

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) 15:55 ~ 17:15 [A]A301(第3学舎 1号館 [3階] A301)

[[A]A301-1vn] 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー

座長：菊池 幸祐、三木 卓幸

◆ 日本語

15:55 ~ 16:05

[[A]A301-1vn-01]

核局在ペプチド提示人工ウイルスキャプシドの構築と細胞内導入

○和田 瑞生¹、稲葉 央¹、松浦 和則¹ (1. 鳥取大院工)

◆ 日本語

16:05 ~ 16:15

[[A]A301-1vn-02]

ヘマグルチニン搭載エンベロープウイルスレプリカの細胞内侵入

○中村 颯佑¹、古川 寛人¹、稲葉 央¹、佐々木 善浩²、秋吉 一成³、松浦 和則¹ (1. 鳥取大院工、2. 京大院工、3. 京大院医)

◆ 日本語

16:15 ~ 16:25

[[A]A301-1vn-03]

スピロピラン修飾人工ウイルスキャプシドと脂質膜の相互作用の光制御

○村田 雄紀¹、梁 応冰²、稲葉 央²、松浦 和則² (1. 鳥取大工、2. 鳥取大院工)

◆ 日本語

16:25 ~ 16:35

[[A]A301-1vn-04]

光応答性ペプチドナノファイバーによる相分離ジャイアントリポソームの局所変形の誘起

○高木 康成¹、梁 応冰²、稲葉 央²、松浦 和則² (1. 鳥取大工、2. 鳥取大院工)

16:35 ~ 16:45

休憩

◆ 日本語

16:45 ~ 16:55

[[A]A301-1vn-05]

大腸菌鞭毛を連結する人工タンパク質ナノケージの作成：計算機によるバインダー設計と実験的評価

○土方 太陽¹、新井 亮一²、宮本 憲二¹、川上 了史¹ (1. 慶應義塾大学、2. 信州大学)

◆ 日本語

16:55 ~ 17:05

[[A]A301-1vn-06]

球状錯体への集積によるペプチド凝縮模倣環境の構築

○渡邊 健穂¹、中間 貴寛¹、藤田 誠^{1,2,3} (1. 東大院工、2. 東大UTIAS、3. 分子研)

◆ 日本語

17:05 ~ 17:15

[[A]A301-1vn-07]

pH 応答的に伸縮するタンパク質集合体の構造解析

○沖澤 敬一¹、伊達 弘貴¹、鰐村 颯太¹、菊池 幸祐¹、上野 隆史¹ (1. 東京科学大学)

核局在ペプチド提示人工ウイルスキャプシドの構築と細胞内導入

(鳥取大院工) ○和田 瑞生・稲葉 央・松浦 和則

Construction of artificial viral capsid modified with nuclear localization signal peptide and its intracellular delivery (*Graduate School of Engineering, Tottori University*)○Mizuki Wada, Hiroshi Inaba, Kazunori Matsuura

Natural spherical viruses are controlled the trafficking in cell by the infection, multiplication, and even budding. We have previously created artificial viral capsids by self-assembly of β -annulus peptide derived from TBSV.¹ In this study, we constructed a nuclear-localized peptide-modified artificial viral capsid by self-assembly of β -Annulus peptide modified with a nuclear localization peptide at the C-terminal (Fig. 1). DLS and TEM of the aqueous solution of NLS-modified artificial viral capsid revealed the formation of spherical assemblies with the size of about 90 nm. The intracellular trafficking behavior and nuclear localization of the NLS-modified artificial viral capsid in HepG2 cells was evaluated by CLSM observation. As a result, the nuclear translocation ratio of TMR fluorescence was enhanced approximately 2.7 times by presentation of the nuclear-localized peptide (Fig. 1b).

Keywords : β -Annulus peptide; Artificial viral capsid; intracellular delivery; Nuclear-localized peptide

天然の球状ウイルスは、感染や増殖、出芽により細胞内でのトラフィックキングが制御されている。我々はこれまでに、TBSV由来の β -Annulusペプチド(INHVGGTGGAIMAPVAVTRQLVGS)の自己集合により人工ウイルスキャプシドを創製してきた¹⁾。本研究では、C末端に核局在ペプチド(Nuclear localization signal: NLS)を修飾した β -Annulusペプチドの自己集合により、核局在ペプチド提示人工ウイルスキャプシドを構築した(Fig.1a)。動的光散乱(DLS)測定および透過型電子顕微鏡(TEM)観察により、90 nm程度の球状集合体が確認され、核局在ペプチド提示人工ウイルスキャプシドの構築が示唆された。また、HepG2細胞(ヒト肝癌由来細胞株)に導入し、共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、核局在ペプチドの提示により核内への移行率が約2.7倍向上することが示された(Fig.1b)。

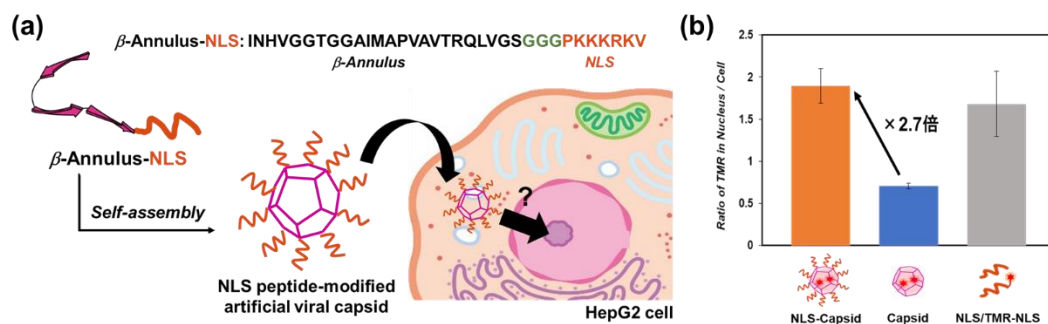


Fig.1 (a) Construction of NLS-modified artificial viral capsid. (b) Ratio of TMR fluorescence in Nucleus/Cell quantified by CLSM.

1) K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **54**, 8944 (2018).

ヘマグルチニン搭載エンベロープウイルスレプリカの細胞内侵入

(鳥取大院工¹・京大院工²・京大院医³) ○中村 颯佑¹・古川 寛人¹・稲葉 央¹・佐々木 善浩²・秋吉 一成³・松浦 和則¹

Intracellular Invasion of Enveloped Viral Replica Equipped with Hemagglutinin

(¹Graduate School of Engineering, Tottori University, ²Graduate School of Engineering, Kyoto University, ³Graduate School of Medicine, Kyoto University) ○Sosuke Nakamura¹, Hiroto Furukawa¹, Hiroshi Inaba¹, Yoshihiro Sasaki², Kazunari Akiyoshi³, Kazunori Matsuura¹

Influenza virus is equipped with hemagglutinin (HA) on the envelope, which invades into the host cells by endocytosis through specific recognition to sialic acid-containing glycans. We previously constructed an enveloped viral replica (EVR)¹ and revealed that it invades into the cells by membrane fusion.² Furthermore, we constructed an EVR equipped with membrane proteins connexin³ and HA⁴ using PURE system. In this study, we constructed TMR/NBD-labeled EVR equipped with HA and evaluated their intracellular invasion mechanism based on glycan recognition. We examined the effects of various endocytosis inhibitors and sialidase treatment on uptake into HepG2 cells. The results suggested that EVR equipped with HA invades into the cells by endocytosis through binding of HA to sialic acid.

Keywords : *β -Annulus peptide; Enveloped Virus Replica; Hemagglutinin; Sialic acid; Intracellular Invasion*

エンベロープウイルスであるインフルエンザウイルスは、エンベロープ膜上のヘマグルチニン(HA)がシアル酸含有糖鎖を特異的に認識し、エンドサイトーシスにより細胞内侵入する。我々はこれまで、TBSV 由来 β -Annulus ペプチドからなるアニオン性人工ウイルスキャプシドに、カチオン性脂質二分子膜を複合化することによりエンベロープ型ウイルスレプリカ(EVR)の構築に成功し¹⁾、それらが膜融合により細胞内侵入することを明らかにした²⁾。さらに、無細胞タンパク質発現により膜タンパク質コネキシンやHAを搭載したEVRの構築に成功している^{3,4)}。本研究では、赤色蛍光色素 TMR および緑色蛍光色素 NBD で標識した HA 搭載 EVR を構築し、糖鎖認識に基づく細胞内侵入機構を明らかにした(Fig 1)。TMR/NBD 標識 HA 搭載 EVR の HepG2 細胞への取り込みにおける様々なエンドサイトーシス阻害剤およびシアリダーゼ処理の影響を検証した結果、HA 搭載 EVR が細胞膜表面のシアル酸糖鎖との結合を介したエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが示唆された。

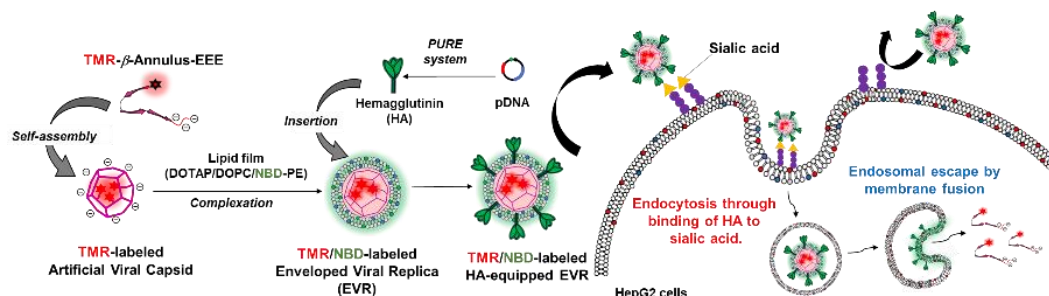


Fig 1. Construction and intracellular Invasion of TMR/NBD labeled EVR equipped with HA.

[1] H. Furukawa, H. Inaba, F. Inoue, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **56**, 7092 (2020); [2] H. Furukawa, Y. Kimura, H. Inaba, K. Matsuura, *Sci. Rep.*, **13**, 19934 (2023); [3] H. Furukawa, H. Inaba, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, *RSC Chem. Biol.*, **3**, 231 (2022); [4] 宮田健伸 *et al.*, 日本化学会第 102 回春季年会 要旨集, G301-3am-02 (2021)

スピロピラン修飾人工ウイルスキャプシドと脂質膜の相互作用の光制御

(鳥取大工¹・鳥取大院工²) ○村田 雄紀¹・梁 応冰²・稲葉 央²・松浦 和則²

Optical control of interaction between spiropyran-decorated artificial viral capsid and lipid membrane (¹*Faculty of Engineering, Tottori University*, ²*Graduate School of Engineering, Tottori University*) ○Yuki Murata,¹ Yingbing Liang,² Hiroshi Inaba,² Kazunori Matsuura²

In recent years, modification of photochromic molecules such as azobenzene and spiropyran (SP)/merocyanine (MC) has been actively investigated to photocontrol of self-assembly and biological activity of peptides.¹⁾ We have found that alkyl anchor-modified artificial viral capsids consisting of β -Annulus peptides from tomato bushy stunt virus can bud outside and inside GUVs.²⁾ In this study, we developed a spiropyran/merocyanine (SP/MC)-modified artificial viral capsid on the surface. Transmission electron microscopy (TEM) showed that both SP- and MC-forms self-assembled into spherical capsids with the size range of 80-200 nm. When the SP/MC-modified artificial viral capsid was added to the outside of the GUVs, the SP-form was observed to invade inside GUV more than the MC-form.

Keywords : Invasion; Spiropyran; Artificial viral capsid; Optical control; Giant liposome

近年、アゾベンゼンやスピロピラン(SP)/メロシアン(MC)などのフォトクロミック分子を修飾することにより、ペプチドの自己集合や生物活性を光制御する研究が盛んにおこなわれている¹⁾。

当研究室では、Tomato bushy

stunt virus 由来の β -Annulus ペプチドからなる人工ウイルスキャプシドにアルキルアンカーを修飾することで、GUV 外部および内部に出芽することを見出している²⁾。しかし、GUV や細胞内への侵入および出芽の光による時空間制御は未達成である。本研究では、キャプシド表面に SP/MC を修飾した人工ウイルスキャプシドを創製した。透過型電子顕微鏡(TEM)観察では、キャプシドと思われる粒径 80~200nm 程度の球状集合体が SP 体、MC 体の両方で観察された。この SP/MC 修飾人工ウイルスキャプシドを GUV 外部に添加したところ、MC 体より SP 体でより多くの GUV 内部への出芽が確認された。

1) K. Matsuura, H. Inaba, *Biophysics Rev.*, **4**, 041303 (2023).

2) K. Matsuura, M. Hirahara, K. Sakamoto, H. Inaba, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **25**, 2347191 (2024).

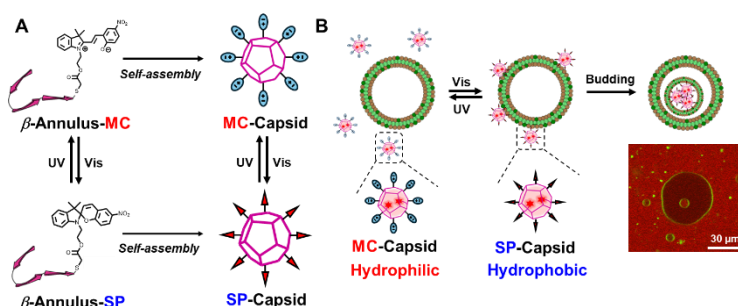


Fig. 1 (A) Schematic diagram of SP/MC-modified artificial viral capsid and (B) Light-controlled invasion and budding inside GUVs.

光応答性ペプチドナノファイバーによる相分離ジャイアントリボソームの局所変形の誘起

(鳥取大工¹・鳥取大院工²) ○高木 康成¹・梁 応冰²・稲葉 央²・松浦 和則²

Local Deformation of Phase-Separated Giant Unilamellar Vesicle induced by Photoresponsive Peptide Nanofibers (¹*Faculty of Engineering, Tottori University*, ²*Graduate School of Engineering, Tottori University*) ○Yasunari Takaki,¹ Yingbing Liang,² Hiroshi Inaba,² Kazunori Matsuura²

Cytoskeletons such as microtubules and actin filaments are natural supramolecular nanofibers that can be reversibly polymerized and depolymerized by external stimuli. We have previously developed spiropyran/merocyanine (SP/MC)-modified peptide nanofiber that mimics the natural cytoskeleton and assemble/disassemble reversibly by spatiotemporally controllable light.¹⁾ In addition, spherical giant unilamellar vesicles (GUVs) encapsulating the MC-peptide dramatically and reversibly changed into worm like vesicles by the photoisomerization to the SP-form.¹⁾ In this study, we encapsulated MC-peptide into phase-separated GUVs and localized it close to liquid-disordered (L_d) phase. Local deformation of phase-separated GUVs was achieved by the photoisomerization of the peptide to SP-form.

Keywords : Spiropyran, Giant Unilamellar Vesicle, Peptide Nanofiber, Assembly/Disassembly, Photoresponse

微小管やアクチンフィラメントなどの細胞骨格は、外部刺激により可逆的に重合・脱重合する超分子ナノファイバーである。我々は天然の細胞骨格を模倣し、時空間制御可能な光により、可逆的に集合・解離するスピロピラン/メロシヤニン(SP/MC)修飾 β -sheet 形成ペプチド(FKFEC^{SP/MC}KFE)を創製した¹⁾。これをジャイアントリボソーム(GUVs)に導入し、光照射によって球状 GUV からワーム状ベシクルへの可逆的かつ劇的な形態変化の光制御にも成功している¹⁾。本研究では β -sheet 形成ペプチドの光異性化による相分離 GUVs の局所変形を目指した。His-tag を有する β -sheet 形成ペプチド(FKFEC^{MC}KFEHHHHHH)と FKFEC^{MC}KFE からなるペプチドナノファイバーを、His-tag と配位結合する Ni-NTA を有する相分離 GUV に内包し、光照射を行った(Fig. 1A)。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察の結果、相分離 GUV の無秩序液体相 (L_d 相)において局所的な変形が確認された(Fig. 1B)。次に、ssDNA を有する β -sheet 形成ペプチド(FKFEC^{SP/MC}KFEC-ssDNA)を合成し、相補鎖 DNA を有する相分離 GUV に内包した。CLSM 観察の結果、 L_d 相にペプチド DNA コンジュゲートが局在していることが示唆された。

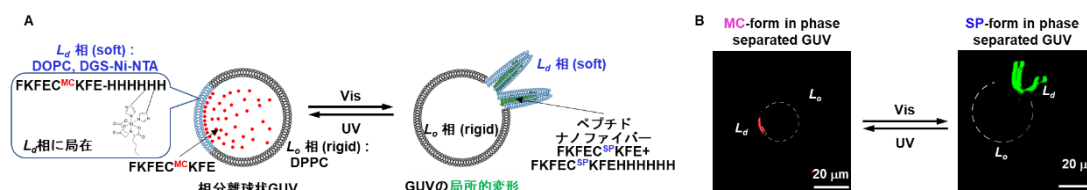


Fig1. Schematic illustration (A) and CLSM images (B) of local deformation of phase separated GUV encapsulating FKFEC^{SP/MC}KFE / FKFEC^{SP/MC}KFEHHHHHH (20/1) by photoisomerization in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4).

1) Y. Liang, S. Ogawa, H. Inaba, K. Matsuura, *Front. Mol. Biosci.*, **10**, 1137885 (2023)

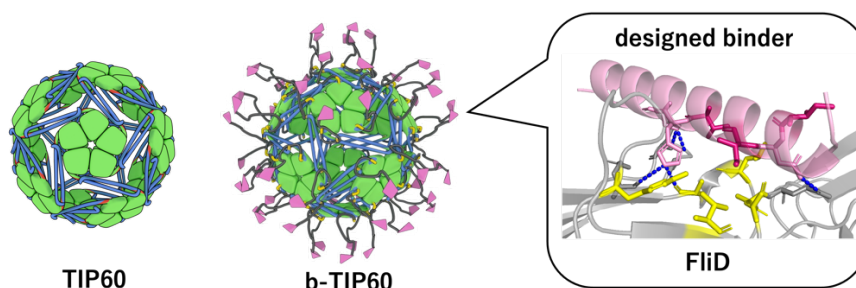
大腸菌鞭毛を連結する人工タンパク質ナノケージの作成：計算機によるバインダー設計と実験的評価

(慶大理工¹・信州大繊維²) ○土方 太陽¹、川上 了史¹、新井 亮一²、宮本 憲二¹
 Creating an artificial protein nanocage for linking *E.coli* Flagella: Computational binder design and experimental evaluation(¹Keio University, ²Shinshu University) ○ Taiyo Hijikata¹, Norifumi Kawakami¹, Ryoichi Arai², Kenji Miyamoto¹

Resting cell reactions are used as a method to produce compounds using whole cells without the need for enzyme purification. However, there are problems such as contamination by other microorganisms, and thus, selective cell recovery technology is required. In this study, we aim to develop a cell recovery technology using *E. coli* as a model organism. We hypothesized that if multiple *E. coli* cells are connected by a linker molecule specifically bound to a cell surface component, the cells would form aggregates that can be easily recovered from the solution. To test this hypothesis, we designed a peptide binder that specifically interacts with the *E. coli* flagellar protein FliD and displayed it on the surface of our designed protein nanocage, TIP60 (b-TIP60). The b-TIP60 has a spherical shape and can display up to 60 binder molecules. The structural analysis of b-TIP60 showed that it maintained a shape close to the original shape, suggesting that the structure was constructed as designed.

Keywords : Protein nanocage; TIP60; RFDiffusion; AlphaFold2

休止菌体反応は、酵素を精製することなく、細胞を丸ごと利用して化合物生産を行える手法として利用される。他方で、異種微生物の混入などの問題があり、選択的な細胞回収技術が求められている。本研究では、大腸菌をモデルに、選択的に細胞を絡めとる回収技術の開発を目的とする。具体的には、当研究グループが独自に開発したサッカーボール状タンパク質ナノ粒子 TIP60 の表面に、大腸菌と特異的に相互作用するペプチドバインダーを提示することで、大腸菌を巻き込んだ相互作用が起きる可能性を考えた。そこで、まず大腸菌べん毛タンパク質 FliD を対象としたペプチドバインダーの設計を行い、バインダーを融合した TIP60(b-TIP60)の設計を行った。得られた分子については、構造の評価を行った。その結果、b-TIP60 はオリジナルの形状に近い形を維持しており、構造上は設計通りに構築できたことが示唆された。



球状錯体への集積によるペプチド凝縮模倣環境の構築

(東大院工¹・東大 UTIAS²・分子研³) ○渡邊健穂¹、中間貴寛¹、藤田誠^{1,3}

Construction of Peptide Condensate-like Environments by Confinement in Spherical Coordination Cages (¹Grad. School of Engineering, The Univ. of Tokyo, ²UTIAS, The Univ. of Tokyo, ³Inst. for Molecular Science) ○Kenho Watanabe¹, Takahiro Nakama¹, Makoto Fujita^{1,3}

Repeated peptide sequences found in intrinsically disordered proteins are involved in biomolecular condensate formation and other biological processes and thus attract growing interest in revealing their interactions. However, the structural basis remains elusive because it is difficult to precisely assemble such disordered peptides or proteins.

In this work, we constructed peptide assemblies like biomolecular condensates by confining repeated peptides in spherical coordination cages (**Fig. 1**). The metallo-cages^{1,2}, self-assembled from Pd(II) ions and bis(pyridine) ligands, can precisely accumulate proteins and peptides within their well-defined cavity, allowing us to analyze their interactions at high resolution. We encapsulated repeated peptides (Phe-Gly)_n in the cage by condensation with bis(pyridine). NMR analysis of the interaction between the repeated peptides and a protein will be discussed. **Keywords** : Peptides; M₁₂L₂₄ coordination cages; Self-assembly; Proteins; Biomolecular condensates

不定形タンパク質に見られる繰り返しのペプチド配列は、生体分子凝縮体の形成などに関与しており、その相互作用様式に対して関心が高まっている。しかしながら、このような不定形のペプチド・タンパク質を集積した集合体や凝縮体を人工的に精密構築することは難しく、その構造基盤は未だ解明されていない。

本研究では、Pd(II)イオンと配位子の自己集合で形成する球状錯体^{1,2)}に、繰り返しの配列のペプチドを集積することで生体分子凝縮体の模倣環境を構築した(**Fig. 1**)。球状錯体の内径 5 nm の一義空間に内包することで、精密に集積されたペプチドとタンパク質間の相互作用を高分解能で解析できる。フェニルアラニンとグリシンの繰り返しペプチド(Phe-Gly)_nを配位子に縮合してタンパク質と共に球状錯体へ包接した。NMRで錯体内のタンパク質とペプチド間の相互作用を解析した結果を報告する。

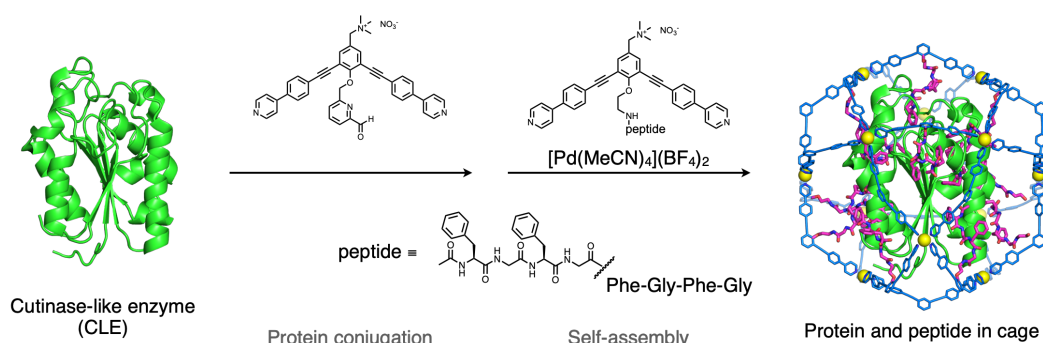


Fig. 1 タンパク質と(Phe-Gly)_n ペプチドの球状錯体への共包接

1) R. Ebihara, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* Accepted, e202419476. 2) T. Nakama, *et al.*, *Chem. Sci.* **2023**, *14*, 2910.

pH 応答的に伸縮するタンパク質集合体の構造解析

(東京科学大学生命理工¹) ○沖澤 敬一¹・伊達 弘貴¹・鱒村 颯太¹・菊池 幸祐¹・上野 隆史¹

Structural analysis of a protein assembly transforming in response to pH (¹*School of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo*) ○Keiichi Okisawa¹, Koki Date¹, Souta Masumura¹, Kosuke Kikuchi¹, Takafumi Ueno¹

Proteins can spontaneously self-assemble into highly ordered structures with unique functions. A protein supramolecule called type 51 refractile body (R-body) reversibly extends and contracts in response to the environmental pH. Upon pH stimuli, the R-body transforms from a rolled morphology with a size of 0.4 μm to a spiral morphology with a length of up to 20 μm (Fig. 1)¹. Due to its quick and reversible transformation at a microscale, R-bodies possess a potential for stimuli-responsive materials. Earlier works suggested that the major components of the R-body are two proteins called Reb A and Reb B². However, their assembly structure remains unknown.

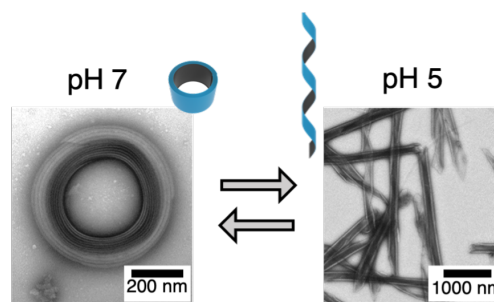


Fig. 1 Electron micrographs of R-bodies in pH 7 and 5¹.

In this work, we constructed truncated mutants to understand the formation mechanism of R-body. Our results indicated that the truncation in Reb A or Reb B significantly changes their morphology and pH-responsiveness. Currently, we are investigating further their structure-function relationships.

Keywords: Protein Assembly, pH-responsiveness, Micro-actuators, Protein Engineering

タンパク質には、自己集合を経て高次の構造を形成し、特異な機能を発現するものがある。タンパク質集合体の1つである51型 refractile body (R-body) は、環境の pH に応答して可逆的に伸縮する。pH が 7 から 5 へ変化すると、R-body は約 1 秒の間にサイズ 0.4 μm のロール構造から長さ 20 μm のらせん構造へと変形する(Fig. 1)¹。高速で可逆的な変形をマイクロメートルスケールで起こすことから、刺激応答性材料としての応用が期待されている。先行研究では、R-body の主要な構成タンパク質が Reb A、Reb B とよばれる2種のタンパク質であることが示唆されている²。しかし、その集合構造は未だに明らかになっていない。

本研究では、R-body の集合構造を明らかにするために、Reb A または Reb B の一部のアミノ酸を欠損させた変異体を作成した。観察の結果、この欠損は R-body に特徴的なロール構造の形成や pH 応答性に著しい影響を及ぼすことが示唆された。現在、R-body の構造と機能の関係をより深く理解するため、実験を進めている。

1. J. K. Polka and P. A. Silver, *ACS Synth. Biol.* **2016**, 5, 303.

2. D. P. Heruth et al. *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 3559.