

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

📅 2024年3月19日(火) 13:00 ~ 15:40 📍 H935(9号館 [3階] 935)

[H935-2pm] 16. 天然物化学・ケミカルバイオロジー

座長：大神田 淳子、堀 雄一郎

◆ 日本語

13:00 ~ 13:20

[H935-2pm-01]

天然変性領域のケミカルリデザインによる植物ホルモン関連転写因子の選択的阻害剤の開発

○高岡 洋輔¹、劉 瑞琦¹、李 奇¹、上田 実^{1,2} (1. 東北大院理、2. 東北大院生命科学)

◆ 英語

13:20 ~ 13:40

[H935-2pm-02]

無洗浄生細胞イメージングが可能な光スイッチング蛍光分子の開発

○鳥井 健司¹、Benson Sam⁴、Vendrell Marc⁴、堀 雄一郎²、菊地 和也^{1,3} (1. 大阪大学、2. 九州大学、3. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター、4. エディンバラ大学)

13:40 ~ 13:50

休憩

◆ 英語

13:50 ~ 14:10

[H935-2pm-03]

生細胞イメージングのための疎水性バイオイソスタール結合型蛍光プローブの開発

○上川 拓也¹、橋本 明莉²、山崎 のぞみ²、足立 惇弥¹、菊地 和也^{2,3}、堀 雄一郎¹ (1. 九大院理、2. 阪大院工、3. 阪大免フロ)

◆ 英語

14:10 ~ 14:30

[H935-2pm-04]

Synthesis of *Alcaligenes faecalis* Lipid A Conjugates with Tumor-Associated Carbohydrate Tn Antigen Towards the Development of Self-Adjuvanting Vaccine○Davie Kenneth¹、Yusuke Yamanaka¹、Atsushi Shimoyama^{1,2}、Koichi Fukase^{1,2} (1. Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, 2. Forefront Research Centre (FRC), Graduate School of Science, Osaka University)

14:30 ~ 14:40

休憩

◆ 英語

14:40 ~ 15:00

[H935-2pm-05]

分子内アザ電子環状反応を利用したがん細胞現地での天然物誘導体合成研究

○寺島 一輝¹、ブラディプタ 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)

◆ 英語

15:00 ~ 15:20

[H935-2pm-06]

化学反応により生きた動物の体内を移動する糖鎖クラスター分子の開発

○山田 健士郎¹、向峯 あかり²、中村 亜希子²、草薙 百合子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・田中生体機能合成化学研究室)

◆ 日本語

15:20 ~ 15:40

[H935-2pm-07]

抗がん活性ジテルペン配糖体はリン酸化依存的な天然変性蛋白質間相互作用を安定化する

○荻野 菜々美¹、室井 誠²、長田 裕之²、松本 健²、吉田 稔²、喜井 勲¹、大神田 淳子¹ (1. 信州大学学術研究院 (農学系)、2. 理化学研究所 環境資源科学研究センター)

天然変性領域のケミカルリデザインによる植物ホルモン関連転写因子の選択的阻害剤の開発

(東北大院理¹・東北大院生命科学²) ○高岡 洋輔¹・劉 瑞琦¹・李 奇¹・上田 実^{1,2}
 Development of selective inhibitors for plant hormone-related transcription factors based on chemical redesigned intrinsically disordered region peptide (¹Graduate School of Science, Tohoku University, ²Graduate School of Life Sciences, Tohoku University) ○Yousuke Takaoka¹, Ruiqi Liu,¹ Qi Li,¹ Minoru Ueda,^{1,2}

Plant hormones regulate various responses such as plant growth, differentiation or defense by simultaneously controlling multiple transcription factors. Recent reports suggested that intrinsically disordered regions (IDR), which can interact with multiple interacting partners while changing their conformation, play important roles in these signaling pathways. We herein developed selective inhibitors for plant hormone, Jasmonate (JA)-related transcription factors based on the chemically redesigned IDR peptides.

Keywords : Plant hormone; Protein-protein interaction; Intrinsically disordered region; Transcription factor

植物防御や生長・老化などを制御するジャスモン酸 (JA) は、植物体内で転写リプレッサー JAZ の分解を引き起こすことで、複数の転写因子の活性化を一挙に引き起こす。JA の下流では、虫害耐性を制御する MYC ファミリーや、病原菌耐性を制御する EIN3/EIL1 など複数の転写因子が機能しており、これらは遺伝学的に冗長的に機能したり、それぞれがクロストーク制御しあっているために、解析・制御が困難である。最近我々は、JA 応答の脱感作に関わるスプライスバリエント JAZ10.4 の MYC との結合ドメイン (CMID)^{1,2)} が天然変性領域 (IDR) であること、および MYC・EIN3 とともに同程度の強度で結合すること

を示唆する結果を得た (Fig 1)。そこで、CMID の MYC3 との結合フォーム³⁾に化学的に構造を固定した人工ペプチドを設計したところ、MYC 活性を選択的に阻害することを見出した。開発したペプチドは、MYC 下流の応答を抑制する一方で、EIN3 下流の応答を亢進し、両者のクロストークを切り分けることに成功した。MYC ファミリーは多くの陸上植物で高度に保存されており、本ペプチド型ツールは植物種を超えて JA シグナル伝達解析に有用な化学ツールとなることが期待される。

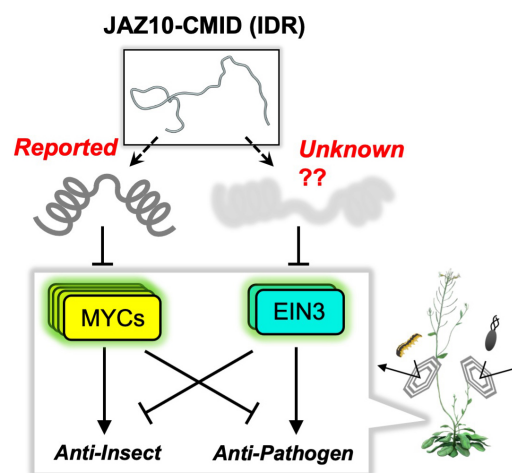


Fig 1. 天然変性領域の JAZ10-CMID が、複数の転写因子を阻害する様子。

1) Moreno, J.E. *et al. Plant Physiol.* **162**, 1006-1017 (2013). 2) Takaoka, Y. *et al. J. Biol. Chem.* **298**, 1015404 (2022). 3) Zhang, F. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 1720-1725 (2017).

Development of Photoswitchable Fluorescent Molecules for No-Wash Live Cell Imaging

(¹Graduate School of Engineering, Osaka University, ²The University of Edinburgh, ³Faculty of Science, Kyushu University, ⁴Immunology Frontier Research Center, Osaka University) ○Kenji Torii,¹ Sam Benson,² Marc Vendrell,² Yuichiro Hori,³ Kazuya Kikuchi^{1,4}

Keywords: photoswitchable fluorescent molecules, fulgimide, protein labeling, FRET, fluorogenicity

Photoswitchable fluorescent molecules (PSFMs) are valuable tools for tracking cellular dynamics and super-resolution imaging due to their photoswitching ability upon light irradiation. In recent years, photoswitchable cyanine¹ and diarylethene² have been applied to super-resolution imaging. However, these molecules require high concentrations of cytotoxic thiol for photoswitching or have poor cell membrane permeability, which hampers live cell applications. Despite the high demand for PSFMs that are suitable for live-cell imaging, no general method has been reported that enables reversible fluorescence control on proteins of interest in living cells.

Herein, we have established a platform to realize reversible fluorescence switching in living cells by adapting a protein labeling system. We have developed a new PSFM, named HTL-Trp-BODIPY-FF, which exhibits strong fluorogenicity upon recognition of Halo-tag protein and reversible fluorescence photoswitching in living cells (Figure 1). The fluorogenicity helps to minimize the fluorescence from unlabeled HTL-Trp-BODIPY-FF and allows no-wash labeling. As for the fluorescence photoswitching, we have used FF (furylfulgimide) as a photochromic FRET quencher^{3,4}. The labeled HTL-Trp-BODIPY-FF exhibited reversible fluorescence switching upon light irradiation with higher photostability compared to the unlabeled one, assisted by the Halo-tag surface that prevents intermolecular aggregation. This is the first example of a PSFM that can be applicable to a general-purpose Halo-tag protein labeling system for no-wash live-cell imaging⁴. In this conference, we will report on the detailed molecular designs, photophysical properties, and biological experiments of HTL-Trp-BODIPY-FF.

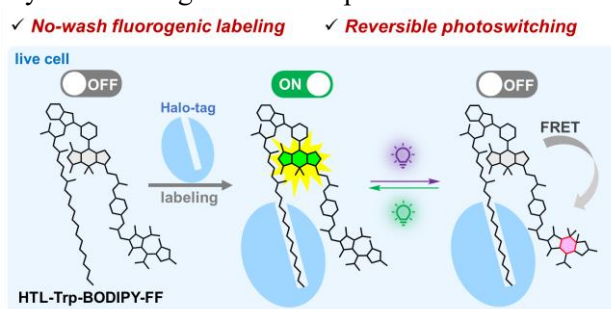


Figure 1. Schematic of this study

1) J. Kwon, *et al. Sci. Rep.* **2015**, 5, 17804

2) (a) B. Roubinet, *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 15429. 3. (b) K. Uno, *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 16471.

3) K. Torii, *et al. Anal. Chem.* **2023**, 95, 8834.

4) K. Torii, *et al. Chem. Sci.* **2024** (in press) DOI: 10.1039/d3sc04953a

Development of Hydrophobic Bioisostere Conjugated Fluorescent Probes for Live-Cell Imaging

(¹Graduate School of Science, Kyushu University, ²Graduate School of Engineering, Osaka University, ³Immunology Frontier Research Center, Osaka University)○Takuya Kamikawa¹, Akari Hashimoto², Nozomi Yamazaki², Junya Adachi¹, Kazuya Kikuchi^{2,3}, Yuichiro Hori¹

Keywords: Bioisostere, Fluorescent probe, Live-cell imaging, PYP-tag, Halo tag

Protein-labeling probes with membrane permeability are important tools for the visualization of intracellular protein of interests (POIs). Cationic dye derivatives that show favorable optical properties (*e.g.* high brightness and photostability) and water solubility are useful scaffolds for the protein-labeling probes. Indeed, cationic probes using the derivatives can be used as mitochondrial-targeting probes owing to their mitochondrial accumulation. However, the mitochondrial accumulation caused serious artifacts in the visualization of non-mitochondrial proteins. To suppress the artifacts, anionic groups such as carboxylate and sulfonate groups are introduced into the probes; this strategy mostly leads to the decrease of their membrane permeability. As a solution to this problem, anionic groups with relatively high hydrophobicity are expected to maintain the membrane permeability of the probes, suppressing nonspecific organelle accumulation. Based on this discussion, we focused on hydrophobic bioisosteres of carboxylic acid as the introducing group to develop membrane-permeable probes.

In this presentation, we will report a design strategy for bioisostere-conjugated probes that enable intracellular protein imaging using protein tag labeling system. We successfully developed several bioisostere-conjugated probes that show membrane permeability and suppress non-specific accumulation in the mitochondria. In addition, our design strategy can be applied to two different protein labeling systems, HaloTag and PYP-tag systems. We further demonstrate that these probes can be used for the visualization of intracellular multiple localizations of POIs in living cells.

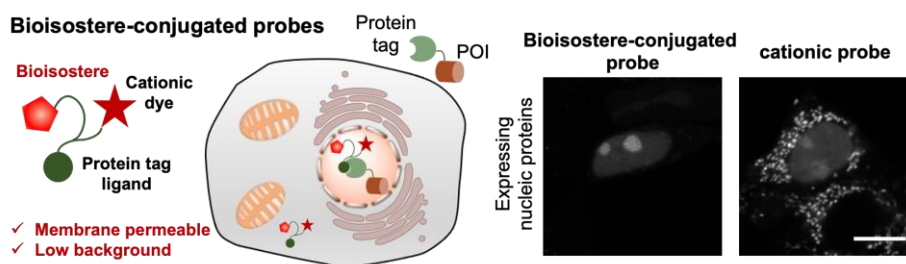


Figure (Left) Schematic illustration of the probe design strategy using a hydrophobic bioisostere for intracellular protein imaging using protein tag labeling system. (Right) Fluorescence images of HEK293T cells expressing nucleic proteins stained with bioisostere-conjugated probe and cationic probe. Scale bar 10 μ m.

Synthesis of *Alcaligenes faecalis* Lipid A Conjugates with Tumor-Associated Carbohydrate Tn Antigen Towards the Development of Self-Adjuvanting Vaccine

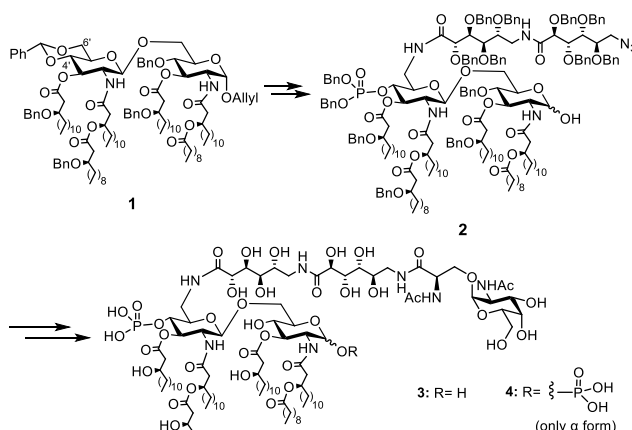
(¹Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University; ²Forefront Research Center (FRC), Graduate School of Science, Osaka University) ○Davie Kenneth¹, Yusuke Yamanaka¹, Atsushi Shimoyama^{1,2}, Koichi Fukase^{1,2}

Keywords: lipid A, adjuvant, self-adjuvanting vaccine, sugar chain mimic linker, *Alcaligenes faecalis*

Lipopolysaccharide (LPS) and its active center, lipid A, of Gram-negative bacterial outer membrane are representative innate immunostimulants which have potential to function as vaccine adjuvants. However, canonical *E. coli* LPS and lipid A induce lethal toxicity due to excessive inflammatory effects hence not safe for adjuvant utilization. We have revealed that symbiotic *Alcaligenes faecalis* LPS and synthetic *A. faecalis* lipid A (AfLA)¹ induce effective antigen-specific IgA production without toxicity² hence promising adjuvant candidates.

Meanwhile, self-adjuvanting vaccine strategy, in which antigen and adjuvant are covalently linked has recently been well studied especially in the development of carbohydrate-based vaccines^{3,4}. The strategy enhances active and simultaneous uptake of antigen with the conjugated innate immune ligand (adjuvant) by same immune cell thereby promoting efficient antigen-specific immune responses.

On the other hand, there are only few reports of lipid A-based self-adjuvanting vaccines^{4,5} because structural modifications often inactivate lipid A. Thus a simple and universal conjugation method that can retain significant lipid A activity is required. Here we conjugated *A. faecalis* lipid As with tumor-associated carbohydrate Tn antigen by employing a strategy which mimics natural LPS structure; linking 6'-position of lipid A to the antigen via hydrophilic sugar-chain mimic linker based on D-mannitol. The synthetic process involved azidation of 6'-position of **1** followed by 4'-phosphorylation and then condensation of the linker and allyl group cleavage to yield **2**. Thereafter, the condensation of Tn-antigen to **2** was followed by global deprotection to obtain conjugate **3**. Meanwhile, condensation of the Tn antigen to **2** was followed by anomeric phosphorylation and subsequently, global deprotection was performed to synthesize conjugate **4**. Both conjugates **3** and **4** showed significant IL-6 cytokine induction at the same level as the unmodified lipid As.



1) A. Shimoyama, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 10023. 2) K. Yoshii, *et al.*, *Microorganisms*, **2020**, 8, 1102. 3) K. Fukase, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, 57, 8219. 4) Z. Guo, *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 235. 5) J. Cod'ee, *et al.*, *J. Med. Chem.* **2020**, 63, 11691.

分子内アザ電子環状反応を利用したがん細胞現地での天然物誘導体合成研究

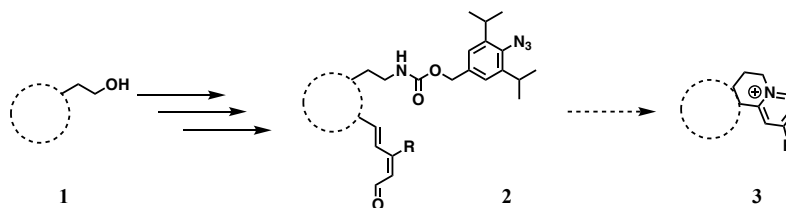
(東工大物質理工¹・理研 開拓研究本部 田中生体研²) ○寺島 一輝¹・プラディプタ アンバラ¹・田中 克典^{1,2}

Synthetic study of natural product derivative in cancer cells via intramolecular aza electrocyclization (¹*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology*, ²*Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN*,) ○Kazuki Terashima,¹ Ambara R. Pradipta,¹ Katsunori Tanaka^{1,2}

We have previously reported that cancer cells overexpress acrolein. Based on this finding, we have developed a prodrug that takes advantage of the reaction between phenyl azide and acrolein in cancer cells to deprotect the amino group on the drug molecule.¹ Our aim in the present study is to synthesize a natural product derivative **3** with a zwitterionic bicyclic backbone from an inactive precursor compound **2**. This will be achieved by deprotecting the amino group to induce a rapid intramolecular 6π -azaelectrocyclization directly in cancer cells. We expect the final products to have anticancer activity. We will be presenting further details about our findings at the symposium.

Keywords: Acrolein, Cycloaddition, Phenyl azide, In vivo synthesis, On-site synthesis

これまでに我々は、がん細胞においてアクロレインが特異的に大量発現していることを発見し、さらにフェニルアジド分子がアクロレイン分子と生体内においても選択的に反応できることを利用し、薬分子上のアミノ基を脱保護するプロドラッグの開発に成功した¹⁾。そこで今回我々は、このがん細胞上でのアミノ基の脱保護を起点として分子内 6π -アザ電子環状を含む一連の分子内反応を起こすことで、不活性な前駆体化合物 **2** から一挙にがん現地で抗がん活性を持つ天然物 **3** を合成し、治療を行う計画を考えた。ここでは、市販で購入可能な化合物 **1** から前駆体化合物 **2** の合成、及び化合物 **2** から **3** への変換、化合物 **3** の細胞毒性に関して検討をおこなったのでこれらの成果について報告する。



1. A. R. Pradipta, P. Ahmadi, K. Terashima, K. Muguruma, M. Fujii, T. Ichino, S. Maeda, K. Tanaka, *Chem. Sci.* **2021**, 12, 5438-5449.

化学反応により生きた動物の体内を移動する糖鎖クラスター分子の開発

(東工大物質理工¹・理研 開拓研究本部 田中生体研²) ○山田 健士郎¹・向峯 あかり²・中村 亜希子²・草刈 百合子²・プラディプタ アンバラ¹・張 宗哲¹・田中 克典^{1,2}
Development of glyco-cluster molecule translocating in living mice triggered by in vivo chemical reaction. (¹*School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology*, ²*Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research, RIKEN*) ○Kenshiro Yamada,¹ Akari Mukaimine,² Akiko Nakamura,² Yuriko Kusakari,² Ambara R. Pradipta,¹ Tsung-che Chang,¹ Katsunori Tanaka^{1,2}

N-type glycans are the biomolecules that have important role for interaction between cells and proteins. Previously we have found glycoalbumin molecules modified with *N*-glycans on albumin recognize various types of cancer cells depending on their glycan modification patterns (glycan pattern recognition). Here, we developed an innovative glycoalbumin capable of undergoing transformation and remodeling of its glycan pattern in vivo, which induced its translocation from the initial target to a second one. In this presentation, we will describe an investigation of pattern recognition remodeling by in vivo chemical reaction in living mice.

Keywords: Glycan pattern recognition; *N*-type glycan; In vivo synthesis

*N*型糖鎖は生体内での細胞・タンパク質間での相互作用において重要な役割を果たす生体分子である。これまでに我々は、アルブミンに *N*型糖鎖約 10 分子を修飾した糖鎖アルブミン分子が、がん細胞周辺に集積すること、さらに糖鎖の修飾パターンに応じて種々のがん細胞へ異なる強度の認識(パターン認識)が発現することを見出し、糖鎖アルブミン分子を用いたがん治療研究へと発展させてきた¹。糖鎖パターン認識をさらに活用する方法として、生体内化学反応により糖鎖パターン認識を更新し、新たな標的へと向かって体内を移動する糖鎖アルブミン分子の開発を試みた。本発表では、生きたマウス体内での化学反応スイッチによるパターン認識更新の検討について述べる。

- 1) 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.

抗がん活性ジテルペン配糖体はリン酸化依存的な天然変性蛋白質間相互作用を安定化する

(信州大農¹・理研 CSRS²) ○荻野 菜々美¹・室井 誠²・長田 裕之²・松本 健²・吉田 稔²・喜井 勲¹・大神田 淳子¹

Antitumor diterpene glucoside stabilizes phosphorylation-dependent protein-protein interactions of intrinsically disordered proteins (¹*Institution of Agriculture, Shinshu University*, ²*RIKEN Center for Sustainable Resource Science, RIKEN*) ○Nanami Ogino¹, Makoto Muroi², Hiroyuki Osada², Ken Matsumoto², Minoru Yoshida², Isao Kii¹, Junko ohkanda¹

Fusicoccin (FC) is a diterpene glucoside that stabilizes protein-protein interactions (PPIs) between 14-3-3 and phosphoproteins. While FC is inactive in cancer cells, 12-deoxy FC exhibits significant antiproliferative activity. Here, we report the details of the mechanism of action of 12-deoxy FC, which turns out to be shown to upregulate PPI between 14-3-3 and GIGYF2, a highly intrinsically disordered scaffold of a mRNA translation repression complex. 12-Deoxy FC was also found to enhance binding of GIGYF2 to a mRNA binding protein TTP, suggesting that the PPI between 14-3-3 and GIGYF2 is necessary for the formation of the repressive complex. Furthermore, the coimmunoprecipitation experiments using deletion mutants of GIGYF2 identified that pS546 as the binding site of 12-deoxy FC and 14-3-3, which locates near the TTP-binding site. These results clearly indicate that 12-deoxy FC upregulates PPI of GIGYF2 and 14-3-3, suppresses protein synthesis, and inhibits proliferation. Since TTP-dependent translational repression has been shown to be implicated in stress granules, the results shown here suggest that 14-3-3 may play general roles in the regulation of cellular stress responses. **Keywords :** *Transient protein-protein interactions; Fusicoccin; 14-3-3 Proteins; Intrinsically disordered proteins; posttranslational modification*

Fusicoccin (FC)は、14-3-3 と Ser/Thr リン酸化蛋白質との相互作用(PPI)を安定化するジテルペン配糖体である。天然型 FC は不活性である一方、12-deoxy FC 誘導体は低酸素環境で強い細胞増殖阻害と制癌活性を有する。本研究では、14-3-3 インタラクトーム解析により 12-deoxy FC の作用機序の詳細を明らかにしたので報告する。

14-3-3 結合蛋白質の定量的プロテオミクス解析の結果、12-deoxy FC 存在下で結合が増強する蛋白質として、mRNA 翻訳抑制複合体の足場で全長の 76%が構造を持たない天然変性蛋白質(IDR)の GIGYF2 を同定した。12-Deoxy FC は mRNA 結合蛋白質 TTP と GIGYF2 との相互作用も亢進することが判り、14-3-3 と GIGYF2 の PPI が翻訳抑制複合体を安定化させることが示唆された。これを裏付けるように、12-deoxy FC 処理により細胞の新生蛋白質量が減少し、この効果は GIGYF2 をノックダウンすると解除された。さらに GIGYF2 の欠損変異体および点変異体を用いた共免疫沈降及びリン酸化ペプチドを用いた蛍光偏光滴定試験を行った結果、TTP 結合部位近傍の S546 が作用点であることが示された。興味深いことに TTP の GIGYF2 作用部位近傍にも 14-3-3 結合配列が存在するため、2 量体である 14-3-3 が GIGYF2 と TTP の PPI を直接誘導している可能性が考えられる。以上のように、GIGYF2 と 14-3-3 の PPI の詳細を初めて解明し、12-deoxy FC によるリン酸化依存的な IDR の PPI 安定化と蛋白質合成抑制による増殖阻害作用機序を明らかにした。TTP が関わる翻訳抑制機構はストレス由来の液液相分離と関連することが示唆されており、ストレス応答における 14-3-3 の生物学的役割を示唆するものとして興味深い。