸^{1,2}・高倉 陽平¹・樺山 一哉^{1,2}・深瀬 浩一^{1,2}

Development of Golgi-selective drug delivery system and its application for glycan structure modulation (¹Graduate School of Science, Osaka University, ²Graduate School of Science, Forefront Research Center) ○Koki Hizume¹・Yoshiyuki Manabe^{1,2}・Yohei Takakura¹・Kazuya Kabayama^{1,2}・Koichi Fukase^{1,2}

Since many glycosyltransferase inhibitors mimic sugar nucleosides, they exhibit low membrane permeability, limiting their application in cell based assay. This study aims to develop a method for delivering these membrane-impermeable compounds to the Golgi apparatus. We utilized ceramide lipids, which is known to be transported from the plasma membrane to the Golgi membrane. To achieve Golgi selective drug delivery, we designed to connect the drug (payload) with ceramide through a linker that can be cleaved in the Golgi. We initiated the investigation with the introduction of various fluorescent groups to the ceramide head and observed their intracellular localization. This observation confirmed rapid cellular uptake of ceramide conjugated compound although their localization depends on their structure of head group. Furthermore, we synthesized compound **1**, which includes the fucosyltransferase (FUT8) inhibitor as the payload. Currently, we are conducting functional evaluations of this compound in cell systems.

Keywords : Drug delivery system; Golgi apparatus; Glycosyltransferase inhibitor

糖鎖生合成酵素阻害剤の多くは基質である糖ヌクレオシドをミミックしており、膜透過性が低く、細胞系での利用が困難である。本研究では、このような膜非透過性の分子をゴルジ体へ送達する手法の開発を目指した。我々は、原形質膜からゴルジ体膜へ移行することが知られているセラミド脂質に着目した。すなわち、ゴルジ体へ送達する薬物（ペイロード）をゴルジ体で切断可能なリンカーを介してセラミドと連結することで、ペイロードをゴルジ体内腔へ送達できると考えた。まず、セラミド頭部にさまざまな蛍光基を導入し、その動態を調べたところ、蛍光基により細胞内での局在が変化するものの、いずれも細胞内に速やかに取り込まれることを確認した。さらに、ペイロードとして、我々の開発した糖転移酵素（FUT8）阻害剤を導入した化合物 **1** を合成し、現在、その細胞系での機能評価を進めている。



固体 NMR 測定を用いたドリコールとドリコールリン酸の配座・運動性解析

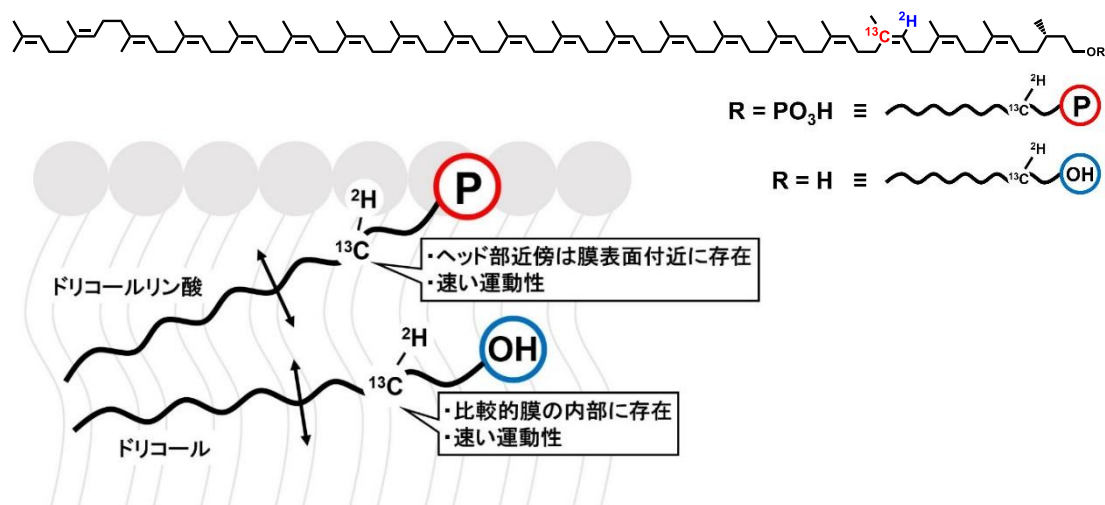
(阪大院理¹・阪大 FRC²) ○南 裕介¹・真鍋 良幸^{1,2}・小野 莉紗子¹・平尾 宏太郎¹・梅川 雄一¹・村田 道雄¹・深瀬 浩一^{1,2}

Conformational and dynamics analysis of dolichol and dolichol phosphate using solid-state NMR (¹Graduate School of Science, Osaka University, ²Forefront Research Center, Osaka University) ○Yusuke Minami,¹ Yoshiyuki Manabe,^{1,2} Risako Ono,¹ Kotaro Hirao,¹ Yuichi Umegawa,¹ Michio Murata,¹ Koichi Fukase^{1,2}

Dolichol is a long-chain isoprene lipid that functions as a carrier of glycans in the post-translational glycosylation process. We designed and synthesized doubly labeled dolichol and dolichol phosphate with ¹³C and ²H for revealing their conformation and dynamics in the lipid bilayer. Solid state NMR analysis using these compounds revealed that phosphate head group of dolichol phosphate locates at the membrane surface, and the lipid part near the head is highly tilted from the axis perpendicular to the membrane plane. On the other hand, as for dolichol lacking phosphate substitution, even their head part existed inside the membrane, suggesting its spontaneous flip-flop without flippase. In addition, these measurements indicated the high mobility of dolichol chain in the lipid bilayer.

Keywords : Dolichol; Dolichol Phosphate; Solid State NMR; Isotope labeled probe

ドリコールは、翻訳後糖鎖修飾において糖鎖のキャリアとなる長鎖イソプレン脂質である。我々は、¹³C と ²H を同一平面状に二重標識したドリコールおよびドリコールリン酸を設計・合成し、固体 NMR により、その脂質二重膜中での配座・運動性を解析した。その結果、ドリコールリン酸は、リン酸部が膜表層にアンカリングし、ヘッド部近傍は膜法線に対して大きく傾いていることが分かった。一方で、ドリコールは、ヘッド部近傍も含めて脂質二重膜の内部に存在していることが分かり、そのフリップフロップにフリッパーゼを要さないことが示唆された。さらに、ドリコールとドリコールリン酸は、いずれも脂質二重膜中で高い運動性をもつことが示された。



血中内でのルイス酸触媒反応の開発

(東工大物質理工¹・理研 開拓研究本部 田中生体研²) ○熊倉 蓮¹・橋本 理一²・プラディプタ アンバラ¹・張 宗哲¹・田中 克典^{1,2}

Development of Lewis-acid catalyzed reaction in blood (¹*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology*, ²*Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN*) ○Ren Kumakura,¹ Riichi Hashimoto,² Ambara R. Pradipta,¹ Tsung-Che Chang,¹ Katsunori Tanaka^{1,2}

Our research has shown that inserting metal catalysts into albumin's hydrophobic pockets can stabilize it in vivo and protect it from biomolecules such as glutathione.^{1,2)} We have also discovered that adding glycan clusters to the albumin's surface helps selectively recognize cancer cells.³⁾ Moreover, we have synthesized anti-cancer compounds using glycosylated artificial metalloenzymes.⁴⁾ Additionally, we investigated a Lewis-acid-based artificial metalloenzyme that catalyzes reactions in blood. Our artificial metalloenzyme induced Lewis-acid-catalyzed reactions.

Keywords: *In vivo synthesis; Cancer therapy; Lewis acid catalyst; Artificial metalloenzyme; Bioactive compound*

当研究室ではこれまでに生体内環境においても金属触媒をアルブミンの疎水性ポケットに導入することによってグルタチオンなどの触媒毒となる分子から保護され、生体内環境でも安定化されることを見出した。^{1,2)} また、アルブミン表面に糖鎖クラスターを導入することでがん細胞を選択的に見分けることができることも見出した。³⁾ さらに、糖鎖修飾したアルブミンを金属触媒の運び屋として用いることで人工金属酵素による金属触媒反応によって抗がん活性を示す分子の合成に成功した。⁴⁾ 本研究ではこれまでに見出された人工金属酵素の手法を応用することでルイス酸触媒反応を起こすことができるのではないかと考えた。本研究では生体寛容性のルイス酸触媒活性を示す人工金属酵素を作成し、血中内でのルイス酸触媒反応について検討を行った。本発表では、これまでの成果について報告する。

- 1) S. Eda, I. Nasibullin, K. Vong, N. Kudo, M. Yoshida, A. Kurbangalieva, and K. Tanaka, *Nature Catal.* **2019**, *2*, 780.
- 2) T.-C. Chang, K. Vong, T. Yamamoto, and K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 12446.
- 3) I. Smirnov, R. Sibgatullina, S. Urano, T. Tahara, P. Ahmadi, Y. Watanabe, A. R. Pradipta, A. Kurbangalieva, and K. Tanaka, *Small*, **2020**, *16*, 2004831
- 4) I. Nasibullin, I. Smirnov, P. Ahmadi, K. Vong, A. Kurbangalieva and K. Tanaka, *Nature Commun.*, **2022**, *13*, 39.

生体寛容性の有機 Lewis 酸触媒によるカチオン環化反応の開発

(理研 開拓研究本部 田中生体研¹・東工大物質理工²) ○橋本 理一¹・田中 克典^{1,2}
Development of Cationic Cyclization by Biocompatible Lewis Acidic Catalyst. (¹*Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN*, ²*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology*) ○Riichi Hashimoto,¹ Katsunori Tanaka^{1,2}

We developed the biocompatible transition metal catalyst utilizing hydrophobic pocket of human serum albumin.¹⁾ Furthermore, the glycosylation of human serum albumin enabled the synthesis of drugs near cancer tissues.²⁾ Several reactions by transition metal catalysts such as Ru and Au have been developed.^{3,4)}

We worked on the synthesis of natural product derivatives possessing anticancer activity by Lewis acidic catalyst toward the therapeutic *in vivo* synthetic chemistry. Details will be presented at the symposium.

Keywords : *Artificial Metalloenzyme; Cationic Cyclization; Lewis Acidic Catalyst; Cancer*

所属研究室はヒト血清アルブミンの疎水性ポケットを利用し、グルタチオンなどの触媒毒が存在する生体内においても機能する遷移金属触媒を開発した¹⁾。さらにアルブミンに糖鎖クラスターを導入することにより、がん組織近傍で薬剤を合成することが可能になった²⁾。これまでに Au や Ru などの遷移金属を導入した人工金属酵素による反応を見出している。^{3,4)}

本研究では Lewis 酸触媒を用いたカチオン環化反応を開発し、生物活性物質の生体内合成を目的とした。Lewis 酸を生体内で用いる場合、遷移金属と同様にグルタチオンなどによる失活が懸念されるが、疎水性ポケットを用いれば解決できると期待した。検討の結果、フラスコ内において Lewis 酸触媒を用いるとカチオン環化反応が進行し、抗がん活性を示す天然物誘導体の合成に成功した。Lewis 酸触媒とクマリンを結合した生体寛容性触媒の合成検討についても発表する。

- 1) Biocompatibility and therapeutic potential of glycosylated albumin artificial metalloenzymes. S. Eda, I. Nasibullin, K. Vong, M. Kudo, M. Yoshida, A. Kurbangalieva, K. Tanaka, *Nature Catal.* **2019**, 2, 780.
- 2) Disrupting tumor onset and growth via selective cell tagging (SeCT) therapy. K. Vong, T. Tahara, S. Urano, I. Nasibullin, K. Tsubokura, Y. Nakao, A. Kurbangalieva, H. Onoe, Y. Watanabe, K. Tanaka. *Sci. Adv.* **2021**, 7, eabg4038.
- 3) Prodrug activation by gold artificial metalloenzyme-catalyzed synthesis of phenanthridinium derivatives via hydroamination. T.-C. Chang, K. Vong, T. Yamamoto, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 2.
- 4) Synthetic prodrug design enables biocatalytic activation in mice to elicit tumor growth suppression. I. Nashibullin, I. Smirnov, P. Ahmadi, K. Vong, A. Kurbangalieva, K. Tanaka, *Nature Commun.* **2022**, 13, 39.

骨表面 pH を測定するレシオ蛍光イメージング用色素の開発

(¹ 阪大院工、² 阪大免疫学フロンティア研究センター) 三木初音¹・○蓑島維文¹・菊地和也^{1,2} (¹ Graduate School of Engineering, Osaka University, ² IFRc, Osaka University)
Hatsune Miki¹, ○Masafumi Minoshima¹, Kazuya Kikuchi^{1,2}

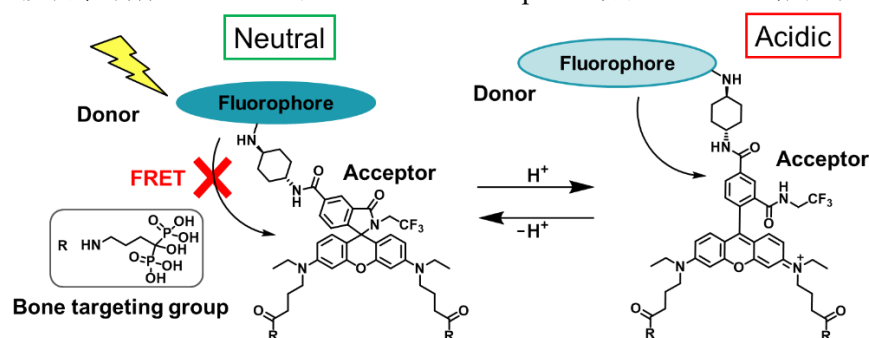
In bone tissue, bone-resorbing osteoclasts and bone-forming osteoblasts are deeply involved in the maintenance of bone homeostasis. In particular, excessive bone resorption causes various bone diseases, and imaging technology for detection of osteoclast activity *in vivo* is a useful tool for the development of new drugs and therapies. We have previously developed fluorescent probes to detect osteoclast activity.^{1,2} They have a fluorescent OFF/ON switch function that responds to the acidic regions formed by osteoclasts during bone resorption. Owing to the bisphosphonates in the probes, they are delivered to bone tissues in the body. By administering the probe to osteoclast-labeled mice with fluorescent proteins, the osteoclast localization and activity was simultaneously visualized using a two-photon excitation microscopy.

In this study, we developed a FRET-type ratiometric fluorescent probe to quantitatively measure the pH in bone tissue. The probe was designed based on the fluorescence spectral shift by changing the overlap integral between FRET donor and acceptor in different pH. In this presentation, we report the design and synthesis of the probe and its pH responsiveness *in vitro* and *in vivo*.

Keywords : Osteoclast; Fluorescent probe; pH responsive; FRET; Ratio imaging

骨組織では、骨吸収を行う「破骨細胞」と骨形成を行う「骨芽細胞」が存在し、骨の恒常性の維持に深く関連している。特に、過剰な骨吸収は様々な骨疾患の要因となるとされており、新薬開発や治療法の確立のために、生体内における破骨細胞活性を検出可能とするイメージング技術は有用な手段である。我々は以前に、破骨細胞活性検出蛍光プローブ^{1,2}を開発した。これは破骨細胞が骨吸収過程で形成する酸性領域に応答する蛍光 OFF/ON スイッチ機能を有し、さらに体内の骨組織へ自発的に送達される。破骨細胞を蛍光タンパク質で標識したマウスにプローブを投与することで、破骨細胞局在と活性情報の同時取得が可能である。

本研究では、破骨細胞付近の pH を定量的に測定するために、pH の変化で蛍光波長が変化する FRET 型レシオ蛍光プローブ (下図) の開発に取り組んだ。本発表では、プローブの設計、合成と *in vitro* 及び *in vivo* での pH 応答性について報告する。



1) H. Maeda, T. Kowada, J. Kikuta, M. Furuya, M. Shirazaki, S. Mizukami, M. Ishii, K. Kikuchi, *Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 579. 2) M. Minoshima, J. Kikuta, Y. Omori, S. Seno, R. Suehara, H. Maeda, H. Matsuda, M. Ishii, K. Kikuchi, *ACS Cent. Sci.* **2019**, 5, 1059.

脂質膜の Lo/Ld 相を判別するレシオメトリック型蛍光プローブの開発

(阪大院工¹・IFReC²) ○杉 望未¹・山本 智也^{1,2}・菊地 和也^{1,2}

Development of a fluorescent probe to discriminate Lo/Ld phases of lipid membranes
(¹Graduate School of Engineering, Osaka Univ, ²Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ) ○Nozomi Sugi,¹ Tomoya Yamamoto,^{1,2} Kazuya Kikuchi^{1,2}

Due to their diverse lipid composition, biological membranes form heterogeneous states separated into liquid-ordered (Lo) and liquid-disordered (Ld) phases. Since the phase separation and fluidity of membranes have been suggested to affect the function and dynamics of membrane proteins, it is important to develop fluorescent probes that visualize the phases and fluidity of lipid membranes. In this study, we aimed to develop a novel fluorescent probe that can visualize the phase state and quantify the fluidity of lipid membranes by using the intensity ratio of different fluorescence wavelengths. In biological membranes, the Lo phase, which contains cholesterol, saturated phospholipids, and sphingolipids, is known to have lower fluidity than the Ld phase. We have developed a fluorescent probe that changes the intensity ratio of multiple fluorescence wavelengths depending on the surrounding viscosity due to its conformational flexibility. We have applied this probe to lipid membranes and found that the intensity ratio at different fluorescence wavelengths changes significantly in the Lo and Ld phases. In this work, we will report on the application of the developed probe to ratiometric fluorescence imaging.

Keywords : Fluorescence probes; lipid membrane; Fluorescence imaging; Environmental responsiveness

生体膜はその多様な脂質構成から、液体秩序(Lo)相および液体無秩序(Ld)相に分離した不均一な状態を形成する。このような膜の相分離や流動性の違いは、膜タンパク質の機能や動態に影響することが示唆されているため、相状態や流動性の違いを可視化する蛍光プローブの開発は重要である。そこで本研究では異なる蛍光波長の強度比によって脂質膜の相状態を可視化し、流動性を定量化できる新規蛍光プローブの開発を目指した。生体膜においてコレステロールや飽和リン脂質、スフィンゴ脂質が多く含まれる Lo 相は、Ld 相に比べて低い流動性を示すことが知られている。我々は周囲の粘性に起因する配座自由度の違いに応じて、異なる蛍光波長の強度比が変化する蛍光プローブを開発した。この蛍光プローブを脂質膜に応用した結果、Lo 相と Ld 相において、異なる蛍光波長での蛍光強度比が明確に変化することを確認した。本発表では開発した蛍光プローブのレシオ蛍光イメージングへの応用について合わせて報告する予定である。

液滴の成熟を検知する蛍光プローブの開発研究

(大阪大学大学院工学研究科 ¹・大阪大学免疫学フロンティア研究センター ²) ○森明日香 ¹・山本智也 ^{1,2}・菊地和也 ^{1,2}

Development of fluorescent probes to detect maturation of liquid droplets

(¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²Immunology Frontier Research Center, Osaka University) ○Asuka Mori,¹ Tomoya Yamamoto,^{1,2} Kazuya Kikuchi,^{1,2}

Droplets formed by liquid-liquid phase separation of biological macromolecules are thought to regulate various cellular functions such as protein expression. It is also known that the fluidity inside the droplet decreases with time, which initiates amyloid fibril elongation. Therefore, the methods to observe the formation and maturation of droplets need to be developed. In this study, we aimed to develop novel fluorescent probes to observe droplet formation and maturation by fluorescence imaging. Since the fluidity in droplet decreases during maturation, we considered using viscosity-responsive fluorescent probes to observe droplet maturation. We synthesized several fluorescent probes that can evaluate viscosity by the ratio of fluorescence intensity at different wavelengths, and investigated their viscosity response and polarity response. We will also report the results of applying these probes to the droplet formation conditions of FUS (Fused in sarcoma), a protein known to form intracellular droplets.

Keywords : LLPS; Fluorescent probe; Environmental responsivity; Amyloid

生体高分子の液液相分離によって形成される液滴は、タンパク質発現等、様々な細胞機能を制御すると考えられている。また、液滴内部の流動性が時間経過とともに低下し、アミロイド線維伸長の起点となることも知られている。よって、液滴の形成・成熟をリアルタイム観測する手法の開発は重要である。本研究では、液滴の形成と成熟を観測する蛍光プローブの開発を目指した。我々は、液滴の成熟によって液滴内部の流動性が低下することに着目し、液滴の成熟観測に粘度応答性の蛍光団を用いることを考えた。異なる蛍光波長の強度比で粘度を評価できる蛍光プローブを合成し、それらの粘度応答性や極性応答性を調べた。さらに本発表では、細胞内で液滴を形成する FUS (Fused in sarcoma) タンパク質^[1]の液滴形成条件に本蛍光プローブを応用した結果も併せて報告する予定である。

[1] A. Patel *et al.*, A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation, *Cell* **2015**, 162, 1066.

血中アルブミンを用いた体内での生体適合性人工金属酵素の開発とがん治療応用

(東工大物質理工¹・理研 開拓研究本部 田中生体研²) ○今井 恭祐¹・六車 共平²・中村 亜希子²・草刈 百合子²・張 宗哲¹・プラディプタ アンバラ¹・田中 克典^{1,2}
Highly efficient *in vivo* synthetic anticancer approach by resourcing mouse blood albumin as biocompatible artificial metalloenzyme (¹*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology*, ²*Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN*) ○Kyosuke Imai,¹ Kyohei Muguruma,² Akiko Nakamura,² Yuriko Kusakari,² Tsung-Che Chang,¹ Ambara R. Pradipta,¹ Katsunori Tanaka^{1,2}

We have been developing a method to synthesize drugs at the tumor site to increase selective toxicity. Our recent study found that a metal catalyst could be used to create an albumin-based artificial metalloenzyme that could be modified with a targeting molecule to accumulate in cancer cells. We then performed a metal-catalyzed reaction in mice to treat cancers.^{1,2} We attempted to synthesize the albumin-based artificial metalloenzyme directly from blood albumin in a live mouse.

Keywords: Cancer therapy; Transition-metal catalyst; Artificial metalloenzyme; Albumin; *In vivo synthesis*

がん治療においてはがん細胞の成長を抑制するだけでなく、正常細胞に悪影響を及ぼさないように副作用を抑えることが重要である。その方法として、無毒性の化合物を生体内で毒性物質に変換する方法や、抗がん剤を選択的に狙った組織に送達する方法などがある。我々はこれまでに、(1) 生体内で不安定な遷移金属触媒をアルブミンの疎水性ポケットで保護できること(2) アルブミンの表面をターゲティング分子で修飾すると、特定の組織にアルブミン分子が集積することを見出した。この発見から、アルブミンを遷移金属触媒とターゲティング分子で修飾した人工金属酵素によって、マウス体内において遷移金属触媒反応による副作用のないがん治療を行うことに成功した^{1,2}。

今回、遷移金属触媒とターゲティング分子を静脈に投与することで、血中アルブミンから人工金属酵素を直接合成することを試みた。また、抗がん剤の前駆体を用いてマウスでのがん治療の検討も行ったので、これらの結果について報告する。

- 1) P. Ahmadi, K. Muguruma, T.-C. Chang, S. Tamura, K. Tsubokura, Y. Egawa, T. Suzuki, N. Dohmae, Y. Nakao, K. Tanaka, *Chem. Sci.* **2021**, 12, 12266.
- 2) I. Nasibullin, I. Smirnov, P. Ahmadi, K. Vong, A. Kurbangalieva, K. Tanaka, *Nature Commun.* **2022**, 13, 39.

脳腫瘍治療に向けた金触媒による抗がん活性分子合成研究

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

Synthetic study of anticancer molecules using gold-catalyst against brain tumors (¹*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology*, ²*Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN*) ○Moeri Hara,¹ Yudai Ode,¹ Yasuko Egawa,² Ambara R. Pradipta,¹ Tsung-Che Chang,¹ Katsunori Tanaka^{1,2}

We have previously reported an albumin-metal catalyst complex to catalyze in vivo synthesis of an anticancer compound.^{1,2)} This study aimed to explore in vivo synthetic chemical therapy for treating brain tumors. We investigated metal-catalyzed reactions using targeting molecules that could penetrate the blood-brain barrier. We also examined a biocompatible gold-mediated reaction that allowed for drug synthesis from a non-active prodrug to a drug in the brain.

Keywords: Cancer therapy; Transition-metal catalyst; Prodrug; Blood-brain barrier; In vivo synthesis

腫瘍治療では副作用が伴うため、当研究室では腫瘍近辺でドラッグを生体内合成することで副作用のない治療についての研究を行ってきた。その結果、タンパク質であるアルブミンに有用性を見出した。アルブミンの持つ疎水性ポケットに金属触媒を導入することにより生体内で金属触媒反応が可能となった。金属触媒は生体内では水やグルタチオン等で被毒するが、疎水性ポケットでそれらから守られる。また、アルブミンの糖鎖をデザインすることで生体内の特定の部位に集積させることもできる。そこで本研究では、治療の最難関である脳腫瘍治療に向けて、脳内での生体内合成化学治療を目指した。

我々は、血液脳関門を突破するターゲティング分子を用い、脳内で金属触媒反応を行うことを検討した。今回、新たなプロドラッグを合成し、細胞での評価を行ったので、これらの経緯について報告する。

- 1) S. Eda, I. Nasibullin, K. Vong, N. Kudo, M. Yoshida, A. Kurbangalieva, K. Tanaka, *Nature Catal.* **2019**, 2, 780.
- 2) T.-C. Chang, K. Vong, T. Yamamoto, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 2-11.

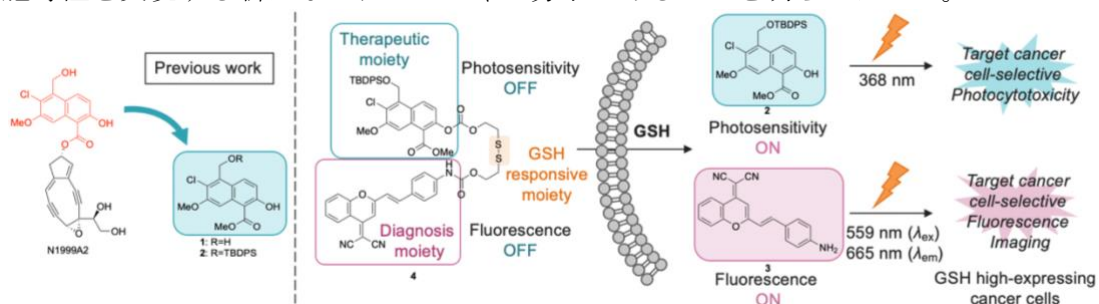
セラノスティクスを指向したがん細胞応答型光感受性分子—蛍光分子ハイブリッドの創製

(慶大理工) ○松永 ことの・高橋 南美・加賀谷 つぐみ・高橋 大介・戸嶋 一敦
 Creation of Cancer Cell-Responsive Photosensitizer—Fluorophore Hybrids as Theranostic Agents (*Faculty of Science and Technology, Keio University*) ○Kotono Matsunaga, Minami Takahashi, Tsugumi Kagaya, Daisuke Takahashi, Kazunobu Toshima

Theranostics is a new medical technology that uses theranostic drugs that link drug molecules such as anticancer drugs with diagnostic molecules such as fluorescent agents. Our laboratory has previously found that the naphthol moiety **1** of the enediyne antibiotic N1999A2 is a photosensitizer that exhibits photocytotoxicity under non-harmful long-wavelength UV light irradiation. In addition, compound **2**, in which the primary hydroxy group of **1** is protected with a TBDPS group, was found to exhibit higher photocytotoxicity than **1**. In this study, the design, synthesis, and biological evaluation of a novel theranostic molecule **4** linked **1** and fluorescent molecule **3** through a disulfide bond cleaved in response to glutathione (GSH), a biomarker overexpressed in cancer cells. It was found that **4** changes in its fluorescence and photosensitivity from OFF to ON in response to GSH, enabling cancer cell-selective fluorescence imaging and photocytotoxicity.

Keywords : *Enediyne Antibiotics; N1999A2; Photosensitizers; Photocytotoxicity; Theranostics*

セラノスティクスとは、抗がん剤などの薬剤分子と蛍光剤などの診断分子を連結したセラノスティック薬剤を用いる新たな医療技術である。当研究室ではこれまでに、エンジニン系抗生物質 N1999A2 のナフトール部分 **1** が、人体に無害な長波長紫外光の照射下、タンパク質を光分解し、かつ光細胞毒性を発現する光感受性分子であることを見出している。さらに、**1** の 1 級水酸基を TBDPS 基で保護した **2** が、より高い光細胞毒性を発現することも明らかにしている¹⁾。そこで本研究では、がん細胞選択的に応答するセラノスティック分子の創製を目的とし、**2** と蛍光分子 **3** を、がんバイオマーカーのグルタチオン (GSH) と反応して開裂するジスルフィド結合で連結した **4** のデザイン、合成、及び機能評価を行った。その結果、**4** が、GSH 過剰発現がん細胞選択的に応答することで、**2** と **3** を放出し、がん細胞選択的な蛍光イメージングと光細胞毒性を実現する新たなセラノスティック分子であることを明らかにした。



1) 高橋南美, 松永ことの, 北村貴士, 高橋大介, 戸嶋一敦, 日本化学会, **2022**, D1442-1am-12.

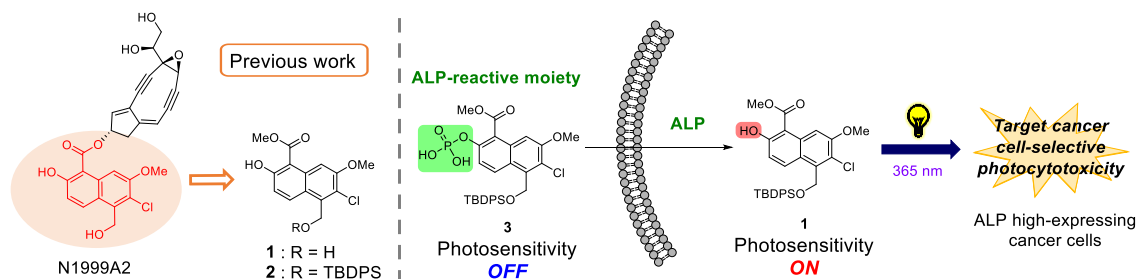
エンジン系抗生物質 N1999A2 を基本骨格としたがん細胞応答型光感受性分子の創製

(慶大理工) ○加賀谷 つぐみ・高橋 南美・松永 ことの・高橋 大介・戸嶋 一敦
 Creation of Novel Cancer Cell-Activatable Photosensitizers Based on an Eneidyne Antibiotic, N1999A2 (*Faculty of Science and Technology, Keio University*) ○Tsugumi Kagaya, Minami Takahashi, Koton Matsunaga, Daisuke Takahashi, Kazunobu Toshima

Photosensitizers are compounds that produce reactive oxygen species under irradiation of specific wavelengths of light and are widely applied in cancer therapy. However, conventional photosensitizers are always light-sensitive ON and have problems causing side effects. Therefore, it is desirable to develop stimulus-responsive photosensitizers that express photosensitivity in response to biomarkers overexpressed in cancer cells. Our group has previously found that the aromatic ring moiety **1** of the eneidyne antibiotic N1999A2 exhibits photocytotoxicity and that compound **2**, in which the primary hydroxy group of **1** is protected with a TBDPS group, increases photocytotoxicity. In this study, the design, synthesis, and biological evaluation of a new stimulus-responsive photosensitizer **3** that responds to alkaline phosphatase (ALP), a biomarker overexpressed in certain cancer cells. As a result, it was found that **3** selectively exhibits photocytotoxicity in cancer cells overexpressing ALP.

Keywords : Eneidyne Antibiotic; N1999A2; Photosensitizer; Photo-Cytotoxicity; Stimulus-Responsive

光感受性分子は、特定波長の光照射下で活性酸素種を生成する化合物であり、がん治療に応用されている。しかし、従来の光感受性分子は、常に光感受性がオンであるため副作用を発現する課題が残されている。そのため、がん細胞に過剰発現するバイオマーカーに応答して光感受性を発現する刺激応答型光感受性分子の開発が望まれている。このような背景の中、当研究室では、エンジン系抗生物質 N1999A2 の芳香環部分 **1** が光細胞毒性を有すること、及び **1** の1級水酸基を TBDPS 基で保護した **2** の光細胞毒性が向上することを見出している¹⁾。そこで本研究では、**2** を基本骨格とし、ある種のがん細胞で高発現しているアルカリフォスファターゼ(ALP)に応答する、新たな刺激応答型光感受性分子 **3** のデザイン、合成、及び機能評価を行った。その結果、**3** が、ALP 過剰発現がん細胞選択的に光細胞毒性を発現することを見出した。



- 1) 高橋南美, 松永ことの, 加賀谷つぐみ, 高橋大介, 戸嶋一敦, 日本化学会, **2022**, D1442-1am-12.

機械学習を用いたヒトがん細胞に対する化合物の抗がん活性の予測解析

(早大先進理工¹・早大理工総研²) ○金子 武史¹・町田 光史¹・神平 梨絵¹・中尾 洋一^{1,2}・清野 淳司^{1,2}

Prediction of anticancer activity by chemical regents on human cancer cells using machine learning (¹*School of advanced Science and Engineering, Waseda University*, ²*Waseda Research Institute for Science and Engineering*) ○Takeshi Kaneko¹, Koshi Machida¹, Rie Kamihira¹, Yoichi Nakao^{1,2}, Junji Seino^{1,2}

In search of natural products, it is also important to discover the unknown biological activity of known compounds. However, development of the predictions of the activity from chemical structures remains challenging. In this study, we focused on anticancer activity and developed a model to predict the cytotoxic activity of compounds using machine learning and a huge amount of drug sensitivity data in NCI-60.

Keywords : Machine Learning; Human Cancer Cell ; Anticancer Activities of Compounds

【緒言】天然化合物の探索研究では、新規化合物の発見とともに、既知化合物の新規生物活性を見出すことも同様に重要である。多様な構造に適用可能な化学構造から生物活性を予測する手法の開発研究は盛んになりつつあるが、広く実用化される段階には至ってはいない。そこで本研究では簡便に生物活性予測が可能となる手法の確立を目指し、がん細胞パネル試験による抗がん活性評価結果と化学構造の関係性に着目し、機械学習を用いて化学構造から抗がん活性を予測するモデルを開発した。

【抗がん活性の予測】本研究では、アメリカ国立がん研究所（NCI）で確立されたヒトがん細胞株60種に対する抗がん剤スクリーニング用パネル内の薬剤感受性データを活用した¹⁾。予測値として50%増殖阻害濃度値（GI50）を採用した。約25,000個の化合物を用い、各細胞株に対してモデルを構築した。機械学習手法としてランダムフォレスト回帰を、記述子としてRDKitライブラリに含まれる分子フィンガープリントおよび2次元分子記述子を用いた²⁾。ハイパーパラメータはOptunaを利用して最適化し、五分割交差検証により予測性能を評価した。

NCI-H23 細胞株に対する予測では、平均絶対誤差（MAE）が 0.338、2 乗平均平方根誤差（RMSE）が 0.504、決定係数（ R^2 ）が 0.835 となり（Fig. 1）、多くの化合物に対して高い精度で GI50 を予測できることが確認された。また、59 種の細胞株に対する R^2 値が 0.7 以上となり（Fig. 2）、細胞種によらない高い予測精度が得られた。

1) https://ntp.cancer.gov/discovery_development/nci-60.

2) <https://www.rdkit.org>.

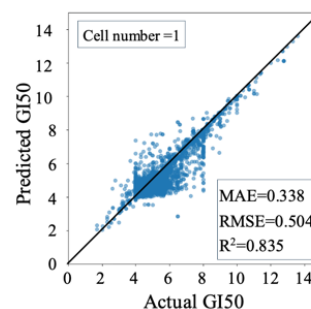


Figure 1. Scatter plot in GI50 predictions for NCI-H23 cell.

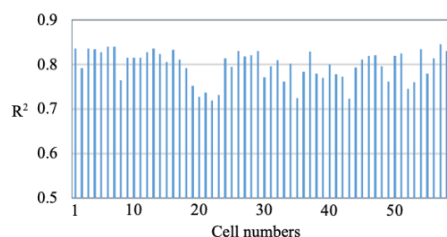


Figure 2. Results of R^2 values in 59 cells.

ラマン分光法による放線菌コロニーからの生理活性物質の *in situ* スクリーニング技術の開発

(早大院・先進理工¹・産総研・早大 CBBDOIL²・早大・ナノライフ創新研³・九大院・農⁴・早稲田大学先進生命動態研究所⁵) ○諏訪 駿之介^{1,2}、安藤 正浩³、中島 琢自³、堀井 俊平¹、松本 厚子³、穴井 豊昭⁴、竹山 春子^{1,2,3,5} Raman spectroscopy-based screening technique for secondary metabolites produced by actinomycetes colonies (¹Grad. Sch. Adv. Sci. Eng., Waseda Univ., ²CBBDOIL, AIST-Waseda Univ., ³Res. Org. Nano Life Innov., ⁴Grad. Sch. Agri., Kyushu Univ., ⁵Inst. Adv. Res. Biosyst. Dyn., Waseda Res. Inst. Sci. Eng., Waseda Univ.) ○Shunnosuke Suwa^{1,2}, Masahiro Ando³, Takuji Nakashima³, Shumpei Horii¹, Atsuko Matsumoto³, Toyoaki Anai⁴, Haruko Takeyama^{1,2,3,5}

Actinomycetes produce a variety of secondary metabolites, which are actively used in medical fields. The screening for new candidates from actinomycetes is an ongoing process worldwide. However, conventional methods require mass cultures and sample processing, significantly reducing throughput. A colony-based screening on agar dishes could greatly improve overall throughput. In this research, we aimed to develop the technique by employing Raman spectroscopy for *in situ* biomolecular detection.

As a result of optimization efforts, we succeeded in *in situ* Raman measurements of *Streptomyces* colonies, achieving a time as short as one minute per each colony at best. Moreover, by applying spectral decomposition technique (MCR-ALS), we were able to evaluate secondary metabolite production at single colony scale. These results pave the way for the development of a new screening technique.

Keywords : Raman spectroscopy; microbe; secondary metabolite; Spectral analysis;

放線菌は多様な二次代謝産物を産生しており、医薬品として活用されている化合物も多い^[1]。新規医薬品候補を求めた放線菌のスクリーニングは現在も行われているが、既存手法は大量培養と、そのサンプル処理を前提とし、スループットが非常に低いことが課題である。シャーレ上のコロニーから直接に二次代謝産物のスクリーニングが可能となれば、スループットの大きな向上が見込まれる。そこで、本研究では *in situ* で分子検出が可能なラマン分光法を用いて、スクリーニング技術の開発を目指した。

培養手法と測定条件の最適化を行うことで、これまで困難であったコロニー (*Streptomyces* 属) の *in situ* ラマン測定が、1コロニー約1分で行えるようになった。またスペクトル分解 (MCR-ALS^[2]) によって、コロニー単位で二次代謝産物の産生を評価することが可能となり、新しいスクリーニング技術としての可能性を示せた。

本研究は内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業 (JPJ009237、管理法人: 生研支援センター) によって実施されました。

- 1) Bérty, J.: Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading, Journal of Antibiotics, vol. 65, 385-395, (2012).
- 2) Ando, M. and Hamaguchi, H.-o.: Molecular component distribution imaging of living cells by multivariate curve resolution analysis of space-resolved Raman spectra, J. Biomed. Opt., 19, (2013).

