

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

📅 Sat. Mar 29, 2025 9:00 AM - 11:20 AM JST | Sat. Mar 29, 2025 12:00 AM - 2:20 AM UTC 🏛️
[A]A304(A304, Bldg. 1, Area 3 [3F])

[[A]A304-4am] 17. Biofunctional Chemistry, Biotechnology

Chair: Kiichiro Totani, Koji Miki

🇯🇵 Japanese

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

[[A]A304-4am-01]

Synthetic studies of non-natural complex-type glycans containing bisecting GlcNAc to elucidate the importance of Fold Back conformation

○Ikumu Miura¹, Jurana Kumagai¹, Mitsuaki Hirose¹, Kiichiro Totani¹ (1. Seikei University)

🇯🇵 Japanese

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

[[A]A304-4am-02]

Aglycon specificity analysis of enzymes involved in glycoprotein sorting using hydrophobicity as an indicator.

○Yuma Kono¹, Mitsuaki Hirose¹, Kiichiro Totani¹ (1. Seikei University)

🇯🇵 Japanese

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

[[A]A304-4am-03]

Synthesis of Mannosamine Derivatives through Halocyclization/Ring-Opening Domino Reaction

○Yuki Takahashi¹, Riho Taguchi¹, Naoko Komura², Akihiro Imamura^{1,2}, Hideharu Ishida^{1,2}, Hiromune Ando², Hidenori Tanaka² (1. Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 2. Institute for Glyco-core Research, Gifu University)

🇯🇵 Japanese

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

[[A]A304-4am-04]

Design and evaluation of functional alkyl glycosides(II): Synthesis and evaluation of each derivative

○Kanon Suzuki¹, Takahiko Matsushita^{1,2,3}, Tetsuo Koyama¹, Ken Hatano^{1,2,3}, Kouji Matsuoka^{1,2,3} (1. Grad. Sci.&Engin, 2. Health Sci., Strategic Res. Ctr, 3. Adv. Inst. Innov. Tech)

🇯🇵 Japanese

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

[[A]A304-4am-05]

Immobilization of green fluorescent protein N-terminus modified with alkyl groups onto the surface of liposomes and its evaluation

○Lisa Tara Connolly¹, Akira Onoda^{1,2} (1. Graduate School of Environmental Science Hokkaido University, 2. Faculty of Environmental Earth Science Hokkaido University)

🇯🇵 Japanese

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

[[A]A304-4am-06]

Developmental study of ER-endo-mannosidase inhibitor

○Syuntaro Sumino¹, Yumiko Yamamoto¹, Mitsuaki Hirose¹, Kiichiro Totani¹ (1. Seikei University)

◆ Japanese

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

[[A]A304-4am-07]

Improvement of antioxidant capacity by complexation and liposome of antioxidants.

○Magohei Yamada¹, Takashi Matsuhira¹, Keizo Yamamoto¹, Fumio Asanoma², Tsumoru Morimoto², Tsuyoshi Kawai², Hiromi Sakai¹ (1. Nara Medical University, 2. Nara Institute of Science and Technology)

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

Break

◆ Japanese

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

[[A]A304-4am-08]

Tetraphenylethene Derivatives for Intracellular Delivery of Charged Molecules under Visible Light Irradiation

○Taito Itoguchi¹, Huo Wenting¹, Yusuke Kataoka¹, Kohei Takayama¹, Yuichiro Mori¹, Koji Miki¹, Mu Huiying¹, Kouichi Ohe¹ (1. Kyoto University)

◆ Japanese

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

[[A]A304-4am-09]

Preservation of spheroids in liquid state

○Mai Imamura¹, Takeru Ishizaki¹, Yuya Matsuda¹, Kosuke Kuroda¹ (1. The Univ. of Kanazawa)

◆ Japanese

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

[[A]A304-4am-10]

Force mechanical detection of chloride ion efflux channel CLIC1 on the surface of living cells

○Kazuki Imai^{1,2}, Ayana Yamagishi³, Masumi Iijima^{1,2}, Chikashi Nakamura^{1,2} (1. Fac. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., 2. Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST, 3. Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric)

◆ Japanese

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

[[A]A304-4am-11]

Application of nickel-naphthalocyanine precursor to PAI/PTT theranostics agent

○Yusuke Kataoka¹, Kohei Nogita¹, Huiying Mu¹, koji Miki¹, Kouichi Ohe¹ (1. Graduate School of Engineering, Kyoto University)

◆ Japanese

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

[[A]A304-4am-12]

Investigation of the Telomere Shortening Inhibitory Activity of αG-Rutin

○Takumi Terada¹, Vinodh Sahayasheela¹, Ryohei Noizumi¹, Akihito Nakanishi², Tandia Mahamadou², Hiroshi Sugiyama³ (1. Kyoto Univ., 2. Toyo Sugar Refining Co., Ltd., 3. Kyoto Univ. iCeMS)

◆ Japanese

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

[[A]A304-4am-13]

QCM and electrochemical measurements of microbial degradation of PHBH

○Momoko Kitamura¹, Takuma Otsuki¹, Yasumasa Takenaka², Tomohiro Hiraishi², Hideki Abe², Noriyuki Asakura^{1,2} (1. Science Tokyo, 2. RIKEN CSRS)

Fold Back 配座の重要性解明に向けた Bisecting GlcNAc 含有非天然複合型糖鎖の合成研究

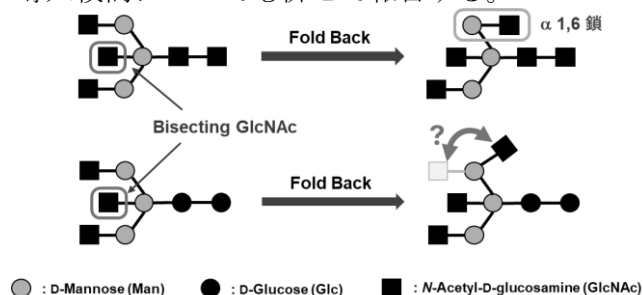
(成蹊大理工¹) ○三浦 生夢¹・熊谷 珠羅奈¹・廣瀬 光了¹・戸谷 希一郎¹

Synthetic Studies of Non-natural Complex-type Glycans Containing Bisecting GlcNAc to Elucidate the Importance of Fold Back Conformation (*Seikei University*¹) ○Ikumu Miura,¹ Jurana Kumagai¹, Mitsuaki Hirose¹, Kiichiro Totani¹

Some complex-type glycans possess Bisecting GlcNAc bound to core mannose with β -1,4 bond. The glycan was formed a Fold Back conformation by bending the α -1,6 chain at core mannose with interaction to acetamide group of core GlcNAc residue, followed by stabilizing the conformation through inhibiting high motility of the branch structures^[1]. However, the importance of the conformation of glycans in biological events is not fully understood. In this study, we target the synthesis of non-natural glycans with glucose core instead of GlcNAc core as a control compound due to elucidating the importance of the Fold Back conformation. We have so far succeeded in synthesizing the protected Man β 1-4Glc β 1-4Glc-type core trisaccharide via the construction of β -mannoside using D. Chrch's method. In this presentation, we will also report the examination of introduction of branch glycan or Bisecting GlcNAc to the core trisaccharide.

Keywords : *Bisecting GlcNAc; Fold Back Conformation; Complex-type Sugar Chain; Acetamide Group; β -Mannoside*

ある種の複合型糖鎖には、コアマンノースに β -1,4 結合した Bisecting GlcNAc を含有するものが存在する。この Bisecting GlcNAc 含有複合型糖鎖は、コアマンノースの α -1,6 鎖が折れ曲がりコア GlcNAc 残基のアセトアミド基と相互作用する Fold Back 配座を取ることで、分岐鎖の高い運動性を抑制し、立体配座を安定化している（下図）^[1]。しかしながら、この立体配座の生命現象における重要性は十分に理解されていない。そこで本研究では、Fold Back 配座の重要性を解明するための対称化合物として、天然糖鎖のコア GlcNAc を Glucose に変換した非天然糖鎖の合成を目的とした。これまでに D. Chrch の手法^[2]を用いた β -マンノシドの構築を経由し、Man β 1-4Glc β 1-4Glc 型コア三糖保護体の合成に成功した。本発表ではコア三糖に対する、ブランチ糖鎖や Bisecting GlcNAc の導入検討についても併せて報告する。



[1] Kizuka, Y.; Taniguchi, N. *Biomolecules*, **2016**, 6, 25

[2] Crich, D. *Acc. Chem. Res.*, **2010**, 43, 1144–53.

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アグリコン特異性解析

(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

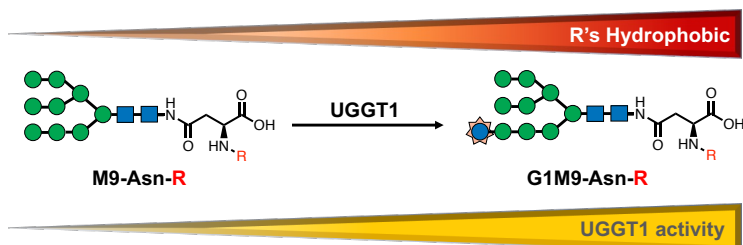
In the ER glycoprotein quality control, the pathway selection for Man₉GlcNAc₂-glycoprotein among secretion, degradation and refolding is regulated by UGGT1 and EDEMs.

Particularly, UGGT1 has been interpreted that the degree of surface hydrophobicity of the protein moiety is involved in its substrate recognition [1]. However, no clear indicator of hydrophobicity has been established for the degree of recognition. In this work, we have synthesized glycoprotein mimics with different hydrophobicity of aglycon moieties, and analyzed their reactions with UGGT1 *in vitro* to quantitatively evaluate the correlation between the degree of hydrophobicity of the protein surface and the UGGT1 activity.

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. In this presentation, substrate specificity due to structural differences in the aglycon moieties will also be reported.

Keywords : ER glycoprotein quality control; UGGT1; Glycoprotein mimics; Aglycone 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 は、その基質認識についてタンパク質部位の表面疎水性度が関与すると解釈されている[1]。しかし、その認識度合いを明確にした疎水性度の指標は定まっていない。そこで本研究では糖タンパク質のアグリコン部位に、疎水性度の異なる化合物を導入することで、様々なフォールディング状態を模した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生体外での UGGT1 との反応解析から、タンパク質表面の疎水性度と UGGT1 による糖転移活性の相関関係について定量的に評価する。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。また本発表ではアグリゴン部分の構造上の差異による基質特異性についても報告する。



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

ハロ環化/開環ドミノ反応を用いたマンノサミン誘導体の合成

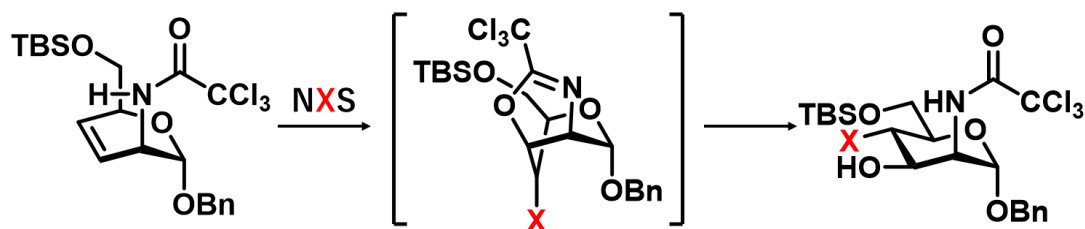
(岐阜大応生¹・岐阜大 iGCORE²) ○高橋 裕貴¹・田口 莉帆¹・河村 奈緒子²・今村 彰宏^{1,2}・石田 秀治^{1,2}・安藤 弘宗²・田中 秀則²

Synthesis of Mannosamine Derivatives through Halocyclization/Ring-Opening Domino Reaction (¹*Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University*, ²*Institute for Glyco-core Research, Gifu University*) Yuki Takahashi,¹ Riho Taguchi,¹ Naoko Komura,² Akihiro Imamura,^{1,2} Hideharu Ishida,^{1,2} Hiromune Ando,² Hidenori Tanaka²

The use of unnatural mannosamines bearing functional group(s), which can be converted into corresponding neuraminic acids by aldolase, enables not only chemoenzymatic synthesis of chemically modified sialoglycans but also metabolic glycan engineering on the cell surface. Previous methods for synthesis of mannosamine derivatives have several synthetic problems such as use of expensive *N*-acetylmannosamine as starting material, explosive sodium azide, lengthy steps, and so on. Herein we report synthesis of mannosamine derivatives through halocyclization/ring-opening domino reaction using an allylic trichloroacetamide pyranoside substrate. We found that an iodocyclized oxazoline generated by treatment with NIS was highly reactive and allowed for in-situ conversion to the corresponding 4-iodinated mannosamine derivative via ring-opening hydrolysis of the oxazoline. The domino reactions using NBS and NCS are currently under investigation. We will present detailed results at this annual meeting.

Keywords : mannosamine; halocyclization; ring-opening; domino reaction; oxazoline

官能基を有する非天然型のマンノサミン誘導体はアルドラーゼで対応するシアル酸に変換できるため、これら誘導体の利用で化学修飾シアロ糖鎖の化学酵素合成だけでなく、細胞膜上の糖鎖の代謝変換が可能となる。マンノサミン誘導体の既知合成法では、高価な *N*-アセチルマンノサミンを出発原料とする、爆発性のあるアジ化ナトリウムを使用する、工程数が長いなど、合成上の課題が存在する。本研究では、アリルトリクロロアセトアミド部位を有するピラノシド基質を用いたハロ環化/開環ドミノ反応を用いたマンノサミン誘導体の合成について報告する。我々は NIS によるヨード環化で生じたオキサゾリンが高い反応性を示し、反応系中で加水分解によるオキサゾリン開環が進行し、良好な収率で 4 位ヨウ素化マンノサミン誘導体を与えることを見出した。現在、NBS と NCS を用いたドミノ反応を検討中である。本年会で詳細を発表する。



機能性アルキルグリコシドの設計と評価(Ⅱ)：各誘導体の合成と評価

(埼玉大院理工¹、埼玉大戦略研究²、埼玉大理工院埼玉大先端ラボ³) ○鈴木 花音¹、松下 隆彦^{1,2,3}、小山 哲夫¹、幡野 健^{1,2,3}、松岡 浩司^{1,2,3}

Design and evaluation of functional alkyl glycosides(Ⅱ): Synthesis and evaluation of each derivative(¹ Grad. Sci.&Engin. Saitama University, ²Health Sci.,Strategic Res. Ctr. Saitama University, ³ Adv. Inst. Innov. Tech. Saitama University) ○Kanon Suzuki¹,

Takahiko Matsushita^{1,2,3}, Tetsuo Koyama¹, Ken Hatano^{1,2,3}, Koji Matsuoka^{1,2,3}

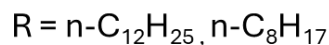
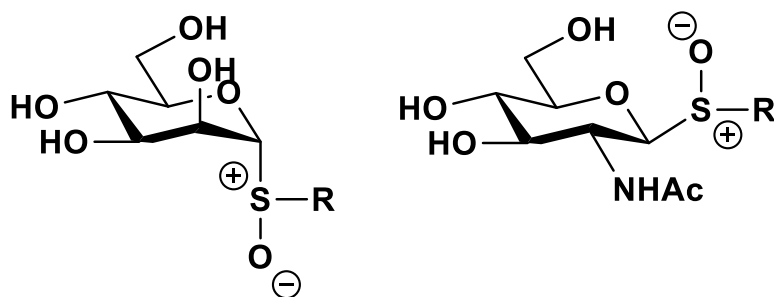
Alkyl thioglycosides are sugar derivatives that play an important role in a wide range of fields such as glycotecchnology, drug development, and biological research due to their stability and ease of synthesis. In this study, we focused on sulfoxide, the oxidized form of alkyl thioglycosides, and used mannose and n-. as model compounds to reveal their novel physicochemical properties and biological activities. acetylglucosamine were selected and their respective thioglycosides were efficiently sulfoxidized using Serectfluor.

keywords : micelles, hemagglutinin, multivalency

アルキルチオグリコシドは、その安定性や合成の容易さから、糖鎖工学、医薬品開発、生物学的研究など幅広い分野で重要な役割を果たす糖誘導体である。近年、チオグリコシド化されたシアル酸がインフルエンザウイルスを阻害する効果が報告されており、抗ウイルス剤の開発における可能性が示唆されている。

本研究では、アルキルチオグリコシドの酸化型であるスルホキシドに着目し、その新たな物理化学的性質や生物活性を明らかにすることを目的とした。モデル化合物としてマンノースと N-アセチルグルコサミンを選択し、それぞれのチオグリコシドを

Serectfluor を用いて効率的にスルホキシド化した。得られたスルホキシドの CMC を評価した。



アルキル基を N 末端修飾した緑色蛍光タンパク質のリポソーム表面への固定化とその評価

(北大院環境¹・北大院地球環境²) ○コノリー 里沙¹・小野田 晃²

Immobilization of green fluorescent protein N-terminus modified with alkyl groups onto the surface of liposomes and its evaluation (¹*Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University*, ²*Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University*) ○Lisa Connolly,¹ Akira Onoda,²

Liposomes has been widely studied as carriers for drug delivery system (DDS). The modification of the liposomes surface with proteins is expected to improve targeting ability toward tissues. Our group developed 1*H*-1,2,3-triazolecarbaldehyde (TA4C) which allows modification of the N-terminus of protein in one step¹. To display proteins on the surface of liposome, we introduced an alkyl chain at the N-terminus using TA4C and embed the modified proteins onto the liposome. TA4C derivatives containing an alkyl chain were synthesized by dimroth rearrangement. The N-terminus of green fluorescent protein (GFP) was specifically modified using the TA4C derivatives via the formation of an imidazolidinone ring. In this presentation, GFP with an alkyl tether was immobilized on the surface of liposomes and the immobilization was evaluated by fluorescence microscopy.

Keywords : Drug Delivery System; Liposome; Surface Modification; Site-specific Modification;

薬物を安全かつ効率よく標的組織に送達する DDS の担体としてリポソームが利用されている。またリポソーム表面へ糖やタンパク質を修飾することにより、標的組織へより選択的な送達が期待される。当研究室ではこれまでにタンパク質の N 末端に対して位置特異的に 1 工程で化学修飾が可能な 1*H*-1,2,3-トリアゾールカルボアルデヒド (TA4C) 誘導体を開発した¹。本研究では、標的細胞のリガンドとなるタンパク質の N 末端にアルキル鎖を TA4C により修飾し、このアルキル部位を介してリポソーム表面へタンパク質を提示することにより、効率的にリポソームを目的部位に送達できると考えた。まず、ディムロス転移反応により、炭素数の異なるアルキル鎖をもつ TA4C 誘導体 (C_n-TA4C) を合成した。次に TA4C によるイミダゾリジノン環形成を経て、タンパク質の N 末端を特異的に修飾した。本発表では、TA4C を利用した GFP の N 末端へのアルキル鎖の修飾とリポソーム表面への固定化について蛍光顕微鏡によって評価した (Figure 1)。

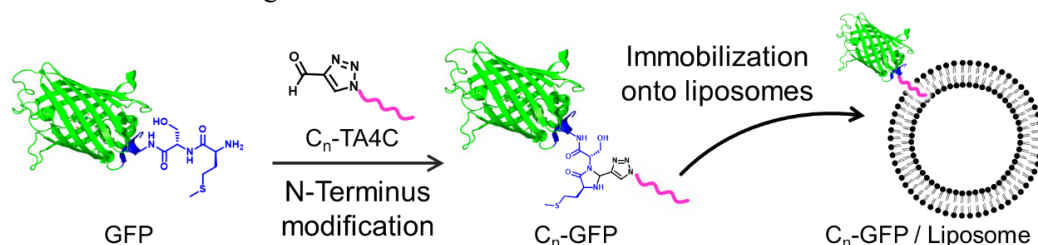


Figure 1. Embedding GFP with N-terminal modification using TA4C onto the surface of liposomes

1) A. Onoda, N. Inoue, E. Sumiyoshi, T. Hayashi, *ChemBioChem*, **2020**, 21, 1274.

小胞体エンドマンノシダーゼ阻害剤の開発研究

(成蹊大理工) ○角野 駿太郎・山本 侑未子・廣瀬 光了・戸谷 希一郎

Developmental Study of ER-endo-mannosidase Inhibitor (*Department of Science and Technology, Seikei University*) Syuntaro Sumino, ○Yumiko Yamamoto, Mitsuaki Hirose, Kiichiro Totani

Glycoprotein oligosaccharides play pivotal roles for regulating glycoprotein quality control in the endoplasmic reticulum (ER), which contributes to construct higher-ordered structures of glycoproteins and degradation of misfolded glycoproteins. We have discovered novel misfolded glycoprotein degradation pathway mediated by ER endomannosidase in the glycoprotein quality control. We have revealed that this enzyme recognizes Glc₁Man₉GlcNAc₂-type misfolded glycoprotein as a substrate through multisite (glycan and hydrophobic patch) recognition property.

In this study, we developed an ER endomannosidase inhibitor based on multisite recognition property for glycan and hydrophobic patches. Moreover, we will also carried out development of an irreversible inhibitor having diazirine group as a protein crosslinker.

Keywords : Glycoproteins; Protein crosslinking; Endo-mannosidase; Endoplasmic reticulum glycoprotein quality control

糖タンパク質上の糖鎖は、小胞体内で糖タンパク質の高次構造形成やミスフォールド糖タンパク質の分解に寄与する糖タンパク質品質管理の制御に、重要な役割を果たしている。当研究室では、糖タンパク質品質管理における新たなミスフォールド糖タンパク質分解経路として、小胞体エンドマンノシダーゼが関与する経路を発見している。我々は本酵素が、Glc1Man9GlcNAc₂-型ミスフォールド糖タンパク質を基質とし、糖鎖とその近傍の疎水性パッチを多点認識することを明らかにしてきた。

本研究では、本酵素が有する糖鎖および疎水性を多点認識する性質を利用し、Figure1 に示す糖鎖部分構造と疎水性パッチを適切な長さのエチレングリコールで連結した小胞体エンドマンノシダーゼ阻害剤を開発した。また、糖鎖末端にタンパク質架橋剤である diazirine を導入した不可逆的阻害剤も併せて開発に取り組んだ。

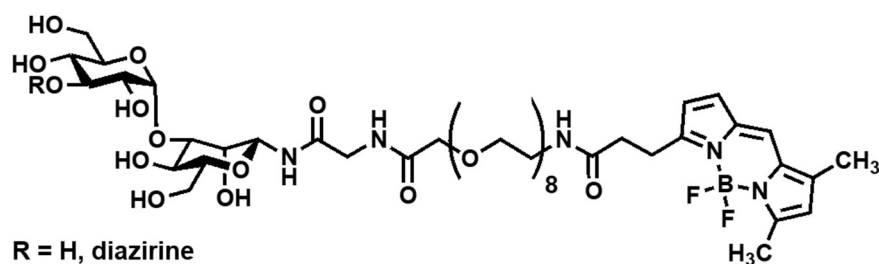


Figure 1. Target compound

Improvement of antioxidant capacity by complexation and liposomal formulation.

(¹Department of Chemistry, Nara Medical University, ²Division of Material Science, Nara Institute of Science and Technology)

○Magohei Yamada,¹ Takashi Matsuhira,¹ Keizo Yamamoto,¹ Fumio Asanoma,² Tsumoru Morimoto,² Tsuyoshi Kawai,² Hiromi Sakai¹

Keywords: *antioxidant capacity, astaxanthin, chlorophyll a, calcium ascorbate, liposome*

[Introduction] Recently, there has been a growing demand for the intake of antioxidants to eliminate reactive oxygen species that harm health.¹ Astaxanthin (Ast) and chlorophyll *a* (Chl), which have high antioxidant capacity, have been commercialized for use as foods with function claims in Japan. However, there have been no reports on the combined use of Ast and Chl. In this study, we found the synergistic effects between Ast and Chl for ¹O₂ quenching. The antioxidant capacities of Ast and Chl were reinforced by adding excess calcium ascorbate (CaA) and also improved by encapsulation in liposome.

[Method] The singlet oxygen quenching rate constant ($k_Q(S)$) was measured for Ast, Chl, and their mixture according to the Aizawa's report.² Liposomes of Ast, Chl, and their mixture were prepared using lecithin by a simple emulsion evaporation method. The radical scavenging activities of prepared liposomes were measured by the DPPH method.

[Results and Discussion] The $k_Q(S)$ value of Chl was $1.72 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, whereas it increased to $3.17 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ by coexisting with Ast. The synergistic effect was the strongest at a molar ratio of Chl:Ast=2:1. The shifts of signals and change in longitudinal relaxation time (T_1) in ¹H NMR analysis after adding Chl to Ast indicated the proximity and interaction of these two antioxidants. Further addition of 150 equimolar CaA protects more than 95% of Chl and 98% of Ast from thermal decomposition at 60 °C for 1 h. The optimal molar ratio of Ast, Chl, and CaA is 1:2:150; the strongest synergistic effect of Ast and Chl is achieved, while CaA reinforces the ¹O₂ quenching capacity of the former two by providing a reductive environment and long-term stability. Furthermore, we confirmed a higher radical scavenging activity of the antioxidants (Chl/Ast=2 ratio) by liposomal formulation.

[Acknowledgments] This research was supported by JSPS KAKENHI Grant Number 22K12824 and by the ARIM Program of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT), Japan.

1) Lourenço, S.C., et al., *Molecules* 2019, 24, 4132.

2) Aizawa, K., et al., *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 3717-3729.

可視光照射による帯電分子の細胞内送達を目指したテトラフェニルエテン類縁体の探索

(京大院工) ○糸口太翔・Wenting Huo・片岡優介・高山公平・森優一郎・三木康嗣・Huiying Mu・大江浩一

Tetraphenylethene Derivatives for Intracellular Delivery of Charged Molecules under Visible Light Irradiation (*Graduate School of Engineering, Kyoto University*) ○Taito Itoguchi, Huo Wenting, Yusuke Kataoka, Kohei Takayama, Yuichiro Mori, Koji Miki, Mu Huiying, Kouichi Ohe

Negatively charged drugs are extremely difficult to deliver into cells due to electrostatic repulsion with the negatively charged cell membrane. Efficient intracellular delivery of negatively charged molecules would lead to medical and pharmaceutical advancements. We developed a series of light-triggered twistable tetraphenylethene (TPE) derivatives which possess hydrophilic amino groups and hydrophobic alkyl chains to facilitate the intracellular delivery of charged molecules through continuous disturbance of cell membrane.¹ In order to reduce photodamage of cells, we synthesized donor-acceptor-type TPE derivatives with the aim of disturbing cell membrane under visible light irradiation. The synthesized TPE derivatives exhibit an absorption peak at 450 nm in visible region (Figure 1). We are going to present the efficiency of their drug delivery.

Keywords: *tetraphenylethene; cell membrane; drug delivery system*

負に帯電した薬剤は、負に帯電した細胞膜との静電反発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効率よく細胞内に送達できれば、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、光照射を用いる細胞内への薬剤送達を狙い、テトラフェニルエテン (TPE) に親水性アミノ基と疎水性長鎖アルキル基を結合した TPE 誘導体を開発した¹。この TPE 誘導体が紫外光照射下で細胞膜を連続的に攪乱することで帯電分子を細胞内へ送達できることを確認した。本研究では細胞への悪影響を軽減するため、可視光照射によって細胞膜を攪乱することを目指し、ドナー-アクセプター型の TPE 誘導体を合成した。合成した TPE 誘導体の吸収波長は可視光領域の 450 nm であった (Figure 1)。これらを用いた薬剤送達の効率について発表する予定である。

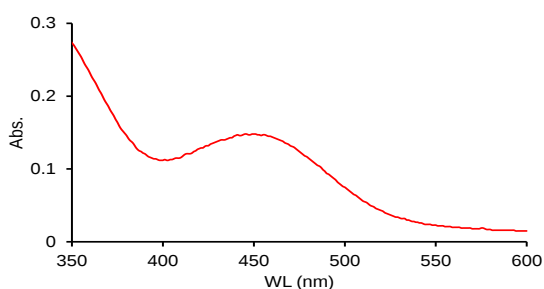


Figure 1. UV-vis absorption of D-A type TPE derivative.

[1] W. Huo, K. Miki, H. Mu, T. Osawa, H. Yamaguma, Y. Kasahara, S. Obika, Y. Kawaguchi, H. Hirose, S. Futaki, Y. Miyazaki, W. Shinoda, S. Akai, K. Ohe, *J. Mater. Chem. B* **2024**, *12*, 4138–4147.

スフェロイドの液中低温保存

(金沢大理工) ○今村 真依・石崎 建・松田 佑也・黒田 浩介

Preservation of spheroids in liquid state (Faculty of Biological Science and Technology, Institute of Science and Engineering, Kanazawa University) ○Mai Imamura, Takeru Ishizaki, Yuya Matsuda, Kosuke Kuroda

The long-term storage of spheroids at a low temperature is notably challenging. This study aims to preserve spheroids in liquid state at a low temperature. By combining conditioned, which can act as a strong anti-freezing agent. Mixtures of 10 wt% OE₂imC₃C and 50 wt% CPAs [dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl formamide (DMF)] remain liquid state at −85 °C. Moreover, DMSO and DMF have low cytotoxicity, and therefore these two CPAs may be valuable as storage media for spheroids.

Keywords : cryopreservation; cryoprotectant; spheroid; zwitterion; ionic liquid

再生医療やがん治療などに利用が期待されるスフェロイドの長期保存が必要とされている。スフェロイドの長期保存には低温保存が不可欠であるが、低温下では

氷晶が形成され、細胞を破壊してしまう。氷晶形成を阻害するために凍結保存剤 (CPA) を添加し、急速に冷却するガラス化が存在するが、冷却・加温速度が十分に速くないと氷晶が形成される。本研究では、−85 °C のディープフリーザーに入れた際に安定して液体状態を保つ溶液での長期保存を目的とした。

−85 °C で液体状態を保つ溶液を探索するために、10–80 wt% CPA 水溶液を−85 °C で1週間静置した。その結果、少なくとも 60 wt% の CPA を添加しないと液体状態を保つことができなかった。そこで溶液の凝固点を下げることが知られている OE₂imC₃C (Fig. 1) ¹⁾ を添加した。ジメチルホルムアミド (DMF) とジメチルアセトアミドは OE₂imC₃C を添加することで CPA の濃度を 50 wt% まで下げても凍結しなくなった。

スフェロイドに対する CPA の毒性を調査した。30 wt% の CPA 添加時にはどの CPA も毒性が低く、スフェロイドを構成する細胞の生存率は 80% 以上であった。一方で、50 wt% 添加時に生存率はすべて低下したが、ジメチルスルホキシド (DMSO) と DMF は比較的高かった。今後は、DMSO と DMF のそれぞれに OE₂imC₃C を加えた混合液を用いてスフェロイドの保存を試みる。

1) T. Takekiyo *et al.*, *J. phys. Chem.*, 2024, **128** (2), 526-535

Table. 1 Minimum unfrozen concentration of CPA at −85 °C

	Minimum unfrozen concentration of CPA at −85 °C				
	DMSO	DMF	DMAc	EG	PG
−10 wt% OE ₂ imC ₃ C	60%	70%	>80%	70%	60%
+10 wt% OE ₂ imC ₃ C	50%	50%	50%	60%	60%

(CPA)

DMSO: Dimethyl sulfoxide
DMF: Dimethyl formamide
DMAc: Dimethyl acetamide

EG: Ethylene glycol
PG: Propylene glycol

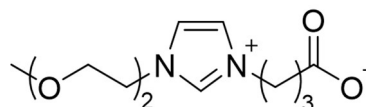


Fig.1 Molecular structure of OE₂imC₃C

生細胞表面における塩化物イオン排出チャネル CLIC1 の力学検出

今井 翔月^{1,2}、山岸 彩奈³、飯嶋 益巳^{1,2}、中村 史^{1,2}

Force mechanical detection of chloride ion efflux channel CLIC1 on the surface of living cells (1. Fac. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol., 2. Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST, 3. Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric) ○Kazuki Imai^{1,2}, Ayana Yamagishi³, Masumi Iijima^{1,2}, Chikashi Nakamura^{1,2}

CLIC1 is overexpressed in cancer cells and contributes to invasion, and so it has increased recognition in recent years as a drug discovery target. We are developing anti-CLIC1 monoclonal antibodies to detect cancer cells and inhibit invasion and have obtained a clone that specifically recognizes membrane-bound CLIC1. However, membrane-bound CLIC1 is unstable and challenging to detect on the surface of living cells. Therefore, the possibility of detection was verified by mechanistic detection using an antibody-modified AFM probe on living cells. A silicon AFM probe was used and the antibody was modified via bionanocapsule, ZZ-BNC. The cells used were the mouse breast cancer cell line SC2 established at AIST. The antibody-modified probe was brought into close contact with living SC2 cells, stopped when the repulsion force increased to 10 nN, held for 1 s, and then pulled up at a loading rate of 1.54 $\mu\text{N/s}$. Force curve analysis was performed. The results showed a specific peak on the force curve that was not observed for the anti-GFP antibody when using the anti-CLIC1 antibody-modified probe, and was judged to be the unbinding force.

Keywords : cancer cell, chloride ion channel 1 (CLIC1), monoclonal antibody, cell membrane, AFM

CLIC1 はがん細胞で過剰発現し、浸潤に寄与するため、創薬標的として近年注目を集める。我々はがん細胞の検出と浸潤抑制を目的として抗 CLIC1 モノクローナル抗体を開発しており、膜結合型 CLIC1 を特異的に認識するクローンを取得しているが、膜結合型 CLIC1 は不安定で生細胞で検出することが困難であった。そこで、生細胞に対して抗体修飾 AFM 探針を用いた力学検出により、検出の可否を検証した。

シリコン製の AFM 探針を使用し、ZZ-BNC を介して抗体を修飾した。細胞は産総研で樹立したマウス乳がん細胞株 SC2 を使用した。生きた SC2 細胞に対し抗体修飾探針を接近させ 10 nN に斥力が上昇した時点で停止し、1 秒保持した後に負荷速度 1.54 $\mu\text{N/s}$ にて引き上げを行い、フォースカーブ解析を行った。その結果、抗 CLIC1 抗体修飾探針を用いた場合、抗 GFP 抗体では観察されない特異的なピークがフォースカーブ上に確認され、これを抗体結合破断力と判断した (Fig. 1)。10 細胞を用いて検出を行った結果、抗体結合破断力の検出頻度はおよそ 50% であった。発表では、結合特性の異なる抗体クローンと比較した結果を併せて報告する。

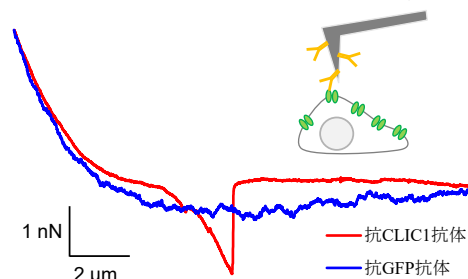


Fig. 1 細胞表面 CLIC1 検出のフォースカーブ

ニッケルナフタロシアニン前駆体を応用したPAI/PTTセラノステイクス剤

(京大院工) ○片岡優介・野北康平・Huiying Mu・三木康嗣・大江浩一

Application of nickel-naphthalocyanine precursor to PAI/PTT theranostics agent

(Graduate School of Engineering, Kyoto University) ○Yusuke Kataoka, Kohei Nogita, Huiying Mu, Koji Miki, Kouichi Ohe

Nickel-naphthalocyanine (NiNc) efficiently absorbs near-infrared light and converts the light energy into heat. Thus, NiNc has potential as theranostic agents that can simultaneously achieve photoacoustic imaging (PAI), and photothermal therapy (PTT). We developed NiNc precursors (**oxNiNcPEG**) which are transformed to NiNc through reduction mediated by glutathione (GSH) (Figure 1a). When **oxNiNcPEG** was incubated with GSH-overexpressing cancer cell line A549, the photoacoustic signal intensity was enhanced due to its transformation under near-infrared pulse laser irradiation (Figure 1b). Under continuous near-infrared laser irradiation, cell viability was decreased due to the temperature rise caused by the photothermal conversion of NiNc (Figure 1c).

Keywords: *Naphthalocyanine, Photoacoustic, Photothermal therapy, Theranostics, Glutathione*

ニッケルナフタロシアニン (NiNc) は、近赤外光を効率よく吸収して熱に変換することができる。この特徴から、光を用いた診断法である光音響イメージング (PAI) と光を用いた治療法である光熱療法 (PTT) を同時に実現するセラノステイクス剤としての応用が期待されている。

生体内還元物質であるグルタチオン (GSH) により、NiNcへと変換される酸化型 NiNc (**oxNiNcPEG**) を合成した (Figure 1a)。GSHが過剰発現する肺がん細胞株A549に**oxNiNcPEG**を作用させると、NiNcへ変換されるため近赤外パルスレーザー光照射下において光音響信号強度が増大した (Figure 1b)。また、近赤外連続光の照射下において、NiNcが発する熱により癌細胞が殺傷された (Figure 1c)。

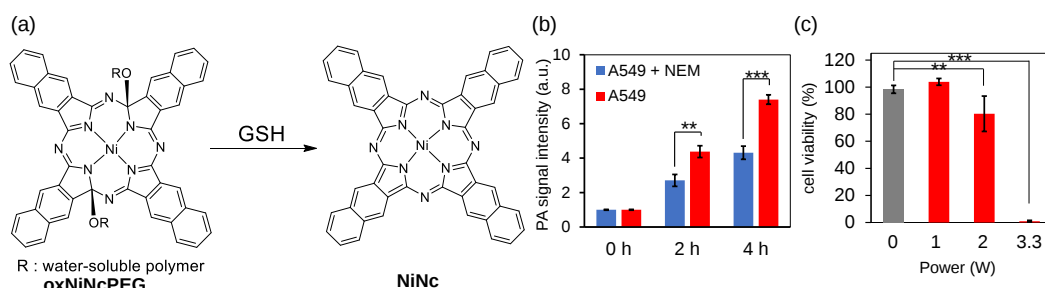


Figure 1. (a) GSH-mediated reduction of **oxNiNc** to give NiNc. (b) PA signal intensity changes during the incubation of A549 with **oxNiNcPEG** (25 μ M) after incubation with or without *N*-ethylmaleimide (NEM). Two-tailed Student's *t*-test: ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$. (c) Cell viability of A549 incubated with **oxNiNcPEG** (20 μ M) after 5 minutes of NIR laser irradiation.

α G-ルチンのテロメア短縮抑制能評価

(京大院理¹・東洋精糖株式会社²・京大 iCeMS³) ○寺田 拓海¹・Vinodh J. Sahayasheela¹・野泉 燎平¹・中西 章仁²・Mahamadou Tandia²・杉山 弘³

Evaluation of telomere shortening suppression by α G-Rutin

(¹Graduate School of Science, Kyoto University, ²Toyo Sugar Refining Co., Ltd., ³iCeMS, Kyoto University) ○Takumi Tereda,¹ Vinodh J. Sahayasheela,¹ Ryohei Noizumi,² Akihito Nakanishi,² Mahamadou Tandia,³ Hiroshi Sugiyama

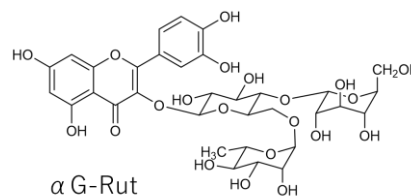
Telomere, which is DNA-protein complex located at the ends of chromosomes, plays a crucial role in maintaining chromosomal stability by protecting genetic information from the end-replication problem during cell division. However, it has been reported that telomere is also shortened by oxidative damage induced by intracellular reactive oxygen species¹, leading to chromosomal instability and cell senescence. In view of this, recent studies have focused on using antioxidants to protect cells from oxidative damage and rutin has emerged as a hopeful candidate². Nevertheless, many antioxidants, including rutin, have poor water solubility, which presents a significant challenge for their bioavailability.

In this study, we investigated whether α G-rutin, a glucosylated form of rutin enzymatically modified to enhance water solubility and bioavailability³, could suppress telomere shortening. The results demonstrated that α G-rutin exhibited potent antioxidant activity within cells and suppressed telomere shortening when cells were cultured in the presence of α G-rutin.

Keywords : Antioxidants; Telomere

染色体末端に存在する DNA-タンパク複合体であるテロメアは、細胞分裂時に生じる末端複製問題による DNA 塩基の欠失から遺伝情報を保護し、染色体の安定性維持において極めて重要な役割を果たすことが知られている。一方で、テロメアは細胞分裂の進行だけでなく、細胞内活性酸素種による DNA 酸化損傷によっても短縮し、染色体の不安定性や老化形質の発現を引き起こすことが報告されている。このような背景から、近年では抗酸化物質を用いて酸化損傷から細胞を保護する試みが注目されている。その中でもルチンは有望な候補として挙げられるが、ルチンを含む多くの抗酸化物質は水溶性が低いという性質があり、生体内利用における大きな課題となっている。

本研究では、ルチンに酵素的に糖を付加して水溶性を向上させ、生体内利用性を高めた α G-ルチンを用い、細胞内外での抗酸化作用及びテロメア短縮抑制効果を検証した。



- (1) von Zglinicki, T. Oxidative Stress Shortens Telomeres. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 339–344.
- (2) Gullón, B.; Lú-Chau, T. A.; Moreira, M. T.; Lema, J. M.; Eibes, G. Rutin: A Review on Extraction, Identification and Purification Methods, Biological Activities and Approaches to Enhance Its Bioavailability. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, 67, 220–235.
- (3) Suzuki, Y.; Suzuki, K. Enzymatic Formation of 4G- α -d-Glucopyranosyl-Rutin. *Agric. Biol. Chem.* **1991**, 55, 181–187.

QCM 法と電気化学測定による *Pseudoalteromonas* の生分解性ポリマー分解初期過程の解析

(東京科学大生命理工¹・理研 CSRS²) ○北村萌々子¹・大槻 拓馬¹・竹中 康将²・平石 知裕²阿部 英喜¹・朝倉 則行^{1,2}

QCM and electrochemical measurements of microbial degradation of PHBH (¹*Graduate School of Life Science and Technology, Science Tokyo*, ²*RIKEN CSRS*) ○Momoko Kitamura¹, Takuma Otsuki¹, Yasumasa Takenaka², Tomohiro Hiraishi², Hideki Abe², Noriyuki Asakura^{1,2}

In development of biodegradable polymers, clarification of the degradation process, that is absorption of bacteria, secretion of enzymes, polymer degradation, and biofilm formation by growing, is of importance. In this study, the number of adsorbed bacteria and the amount of degradation were measured by QCM (quartz crystal microbalance) and electrochemistry. poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH), that is one of the famous biodegradable polymer, was used. Two bacterial strains of the genus *Pseudoalteromonas* were each isolated from biofilm formed on PHBH in marine. PHBH was cast on gold surface of quartz crystal as a film, and the crystal was immersed in mineral medium. After bacterial suspension adding to the mineral medium, QCM measurement, CV and electrochemical impedance spectroscopy were carried out to investigate film surface.

Keywords : biodegradable polymer; Quartz Crystal Microbalance; electrochemical impedance spectroscopy

生分解性ポリマーの分解性と耐久性を明らかにするために、微生物による分解機構を詳細に調べることが重要である。そこで本研究では、生分解性ポリマーPHBHの微生物による分解初期過程をQCM(水晶振動子マイクロバランス法)と電気化学を組み合わせで解析した。分解菌には、海水中でPHBH上に形成されたバイオフィームから採取し単離した *Pseudoalteromonas* sp.SCSIO 43088 を利用した。水晶振動子金表面にPHBHを製膜し、無機培地中に静置した。QCM測定により、分解菌添加後のPHBH膜上の重量変化を調べた。Fig.1に示すように、菌体添加後に振動数が減少し、15時間以降では振動数が増加した。このことから、分解菌が吸着し電極表面の重量が増加した後にPHBHが分解され重量が減少したことがわかった。さらに、膜の分解について調べるために、CVとインピーダンス測定を行った。5時間後の測定結果ではPHBHの膜厚に変化はなく、菌体が吸着しているだけで分解は進行していないことがわかった。PHBH分解菌 *Pseudoalteromonas* sp.Strain Bu15_19についても同様に測定を行い、菌体種による分解特性の違いを調べた。

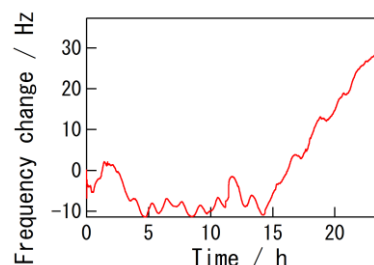


Fig.1 QCM measurement after injection of bacteria.