

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

📅 2025年3月26日(水) 9:00 ~ 11:40 📍 [A]A301(第3学舎 1号館 [3階] A301)

[[A]A301-1am] 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー

座長：栢森 史浩、古畑 隆史

◆ 日本語

9:00 ~ 9:10

[[A]A301-1am-01]

分割インテインと分岐ペプチドを用いた触媒的タンパク質スプライシングの開発

○高橋 剛¹ (1. 群馬大学)

◆ 日本語

9:10 ~ 9:20

[[A]A301-1am-02]

分割インテインを用いたペプチド-タンパク質間相互作用検出法への環状ペプチドの利用

○宇部 早波¹、信澤 佳奈¹、高橋 剛¹ (1. 群馬大学)

◆ 日本語

9:20 ~ 9:30

[[A]A301-1am-03]

ハイマンノース型糖鎖をもつペプチドの合成と糖鎖脱離酵素の活性評価

○井上 遥¹、相京 碧¹、高橋 諭¹、石井 希実¹、松尾 一郎¹、吉田 雪子²、鈴木 匡³、高橋 剛¹ (1. 群馬大学、2. 東京都医学総合研究所、3. 理化学研究所)

◆ 日本語

9:30 ~ 9:40

[[A]A301-1am-04]

ペプチド固定化ビーズと色素を用いた迅速な皮膚感作性評価法の開発

○臼井 健二¹、西山 舞¹、有海 秀人²、濱田 芳男¹、栢森 史浩¹ (1. 甲南大、2. 山口東京理科大)

◆ 日本語

9:40 ~ 9:50

[[A]A301-1am-05]

ペプチド固定化ビーズを用いた種々のβ-バレル型ナノポアの作製と分析

○栢森 史浩¹、仮屋 拓斗¹、小林 もえ¹、彭 祖癸²、川村 出³、川野 竜司²、臼井 健二¹ (1. 甲南大学、2. 東京農工大学、3. 横浜国立大学)

◆ 日本語

9:50 ~ 10:00

[[A]A301-1am-06]

ペプチドを用いた金ナノ粒子固定化ビーズのワンポット合成とその触媒活性の評価

○吉田 光輝¹、吉田 秀平¹、鶴岡 孝章¹、臼井 健二¹ (1. 甲南大)

◆ 日本語

10:00 ~ 10:10

[[A]A301-1am-07]

金イオンと銀イオンを用いた金還元ペプチドによる異方性金ナノ構造体の作製

○吉田 秀平¹、下向 芳樹¹、吉田 光輝¹、尾崎 誠¹、臼井 健二¹ (1. 甲南大)

◆ 日本語

10:10 ~ 10:20

[[A]A301-1am-08]

ミネラルゼーションペプチドを用いたリポソーム内での金ナノ粒子合成技術の開発

○阿部 裕哉¹、田中 祐圭¹ (1. 東京科学大学)

10:20 ~ 10:30

休憩

◆ 英語

10:30 ~ 10:40

[[A]A301-1am-09]

PYP-tagを用いた細胞イメージング用赤色蛍光化学遺伝学Ca²⁺センサーの開発○柳町 拓海¹、寺井 琢也¹、Robert Campbell¹ (1. 東大院理)

◆ 日本語

10:40 ~ 10:50

[[A]A301-1am-10]

生体内応用を志向したタンパク質の細胞内導入用ケーシング技術の開発

○守山 千晴¹、山本 涼太郎¹、芝原 優希³、中瀬 生彦³、岡本 晃充¹、山口 哲志² (1. 東大院、2. 阪大院、3. 阪公大院)

◆ 日本語

10:50 ~ 11:00

[[A]A301-1am-11]

ペプチド核酸PNAの2本鎖形成を利用したペプチドの膜透過性発現

○窪田 英雄¹、愛場 雄一郎¹、有安 真也¹、荘司 長三¹ (1. 名大)

◆ 日本語

11:00 ~ 11:10

[[A]A301-1am-12]

生細胞内におけるタンパク質の反応性や安定性の制御を指向した、化学触媒を用いた非天然アシル基の導入手法の開発

○大熊 遼¹、鈴木 海翔¹、山梨 祐輝¹、金井 求¹ (1. 東京大学)

◆ 日本語

11:10 ~ 11:20

[[A]A301-1am-13]

酵素反応を介した側鎖の電荷変換により活性化する膜破壊ペプチドの開発

○藤田 慧¹、王子豪¹、濱邊 美佳子¹、古畑 隆史¹ (1. 東京大学)

◆ 日本語

11:20 ~ 11:30

[[A]A301-1am-14]

分岐構造により制御される機能の解明に向けた不均一ポリユビキチン鎖ライブラリの構築

○崔 汎圭¹、古畑 隆史¹、富田 拓哉²、佐藤 裕介^{3,4}、尾勝 圭⁵、深井 周也⁵、佐伯 泰²、岡本 晃充¹ (1. 東大院工、2. 東大医科研、3. 鳥大院工、4. 鳥大GSCセンター、5. 京大院理)

◆ 日本語

11:30 ~ 11:40

[[A]A301-1am-15]

DNA-encoded library技術を用いた環状ペプチドの膜透過性評価系の構築

○揚原 聖智¹、森本 淳平¹、山東 信介¹ (1. 東大院工)

分割インテインと分岐ペプチドを用いた触媒的タンパク質スプライシングの開発

(群馬大院理工) ○高橋 剛

Development of catalytic protein splicing using split intein and branched peptide (*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Tsuyoshi Takahashi

Inteins are self-excising protein segments that ligate their flanking sequences (N-extein and C-extein) in protein splicing. Inteins are widely used as a protein engineering tool in biotechnology and chemical biology. Split inteins can perform protein trans-splicing (PTS) resulting in ligation of the two distinct polypeptides. Inteins are single turnover enzymes that splice out during the splicing reaction. Therefore, intein molecules could not participate repeatedly in the reaction. In protein splicing, the N-extein unit is transferred to a cysteine, serine, or threonine at +1 position via the thioester or ester bond resulting in formation of a branched intermediate. In the present study, I have attempted to construct a catalytic protein splicing using a branched peptide, and to develop a detection method for ligand-protein interactions using the catalytic protein splicing.

Keywords : *Intein; Protein trans-splicing; Branched intermediate; Ligand-protein interaction*

インテインは、自身に連結しているポリペプチド鎖(エクステイン)を継ぎ合わせ、自分自身を切り出す活性(タンパク質スプライシング)をもつ酵素様のタンパク質である。タンパク質スプライシングでは、N エクステインがインテインの1 残基目の Cys または Ser の側鎖と(チオ)エステルを形成した後、C エクステイン1 残基目(+1)の Cys、Ser または Thr の側鎖にエステル転移し、分岐構造をもつ中間体が生成する。その後、インテインが切り出されることで、エクステインが天然のペプチド結合で繋がる。分割インテインは、2つのインテイン断片(N インテイン、C インテイン)間の自発的会合により、2つの異なるポリペプチド鎖を連結させる活性(タンパク質トランススプライシング; PTS)を示す。当研究室はこれまでに、分割インテインの改良や、分割位置の変更により、自発的な会合を抑制した分割インテインを設計し、分割インテインに合成化合物と標的タンパク質をそれぞれ連結させることで、化合物-タンパク質間の相互作用に依存して PTS 反応が進行する系の構築を行ってきた¹⁾。しかし、インテインによるスプライシング反応は、シングルターンオーバーであり、一般的な酵素反応のように、何度も繰り返して反応に関与することはできない。

本研究では、タンパク質スプライシング反応の中間体として生成する分岐ペプチドを用いることで、インテインが繰り返し反応に関与する触媒的タンパク質スプライシングの開発を目的とした。また、この系を用いて、合成化合物とタンパク質間の相互作用を蛍光検出する方法の構築を試みた。

1) H. Hagiwara, E. Fujii, T. Iwabuchi, T. Takahashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2024**, 97, uoac019.

分割インテインを用いたペプチド-タンパク質間相互作用検出法への環状ペプチドの利用

(群馬大理工¹・群馬大院理工²) ○宇部 早波¹・信澤 佳奈²・高橋 剛²

Application of cyclic peptides for detection method for peptide-protein interactions using split intein (¹Department of Science and Technology, Gunma University, ²Graduate School of Science and Technology, Gunma University) ○Sanami Ube¹, Kana Nobusawa², Tsuyoshi Takahashi²

To find the peptides capable of binding to the target proteins, several screening methods using peptide library have been developed, such as phage display and mRNA display. In particular, cyclic peptides have excellent properties as therapeutic agents due to their high stability and cell permeability, and the cyclic peptides can be selected using these methods. On the other hand, we have constructed a selection method for peptides that bind to a target protein using an engineered split intein in *Escherichia coli*. Using this method, we successfully selected the peptides that bind to murine double minute (MDM2). However, only 20 canonical amino acids are used in the peptide library in the split intein-based method. In the present study, we have attempted to employ non-canonical amino acids capable of reacting with cysteine sulfhydryl group to construct the cyclic peptide library.

Keywords : Cyclic peptide; Intein; Protein splicing

がんなどの疾患に関連するタンパク質に特異的に作用するバイオ医薬品の開発が盛んに行われている。ペプチド骨格をもつ中分子医薬品は、抗体などと比べ合成が容易であることから、近年注目されている。標的分子に特異的に結合するペプチドを創製するために、ペプチドライブラリから標的タンパク質と結合する分子を探索する方法が多数報告されてきた。特に、環状構造をもつ環状ペプチドは、直鎖状ペプチドと比較して生体内安定性が高く、標的タンパク質との結合親和性や特異性に優れたペプチドを得やすいなどの利点がある。

一方、当研究室ではこれまでに、タンパク質トランススプライシング (PTS) 活性を持つ分割インテインを用いて、ペプチド-タンパク質間相互作用に依存して PTS 反応が進行する系の開発を行ってきたり。これにより、ペプチドライブラリから PTS 反応の生成物として、カナマイシンを無毒化する aminoglycoside phosphotransferase を用いることで、大腸菌の生育を指標として、ペプチド-タンパク質間の相互作用の有無を判別できる。これを利用して、20 種類の標準アミノ酸からなるペプチドライブラリから、標的タンパク質に結合するペプチド探索法の開発に成功した。

本研究では、分割インテインを用いた標的タンパク質結合ペプチド探索法に適用可能なペプチド環化反応について検討した。Cys 側鎖のスルフヒドリル基と反応する *p*-(2-chloroacetamido)-phenylalanine (caaPhe) や *p*-(2-bromoethoxy)-phenylalanine (beoPhe) を導入したタンパク質を大腸菌内で効率よく発現するためのアミノアシル tRNA 合成酵素変異体の構築や発現条件について検討した。

1) H. Hagiwara, E. Fujii, T. Iwabuchi, T. Takahashi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2024**, 97, uoae019.

ハイマンノース型糖鎖をもつペプチドの合成と糖鎖脱離酵素の活性評価

(群馬大院理工¹・東京都医総研²・理研³) ○井上 遥¹・相京 碧¹・高橋 諭¹・石井 希実¹・松尾 一郎¹・吉田 雪子²・鈴木 匡³・高橋 剛¹

Synthesis of glycopeptides with high-mannose oligosaccharide and evaluation of their reactivities toward deglycosylating enzymes (¹Graduate School of Science and Technology, Gunma University, ²Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, ³RIKEN) ○Haruka Inoue¹, Midori Aikyo¹, Satoshi Takahashi¹, Nozomi Ishii¹, Ichiro Matsuo¹, Yukiko Yoshida², Tadashi Suzuki³, Tsuyoshi Takahashi¹

Glycosylation of proteins is one of the most frequent types of protein post-translational modifications in eukaryotic cells. Misfolded glycoproteins in endoplasmic reticulum (ER) are retrotranslocated from the ER to the cytosol and degraded through the ER-associated degradation (ERAD). There are deglycosylation enzymes such as peptide:*N*-glycanase (PNGase) and endo- β -*N*-acetylglucosaminidase (ENGase) in cytosol. Both enzymes can remove the glycans from the glycoproteins bearing *N*-glycans. However, it is unclear which enzymes act predominantly on the glycoprotein substrates and whether the amino acid sequences and glycan structures affect the enzyme activities. In the present study, we have designed and synthesized a variety of 7-residue glycopeptides bearing Man₃GlcNAc₂ and Man₈GlcNAc₂, and we have examined their reactivities toward PNGase and ENGase.

Keywords : peptide:*N*-glycanase ; endo- β -*N*-acetylglucosaminidase ; glycopeptide

真核細胞において最も頻繁に使用されるタンパク質の翻訳後修飾の一つに、タンパク質のグリコシル化がある。小胞体内でミスフォールドした糖タンパク質は、小胞体から細胞質へと逆輸送され、プロテアソームで分解される。この小胞体関連分解 (ERAD) 過程で、Asn 側鎖に糖鎖が結合した *N* 結合型糖鎖をもつ糖タンパク質は、細胞質ペプチド:*N*-グリカナナーゼ (PNGase) やエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) などによって糖鎖が除去される。PNGase が作用すると、糖鎖が結合した Asn は、Asp へと変換される。一方、ENGase が作用した場合、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 1 つが結合した Asn 残基が残る。GlcNAc が残った糖タンパク質は、プロテアソームで分解されにくいと考えられることから、糖鎖近傍のアミノ酸配列や糖鎖構造の違いによる、糖タンパク質と脱糖鎖酵素の反応性について理解することが重要である。本研究では、ENGase が認識する最少の糖鎖構造であるトリマンノシルコア 5 糖 (Man₃GlcNAc₂) や、天然型の Man₈B 型 (Man₈GlcNAc₂, isoform B) 構造をもつ、アミノ酸配列の異なる糖ペプチドを設計・合成し、PNGase および ENGase に対する反応性について検討した。

ペプチドは、*N*-結合型糖タンパク質である Nrf1 配列に基づいて設計した。Nrf1 中の 9 カ所の糖鎖結合部位をもとに、7 残基からなる 9 種類のペプチドを設計した。糖ペプチドは、Fmoc 固相法および糖転移反応を用いて合成した。合成したペプチドを用いて、PNGase および ENGase との反応性について、逆相 HPLC を用いて評価した。

ペプチド固定化ビーズと色素を用いた迅速な皮膚感作性評価法の開発

(甲南大 FIRST¹・山口東京理大薬²) 西山 舞¹・○栢森 史浩¹・有海 秀人²・濱田 芳男¹・臼井 健二¹

Development of Rapid Skin Sensitization Assessment Using Peptide-Immobilized Beads and Chromophores (¹*Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan university*, ²*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sanyo-Onoda City University*)
Mai Nishiyama,¹ ○Fumihiko Kayamori,¹ Hideto Ariumi,² Yoshio Hamada,¹ Kenji Usui¹

The direct peptide reactivity assay (DPRA) is an effective method using peptides in vitro skin sensitization test. However, HPLC in the DPRA protocol is time-consuming and the handling is difficult in comparison with other general analyses. We have developed a novel skin sensitization assay system (chromophore solid phase peptide reaction assay (C-SPRA)) to solve these problems. In this study, in order to develop a method of rapid sensitization assessment, we improved the C-SPRA system by changing a type of beads and simplifying the operations in the measurement preparation stage.

Keywords : Peptide-immobilized beads; Chromophore; Skin sensitization; Direct peptide reactivity assay; Alternatives to animal testing

皮膚感作性試験における動物実験代替法である Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) 法は、被験物質とペプチドとの反応を利用した試験法である¹⁾。DPRA 法は in vitro において有効な皮膚感作性の評価法であるが、難水溶性物質の評価が困難であることや操作が煩雑であることなど多くの問題を抱えていた。これらの問題点を解決するため、我々は以前よりペプチド固定化ビーズと色素を使用した皮膚感作性試験法として Chromophore solid phase peptide reaction assay (C-SPRA) 法を開発してきた^{2,3)}。ペプチド固定化ビーズは幅広い溶媒中で膨潤するため、適切な溶媒を選択することにより、難水溶性物質の感作性を評価することが可能である。また色素を用いることで、紫外可視吸収測定によって感作性を評価でき、試験操作が簡便である。しかし、これまで開発してきた C-SPRA 法は DPRA 法と同様に反応に 24 時間を要していたため、試験時間の短縮が望まれていた。そこで我々は C-SPRA 法を改良し、約 2 時間の試験時間で迅速に感作性を評価できる試験法を開発することとした。本発表では、C-SPRA 法の改良に向けたビーズの選定を中心に研究成果を報告する。ビーズとして PEGA レジンを使用すると、ペプチドと被験物質との反応を短時間で行うことができ、試験の再現性についても向上することが分かった。また試験準備段階における操作を簡便化でき、操作性の優れた試験が実施可能となった。

1) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidelines for Testing of Chemicals No. 442C. *In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay*, Paris, France, 2015.; 2) H. Miyazaki et al. *Analyst*, **2020**, 145, 3211.; 3) H. Miyazaki et al. *Processes*, **2020**, 8, 1257.

ペプチド固定化ビーズを用いた種々のβ-バレル型ナノポアの作製と分析

(甲南大 FIRST¹・東京農工大工²・横浜国立大工³) ○栢森 史浩¹・仮屋 拓斗¹・小林 もえ¹・彭 祖癸²・川村 出³・川野 竜司²・臼井 健二¹

Fabrication and analysis of β-barrel type nanopores using peptide-immobilized beads

(¹Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology, Konan university, ²Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology, ³Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University) ○Fumihiko Kayamori,¹ Takuto Kariya,¹ Moe Kobayashi,¹ Zugui Peng,² Izuru Kawamura,³ Ryuji Kawano,² Kenji Usui¹

Peptide-based nanopores have attracted much attention, recently. We have developed β-barrel-type nanopores using β-sheet peptides. In this study, in order to construct nanopore-forming peptide library, we investigated fabrication methods of nanopores using peptide-immobilized beads. By using peptide-immobilized beads with a photocleavable linker, we succeeded in synthesizing highly aggregating peptides with high purity without using O-acylisopeptide method. In the near future, we will synthesize various peptides with the photocleavable linker and attempt to design peptide sequences with statistical analysis.

Keywords : Peptide-immobilized beads; Photocleavable linker; Peptide nanopore; β-sheet peptide; Aggregation

分子識別能を有するナノポアは、分子センサーやシーケンサーとしての応用が進められている。分子識別能はナノポアの構造やサイズに依存するが、現状のナノポア作製法ではそれらの制御が難しい。そこで我々はペプチドを用いたナノポア¹⁾に着目し、βシートペプチド (SVG28) から成るβ-バレル型ナノポアを開発してきた²⁾。SVG28の合成では O-アシルイソペプチド法³⁾を用い、合成や精製時に問題となるペプチドの凝集の抑制に成功した³⁾。しかし、設計した様々なペプチドとそれらが形成するナノポアの高次構造との関係を網羅的に解析するためには、より簡便かつ効率的な合成法が必要であった。そこで、光開裂リンカーを導入したペプチド固定化ビーズを用い、測定の前直前に光照射によりペプチドを遊離させることが可能な手法を検討した⁴⁾。樹脂には Amino PEGA Resin、光開裂リンカーとして 3-(2-ニトロフェニル)プロピオニル基を使用して、固相合成により樹脂に担持された SVG28 を得た。このペプチド固定化ビーズへの光照射後、得られた SVG28 について CD 測定など各種分析を行ったところ、O-アシルイソペプチド法により合成した SVG28 と同等の結果が得られた。次に、設計したペプチドとそれらが形成するナノポアの高次構造との関係を調べるため、SVG28 の N 末端にアミノ酸 1 残基のみ付加した 23 種類のペプチドの合成および分析を実施した。今後、これら分析結果を用いて統計解析を行う予定である。

1) D. Qiao *et al. Sci. China Chem.*, **2022**, *65*, 2122–2143.; 2) K. Shimizu *et al. Nat. Nanotech.*, **2022**, *17*, 67–75.; 3) Y. Hamada *et al. Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 4155–4167.; 4) K. Usui *et al., Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, *21*, 8332.

ペプチドを用いた金ナノ粒子固定化ビーズのワンポット合成とその触媒活性の評価

(甲南大学 FIRST) ○吉田 光輝・吉田 秀平・鶴岡 孝章・臼井 健二

One-pot synthesis of immobilized gold nanoparticles using peptide-immobilized microbeads and evaluation of their catalytic activity (¹Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University)

○Koki Yoshida, Shuhei Yoshida, Takaaki Tsuruoka, Kenji Usui

Gold nanoparticles attract attention for various applications such as biosensor and catalyst. These applications require immobilization to prevent gold nanoparticles from aggregating and enable their reuse in industry. However, conventional immobilization methods of gold nanoparticles need multi-step reactions. Meanwhile, some peptides have the ability of metal selective precipitation. Furthermore, as peptides were synthesized on the beads in the solid phase synthesis, we can use peptidyl microbeads after deprotection as a peptide immobilizing solid support. Therefore, we conducted a one-pot synthesis and immobilization of gold nanoparticles using peptidyl beads. In the observation of SEM and SEM-EDX, Gold nanoparticles were immobilized efficiently on the beads. Additionally, their particle sizes are the almost same independent of concentrations of gold (III) chloride acid (HAuCl₄). Moreover, catalytic activity for the reduction of 4-nitrophenol was enhanced as increase of concentration of HAuCl₄. Therefore, catalytic activity for the reduction could be adjusted by changing concentrations of HAuCl₄.

Keywords : Immobilized peptide; Mineralization; Gold nanoparticles; Heterogeneous catalyst; One-pot synthesis

金ナノ粒子は、バイオセンサーや触媒など幅広い応用のため注目されている^{1,2)}。これらの応用を実現するためには、分子同士の凝集抑制や再利用のため固定化が有力な手段となる。しかしながら、従来の金ナノ粒子の固定化手法は、複数の反応が必要であり簡便な手法が達成されていない³⁾。一方でペプチドは、ミネラルゼーションによる金属特異的な沈殿能を持つことが知られている⁴⁾。さらに、固相合成によりビーズ上で合成し脱保護をすることにより、マイクロビーズをそのまま固定化ペプチド担体として使用できる⁵⁾。以上より本研究では、ペプチドビーズを用いてワンポットでの金ナノ粒子の合成と固定化を試みた。SEM 及び SEM-EDX 観察により、ペプチドビーズにより効率良く金ナノ粒子が固定化されていることが明らかとなった。さらに、原料である塩化金酸の濃度を変えても粒子径が一定であることが明らかとなった。また、塩化金酸の濃度を高くすることで、触媒活性が向上した。以上より、塩化金酸の濃度の変化で触媒活性の制御が可能な金ナノ粒子固定化ビーズのワンポット合成に成功した。

1) N. R. Mohamad *et al.*, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **2015**, 29, 205-220. 2) J. Saavedra, *et al.*, *J. A. C. S.*, **2018**, 140, 3723-9268. 3) T. A. Kandiel *et al.*, *Chem. Mater.* **2010**, 22, 2050-2060. 4) K. Usui *et al.*, *Comm. Chem.*, **2016**, 39, 17081-17084. 5) H. Miyazaki *et al.*, *Analyst*, **2020**, 145, 3211-3216.

金イオンと銀イオンを用いた金還元ペプチドによる異方性金ナノ構造体の作製

(甲南大 FIRST) ○吉田秀平・下向芳樹・吉田光輝・尾崎誠・臼井健二
Synthesis of anisotropic gold nanostructure using gold reduction peptides with gold and silver ions (*Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University,*) ○Shuhei Yoshida, Yoshiki Shitamukai, Koki Yoshida, Makoto Ozaki, Kenji Usui

Gold nanoparticles (AuNPs) have unique properties such as localized surface plasmon resonances (LSPRs) and catalytic activity. Their LSPR properties can be tailored by synthetically tuning their shapes. Anisotropic AuNPs have absorption in the near-infrared region derived from LSPRs. Therefore, the synthesis of anisotropic gold nanoparticles is attracting attention as a tool for cancer therapy. However, the use of highly biotoxic molecules such as surfactants, reducing agents, and protective agents is problematic. In this study, we attempted to fabricate anisotropic gold nanostructures in the presence of silver and gold ions using gold-reducing peptides. As a result, we succeeded in fabricating gold nanostructures with SPR-derived absorption at 600~700 nm. Elemental analysis and shape observation of the structures are currently underway.

Keywords : Gold ion-reducing peptide; Silver ion; Mineralization; Anisotropic gold nanostructures; Tryptophan

がん治療のツールへの応用のために近赤外領域に表面プラズモン共鳴 (SPR) 由来の吸収を有する異方性金ナノ構造体の作製が注目されている¹⁾。既存の異方性金ナノ構造体の多くは、金イオンと銀イオン、界面活性剤、還元剤を混合することで合成されている²⁾。しかしながら、合成時に使用する界面活性剤や還元剤、分散保護剤は生体毒性が高く、生体応用への障壁となっている。そこで、我々は生体適合性を有するペプチドを用いたミネラルリゼーションにより、異方性金ナノ構造体の作製を試みることにした。ペプチドは金属イオンの還元を緻密に制御することができ、形状をコントロールすることも可能である^{3,4)}。本研究では、N末端のトリプトファン残基の数を1~3に変化させた金イオン還元ペプチド3種類を用いて、銀イオンと金イオンの混合条件で近赤外領域に SPR 由来の吸収を有する異方性金ナノ構造体を作製することを試みた。その結果、600~700 nm に SPR 由来の吸収を有する異方性金ナノ構造体の作製に成功した。現在、作製した構造体の ICP-AES 測定による元素分析や TEM による形状観察などを行っている。今後、さらにアスペクト比の高い異方性金ナノ粒子を作製するために、ペプチドを自己集合化させ、テンプレートとするなどの検討を行いたいと考えている。

1) Y. Hang, A. Wang, N. Wu, *Chem. Soc. Rev.*, **2024**, 53, 2932-2971. 2) M.-Z. Wei, T.-S. Deng, Q. Zhang, Z. Cheng, S. Li, *ACS Omega*, **2021**, 6, 9188-9195. 3) M. Ozaki, T. Imai, T. Tsuruoka, S. Sakashita, K.-y. Tomizaki, K. Usui, *Commun. Chem.*, **2020**, 4, 1. 4) S. Yoshida, K.-y. Tomizaki, K. Usui, *Chem. Commun.*, **2023**, 59, 13239-13244.

ミネラル化ペプチドを用いたリポソーム内での金ナノ粒子合成技術の開発

(東京科学大・物質理工¹) ○阿部 裕哉¹・田中 祐圭¹

Development of Au nanoparticle synthesis inside liposome using biomineralization peptides
(¹*School of Materials and Chemical Technology, Institute of Science Tokyo*) ○Yuya Abe,¹
Masayoshi Tanaka,¹

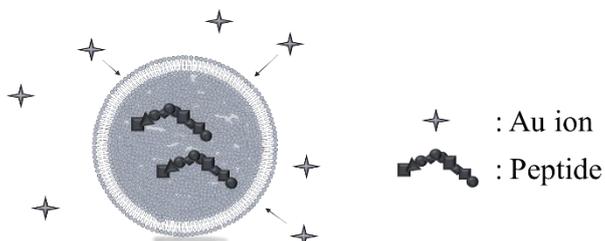
Gold nanoparticles (AuNPs) are promising for cancer treatments, particularly in photothermal therapy. In our laboratory, the B3 peptide (ASHQWAWKWE) was identified to synthesize triangular Au nanoplates (AuNPIs) with photothermal conversion activity under near-infrared light absorption¹). Notably, these biocompatible AuNPIs can be synthesized under mild and environmentally friendly conditions. However, the enhancing the yield of AuNPIs remains challenging due to difficulties in achieving selective synthesis in solution.

In this study, we utilized homogeneous liposome nanoreactors to improve the yield of AuNPI synthesis by B3 peptides, built on findings that confined reaction domains provided by liposomes can precisely control NP shape²). Surprisingly, highly branched AuNPs were observed, suggesting that lipid properties, in addition to reaction domains, significantly influence particle formation. These uniquely shaped NPs may offer novel catalytic properties or functional advantages in various applications, which warrants further investigation.

Keywords : Au nanoparticle; Biomineralization peptides; Liposome

金ナノ粒子 (AuNPs) は、光温熱療法によるがん治療への応用が期待されている。当研究室では、光熱変換活性をもつ三角形金ナノプレート (AuNPIs) を合成する B3 ペプチド (ASHQWAWKWE) が同定された¹⁾。これらの生体適合性 AuNPIs は環境に優しい条件下で合成可能である。しかし、溶液中でこの形状の粒子を選択的に合成することは依然として困難であり、収率の向上が課題となっている。

本研究では、B3 ペプチドによる AuNPI 合成の収率を向上させるため、均一なりポソームナノリアクターを用いる方法を検討した。驚くべきことに、高度に分岐した AuNPs が観察され、反応場だけでなく脂質の特性も粒子形成に大きな影響を与えることが示唆された。これらの特異な形状を持つナノ粒子は、新しい触媒特性や多様な応用分野での利用が期待され、さらなる研究が求められる。



- 1) M. Tanaka *et al.* Synthesis of near-infrared absorbing triangular Au nanoplates using biomineralization peptides. *Acta Biomater.* **2021**, *131*, 519-531.
- 2) J. R. Henriksen *et al.* Elucidating the anomalous membrane permeability of Ag(I), Cu(II), Zn(II) and Au(III) towards new nanoreactor strategies for synthesizing metal nanoparticles. *Nanoscale* **2020**, *12*, 22298

Development and cell imaging of a red fluorescent chemigenetic indicator for Ca^{2+} based on photoactive yellow protein (PYP)-tag

(¹Graduate School of Science, The University of Tokyo) ○Takumi Yanagimachi,¹ Takuya Terai,¹ Robert E. Campbell¹

Keywords: Chemigenetic indicator, Fluorescence, Calcium ion, Photoactive yellow protein (PYP)-tag, Tetrazole

Calcium ion (Ca^{2+}) is a second messenger crucial to various bioactivities, and expanding the palette of fluorescent Ca^{2+} indicators into the far-red region is preferred due to the higher tissue penetration and lower phototoxicity of longer wavelength light. Recently, a new type of chemigenetic indicator, HaloCaMP, was developed by covalently conjugating the synthetic NIR fluorophore Janelia Fluor 635 (JF₆₃₅) to a fusion protein composed of the calmodulin (CaM) Ca^{2+} binding protein and the HaloTag self-labeling protein. HaloCaMP combines the advantages of both the synthetic fluorophore and the protein-based Ca^{2+} sensing domain.¹ We propose that expanding the variety of chemigenetic indicators with other orthogonal tag proteins will be beneficial for enabling multiplex imaging. To achieve this goal, we developed a red fluorescent chemigenetic Ca^{2+} indicator, PYCaMP-R, by directed evolution. PYCaMP-R is composed of CaM, photoactive yellow protein (PYP)-tag,² and a styryl pyridinium (SP)-based red fluorescence ligand (PCAF-SP-Small) (**Fig. 1a**). The indicator exhibited a good fluorogenic response to Ca^{2+} *in vitro*. However, the ligand accumulated in some organelles of HeLa cells, presumably due to the cationic charge of SP, which caused high background fluorescence during cell imaging. The indicator also exhibited a low affinity to Ca^{2+} ($K_d = 0.75 \mu\text{M}$), which is not ideal for monitoring subcellular Ca^{2+} dynamics.

To address these issues, we were inspired by a report from Kamikawa *et al.* on a new strategy to suppress the organelle accumulation of cationic ligands by introducing a tetrazole moiety as a carboxylic acid isostere.³ Accordingly, we redesigned the SP-based ligand with a tetrazole to provide PCAF-SP-TZ-Small (**Fig. 1b**). The protein domain of PYCaMP-R was re-optimized for the new ligand by directed evolution to achieve a 3.1-fold fluorescence change and higher affinity for Ca^{2+} ($K_d = 0.21 \mu\text{M}$). Further development and efforts to apply this new indicator for live cell imaging of Ca^{2+} dynamics are ongoing.

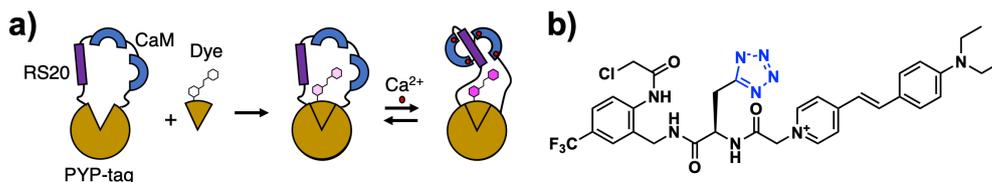


Figure 1. a) Schematics of red chemigenetic Ca^{2+} indicator. b) Structure of PCAF-SP-TZ-Small.

1) Deo, C. *et al. Nat Chem Biol* **2021**, *17*, 718–723. 2) Hori, Y. *et al. J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 16610–16611. 3) Kamikawa, T. *et al. Chem Sci* **2024**, *15*, 8097–8105.

生体内応用を志向したタンパク質の細胞内導入用ケーシング技術の開発

(東大院¹・阪公大院²・阪大産研³) ○守山 千晴¹・山本 涼太郎¹・芝原 優希²・中瀬 生彦²・岡本 晃充¹・山口 哲志³

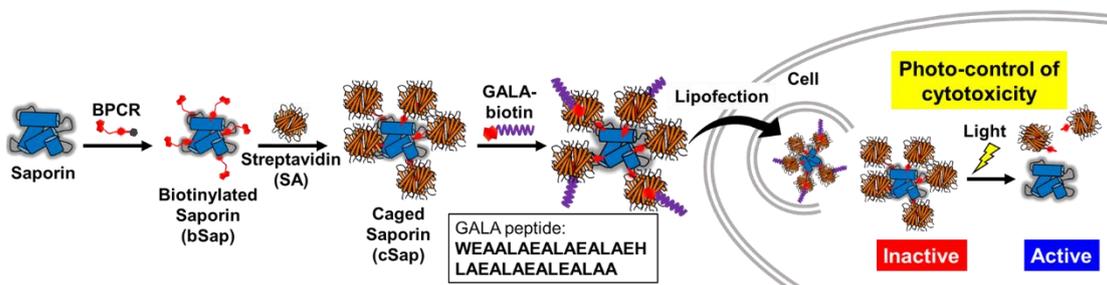
Caging technology for intracellular protein delivery aimed at *in vivo* applications

(¹Graduate School, Tokyo University, ²Graduate School, Osaka Metro University, ³SANKEN, Osaka University) ○Chiharu Moriyama¹, Ryotaro Yamamoto¹, Yuki Shibahara², Ikuhiko Nakase², Akimitsu Okamoto¹, Satoshi Yamaguchi³

Technologies for introducing proteins into cells and controlling their activity are in high demand for medical applications and the elucidation of protein functions. We developed “sterically bulky caging” as a versatile technique for controlling protein activity¹ and successfully photo-activated proteins inside and outside cells¹⁻³. However, the introduction efficiency in the presence of serum is low, making *in vivo* application challenging. In this study, we developed a method to introduce caged proteins into cells in the presence of serum by using GALA peptides and cationic lipids⁴. Saporin, a toxic protein was modified with a biotinylated protein caging reagent (BPCR), streptavidin and biotinylated GALA peptide, and then introduced into four cell lines by lipofection with low toxicity and in the presence of serum. Furthermore, its cytotoxicity was confirmed to be photo-controllable.

Keywords : protein caging, intracellular delivery, photoactivation

特定のタンパク質を細胞内に導入し活性を制御する技術は、医療への応用やタンパク質の機能解明において需要がある。我々は、タンパク質の活性を制御する技術として「嵩高いケーシング法」を開発し¹、細胞内外でのタンパク質の光活性化に成功してきた¹⁻³。しかし、血清存在下での導入効率が低く、生体への応用に課題があった。本研究では、GALA ペプチドとカチオン性脂質を用いて⁴、嵩高いケーシングを施したタンパク質を血清存在下で細胞内に導入する方法を開発した。毒性タンパク質であるサポリンを、光分解性リンカーを介してビオチン化し、Streptavidin とビオチン化 GALA ペプチドを修飾した後、リポフェクションによって4種類の様々な細胞内に低毒性かつ血清存在下で導入し、その毒性が光制御されることを確かめた。



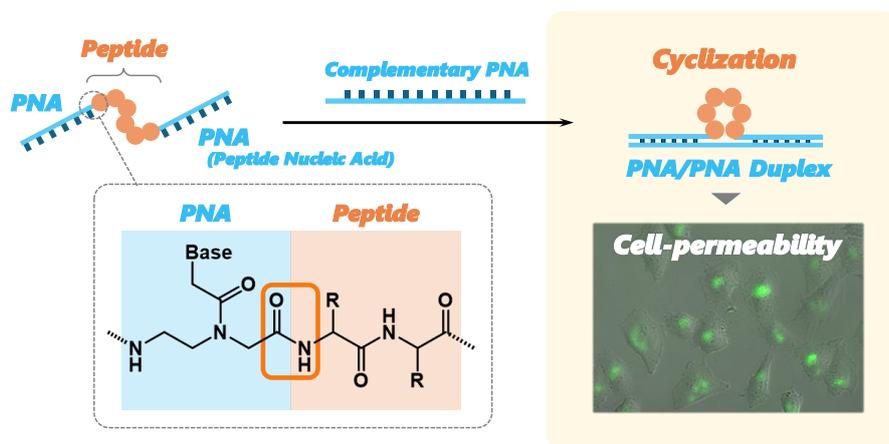
1) Takamori, S *et al.*, *Chem. Commun.* 2013, **49**, 3013; 2) Yamaguchi, S. *et al.*, *Bioconj. Chem.* 2021, **32**, 1535; 3) Yamaguchi, S. *et al.*, *ChemBioChem* 2022, **23**, e202200476; 4) Nakase, I. *et al.*, *Sci. Rep.* 2015, **5**, 10112.

ペプチド核酸 PNA の 2 本鎖形成を利用したペプチドの膜透過性発現

(名大院理¹) ○窪田 英雄¹・愛場 雄一郎¹・有安 真也¹・荘司 長三¹
 Regulation of Peptide Structure by Forming the PNA/PNA Duplex for Membrane Permeability
 (¹Graduate School of Science, Nagoya University) ○Hideo Kubota¹, Yuichiro Aiba¹, Shinya Ariyasu¹, Osami Shoji¹

The unique functions of peptides and proteins are supported by their three-dimensional structures. In recent years, various methods for controlling peptide structures, such as covalent bond stapling, have been reported. This study investigates the conformational modulation of peptides through duplex formation using PNA-peptide conjugates, where peptide nucleic acid (PNA)¹ is conjugated to peptides at both termini. We designed and synthesized several PNA-peptide conjugates based on previously reported cell-penetrating peptides² and evaluated their cell membrane permeability by comparing the results before and after duplex formation. Our results demonstrated that the cell membrane permeability of PNA-peptides is enhanced by the stabilization of their peptide structure through the formation of a PNA-peptide/PNA duplex. *Keywords* : Peptide; Peptide Nucleic Acid; Intracellular Uptake; Cell Membrane Permeability

ペプチドやタンパク質の高度な機能には、その立体構造が重要な役割を果たしており、共有結合形成を利用したステーブル化など、様々なペプチドの2次構造制御がこれまで報告されている。当研究室では、ペプチドと共通のアミド結合からなるペプチド核酸 (PNA)¹を、ペプチドの両端に連結した PNA-ペプチドを用いることで、相補的核酸との2本鎖形成によるペプチドの構造規定をこれまで検討してきた。本研究では、既報²の環状ペプチドを参考に PNA-ペプチドを設計し、その細胞膜透過性について評価を行った。その結果、相補鎖との2本鎖形成により、膜透過性が発現することを明らかにした。現在は実験条件の最適化や各種比較検討を行っており、併せて報告する予定である。



1) P. E. Nielsen, *et al.*, *Science*, **254**, 1497-1500 (1991) 2) K. Matsui, *et al.* *Chem. Eur. J.*, **23**, 3034-3041 (2017)

生細胞内におけるタンパク質の反応性や安定性の制御を指向した、化学触媒を用いた非天然アシル基の導入手法の開発

(東大院薬¹) ○大熊 遼¹・鈴木 海翔¹・山梨 祐輝¹・金井 求¹

Development of a method for introduction of non-canonical acyl groups using chemical catalysts toward control of the reactivity and stability of proteins in living cells. (¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo) ○Ryo Okuma,¹ Kaito Suzuki,¹ Yuki Yamanashi,¹ Motomu Kanai¹

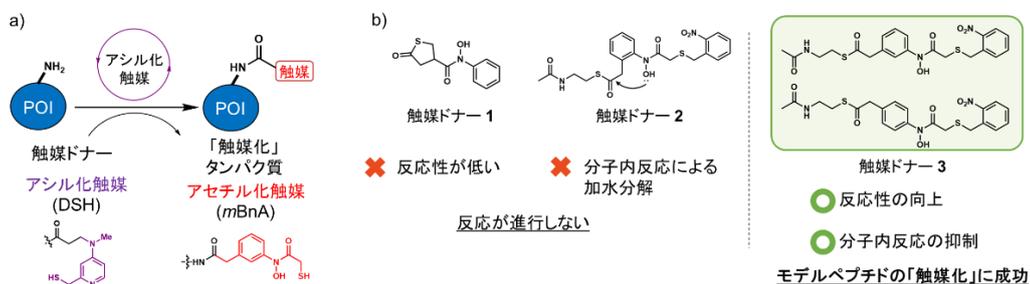
As various post-translational modifications (PTMs) regulate protein function, methods to chemically introduce these PTMs can be useful biological tools or therapeutic strategies. In our laboratory, several catalysts have been developed for regioselective introduction of acyl groups into proteins in living cells^{1,2}. In this study, we aimed to functionalize proteins in living cells by introducing unnatural acyl groups into proteins. We started to introduce acetylation catalysts into proteins via acylation (Figure a).

Firstly, we synthesized catalyst-bearing acyl donors **1** and **2**, but **1** showed low reactivity, and **2** underwent hydrolysis due to intramolecular reactions, failing to introduce the catalyst. To address these issues, we designed an improved donor **3**, which successfully introduced the catalyst onto the lysine residues of the model peptide (Figure b).

Keywords : Chemical biology; Protein modification; In-cell catalyst; Protein acylation

タンパク質は種々の翻訳後修飾により、その機能が調節される。そのため、これらのタンパク質翻訳後修飾を化学的に制御する手法は、生物学のツールや新規治療戦略として応用しうる。所属研究室において、生細胞内のタンパク質を残基選択的にアシル化する触媒が開発されている^{1,2}。本研究では、アシル化によってタンパク質に非天然型のアシル基を導入することで、生体内のタンパク質を高機能化することを目指す。特に、タンパク質にアセチル化触媒を導入し、タンパク質自体に新たな人工触媒としての機能を付与する手法の開発を目指した(図 a)。

触媒部位を持つアシルドナー(触媒ドナー)**1,2**を合成し、モデルペプチドへの触媒導入を試みたところ、**1**は反応性が低く、**2**は分子内反応による加水分解が進行し、触媒を導入できなかった。そのため、これらを解決する分子設計を検討した結果、触媒ドナー**3**を用いることで、モデルペプチドへの触媒導入に成功した(図 b)。発表では、触媒ドナーを用いたモデルタンパク質に対する触媒導入についても議論したい。



1) *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 7568.

2) *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 5790.

酵素反応を介した側鎖の電荷変換により活性化する膜破壊ペプチドの開発

(東大工¹・東大院工²) ○藤田 慧¹・王子豪²・濱邊 美佳子²・古畑 隆史²
 Development of Membrane-Disrupting Peptides Activated by Enzyme-Mediated Charge Conversion of the Side Chain (¹Faculty of Engineering, The University of Tokyo, ²Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) ○Kei Fujita¹, Wang Zihao², Mikako Hamabe², Takafumi Furuhashi²

The membrane-disrupting peptide is a promising molecular platform for cancer therapy that potentially circumvents drug resistance in cancer cells. While there have been advancements in enhancing anticancer activity by substituting certain amino acids and improving cancer selectivity through modifications to the side chains, it is a crucial challenge to develop membrane-disrupting peptides that exhibit both high anticancer activity and cancer selectivity.

In this study, we attempted the development of functional membrane-disrupting peptides that exhibit high anti-cancer activity in a cancer-selective manner. Specifically, we designed artificial peptides in which basic lysine residues that are critical for the cytotoxicity were protected by a negatively charged functionality to reduce their net positive charge. The peptides are expected to recover its membrane disrupting activity through deprotection by enzymes overexpressed on cancer cells to restore a positive charge (Fig. 1). In this presentation, we will discuss the enzymatic deprotection and cytotoxicity of the artificial peptides.

Keywords : Membrane-disrupting peptide; Enzyme-responsive side chain modification; Cancer selectivity; Charge conversion

膜破壊ペプチドは、強力ながん治療に向けて、がん細胞による薬剤耐性獲得の回避を期待できる有望な分子基盤である。これまで、アミノ酸配列の一部を塩基性アミノ酸

に置換することで抗がん作用を増強し、側鎖に修飾を施すことでがん選択性の向上が行われてきた。しかし、高い抗がん作用とがん選択性を併せ持つ膜破壊ペプチドの開発は依然として重要な研究課題である^[1]。

以上の背景から、本研究ではがん細胞選択的に高い抗がん作用を発揮する機能性膜破壊ペプチドの開発を試みた。具体的には、毒性の発揮に重要な塩基性のリシン側鎖を負電荷を持つ保護基により保護することで、正味の正電荷を低減した人工ペプチドを設計した。これにより、がん細胞に過剰発現している酵素を介した脱保護により、正電荷を回復することでがん細胞選択的な細胞破壊能の発揮が期待される (Fig 1)。本研究では、酵素による人工ペプチドの脱保護および、細胞毒性について議論する予定である。

[1] *Biotechnol Genet Eng Rev.*, **2023**, *39*, *1*, 45-84.

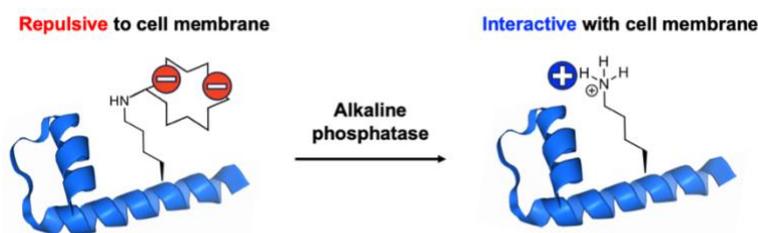


Figure 1. Scheme of side-chain charge conversion

分岐構造により制御される機能の解明に向けた不均一ポリユビキチン鎖ライブラリの構築

(東大院工¹・東大先端研²・鳥大院工³・鳥大 GSC センター⁴・京大院理⁵) 崔 汎圭¹、古畑 隆史¹、富田 拓哉²、佐藤 裕介^{3,4}、尾勝 圭⁵、深井 周也⁵、佐伯 泰²、岡本 晃充¹

Construction of a heterotypic polyubiquitin chain library to elucidate functions controlled by branched structures (¹Graduate school of Engineering, The University of Tokyo, ²The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, ³Graduate school of Engineering, Tottori University, ⁴GSC center, Tottori University, ⁵Graduate school of Science, Kyoto University) Bumkyu Choi¹, Takafumi Furuhata¹, Takuya Tomita², Yusuke Sato^{3,4}, Kei Okatsu⁵, Shuya Fukai⁵, Yasushi Saeki², Akimitsu Okamoto¹

Polyubiquitination is one of the major post-translational modifications involved in intracellular protein degradation and signaling. In K63/K48 polyubiquitin heterotypic chains, it has been reported that ubiquitin extended via K48 interferes with deubiquitinases that cleave K63 chains, stabilizing inflammatory signaling by NF- κ B derived from K63 chains. In another case, K48 chains shut down the function of K63 chains and substrate proteins by inducing the substrate protein to proteasomal degradation that the branched structure can exert seemingly contradictory functions^{1,2}.

To elucidate the unclear functional control mechanism of heterotypic chains, it is important to investigate the link between branched structures and functions. By expressing ubiquitin with an intein at the C-terminus that can be hydrolyzed by mercaptoethanol and using it as an intermediate, we synthesized heterotypic chains of ubiquitin tetramers with controlled structure. In this study, we performed a pull-down assay with a series of synthetic heterotypic chains in cell lysate to evaluate the structure-activity relationship, i.e., which proteins in the cell primarily interact with specific chains.

Keywords : Polyubiquitin, Heterotypic chain library, Structure-controlled synthesis, Structure-activity relationship, Intein

ポリユビキチン化は細胞内のタンパク質分解やシグナル伝達に関与する主要な翻訳後修飾のひとつである。K63/K48 ポリユビキチン不均一鎖 (不均一鎖) において、K48 を介して伸長したユビキチンが K63 鎖を切断する脱ユビキチン化酵素を妨害するため K63 鎖に由来する NF- κ B による炎症反応の信号が安定化することが報告される一方、別のケースでは基質タンパク質がプロテアソーム分解へと誘導されることで K63 鎖と基質タンパク質の機能をシャットダウンするという一見相反する機能がその分岐構造によって発揮しうることが報告された^{1,2}。

未だ明らかでない不均一鎖の機能制御機構の解明には、分岐構造と機能の結びつきの理解が重要である。メルカプトエタノールで加水分解できるインテインが C 末端にあるユビキチンを発現し中間体として活用することで、ユビキチンテトラマーの不均一鎖を構造制御しながら合成した。本研究では、構築した一連の不均一鎖を細胞破砕液内でプルダウンアッセイすることで、特定の構造を持つ不均一鎖が細胞内のどのタンパク質と主に相互作用するのか、その構造活性相関を評価する。

1) *Mol. Cell*, **2016**, *64*, 251-266.; 2) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2018**, *115*, 1401-1408.

DNA-encoded library 技術を用いた環状ペプチドの膜透過性評価系の構築

(東大院工¹) ○揚原 聖智¹・森本 淳平¹・山東 信介¹

Development of a Membrane Permeability Assay for Cyclic Peptides Using DNA-Encoded Library Technology (¹Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) ○Seichi Aghara,¹ Jumpei Morimoto,¹ Shinsuke Sando¹

Cyclic peptides are of interest as a therapeutic modality capable of permeating the cell membrane. However, design guidelines for highly membrane-permeable cyclic peptides have not yet been established. Therefore, there is an urgent need to collect a large dataset of structure–permeability relationships of cyclic peptides. In large-scale measurements of membrane permeability, it is necessary to identify peptide sequences after the membrane permeability assay. However, conventional compound identification methods using mass spectrometry limit the structural diversity of the peptide libraries for the permeability assay.

In this study, to enable the acquisition of large-scale membrane permeability data for diverse cyclic peptide libraries, we developed a method that allows the identification of peptide sequences from DNA sequences after membrane permeability assays, by utilizing DNA-encoded library technology. First, peptides were synthesized on a solid support in a DNA-encoded manner. Subsequently, we examined whether it is possible to identify peptide sequences from DNA sequence information following the membrane permeability measurements of cyclic peptides.

Keywords : DNA-Encoded Library; Cyclic Peptides; Membrane Permeability; Peptide Library

環状ペプチドは、細胞膜を透過できる創薬モダリティとして期待されているものの、高い細胞膜透過性を示す環状ペプチドの設計指針は未だ確立されていない。そのため、環状ペプチドの構造と膜透過性の相関データを大規模に取得することが求められている。大規模な膜透過性データ計測においては、膜透過アッセイ後にペプチドの配列を同定することが必要であるが、従来の質量分析による化合物同定法では、膜透過性評価に用いるペプチドライブラリーの構造多様性が制限されてしまっていた。

本研究では、多様な環状ペプチドライブラリーの大規模膜透過性データの取得を実現するため、DNA-encoded library 技術を活用することで、膜透過アッセイ後に DNA 配列からペプチド配列を同定できる手法の構築を行った。まず、ペプチドを固相上で、DNA 配列でエンコードした形で合成し、続いて、環状ペプチドの膜透過性計測後に DNA 配列の情報からペプチド配列を同定することが可能かどうかを検証した。

