

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27日(木) 15:55 ~ 17:15 🏢 [A]D501(第3学舎 4号館 [5階] D501)

[[A]D501-2vn] 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー

座長：高橋 剛、西原 達哉

📌 日本語

15:55 ~ 16:05

[[A]D501-2vn-01]

モノマー型細胞内温度センサータンパク質の開発

○ 湊見 昂生¹、築場 彩瑛²、八塚 研治²、清中 茂樹^{2,3} (1. 名古屋大学 工学部、2. 名古屋大学 大学院工学研究科、3. 名古屋大学 未来社会創造機構 量子化学イノベーション研究所)

📌 日本語

16:05 ~ 16:15

[[A]D501-2vn-02]

Tag Pol-3インテインの改変とスプライシング活性の評価

○ 大友 真歩¹、高橋 剛¹ (1. 群馬大学)

📌 日本語

16:15 ~ 16:25

[[A]D501-2vn-03]

標的反応性DNAプローブのビーズ集積を利用した多成分生体分子解析手法の開発

○ 菅原 正人¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学)

16:25 ~ 16:35

休憩

📌 日本語

16:35 ~ 16:45

[[A]D501-2vn-04]

低酸素細胞で効果を示すBNCT用薬剤の設計：クリック反応によるBPAの機能化

○ 小笹 達也¹、鈴木 実²、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青学大院理工、2. 京大複合研)

📌 日本語

16:45 ~ 16:55

[[A]D501-2vn-05]

組織内チオールイメージング、及び組成解析を実現するTLCラベル化剤の開発

○ 菅原 優美佳¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学)

📌 日本語

16:55 ~ 17:05

[[A]D501-2vn-06]

疎水性官能基を持つHoechst誘導体の合成と機能

○ 永澤 侑也¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学)

📌 日本語

17:05 ~ 17:15

[[A]D501-2vn-07]

光切断性蛍光プローブによる多成分酵素活性同時解析手法の構築

○永野 舜也¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学)

モノマー型細胞内温度センサータンパク質の開発

(名大工¹・名大院工²・名大量子イノベ研³)○淤見 昂生¹・築場 彩瑛²・八塚 研治^{1,2}・清中 茂樹^{1,2,3}

Development of a monomeric thermosensor protein in cells

(¹*School of Engineering, Nagoya University*, ²*Graduate School of Engineering, Nagoya University*, ³*Research Institute for Quantum and Chemical Innovation, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University*) ○Koki Omi,¹ Sae Yanaba,² Kenji Yatsuzuka,^{1,2} Shigeki Kiyonaka^{1,2,3}

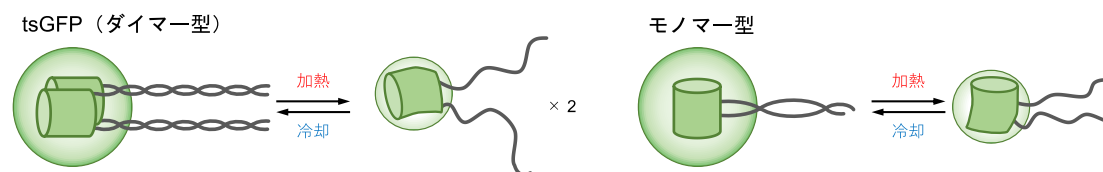
Thermosensor proteins consisting of a temperature-sensitive domain and a fluorescent protein can measure intracellular temperature and visualize heat production by cellular activities. We previously developed tsGFP, a green fluorescent dimeric protein dissociating by elevated temperature, and observed temperature-dependent fluorescence intensity changes in cells. However, tsGFP had some disadvantages as a temperature sensor, such as its large molecular weight due to dimerization.

In this study, we attempted to develop a monomeric thermosensor protein. To induce a temperature-dependent conformational change in the molecule, we fused a green fluorescent protein with the anti-parallel coiled-coil domain, which responds to thermal changes. When the thermosensor protein was transfected into living cells, a change in fluorescence intensity response to temperature change was observed, promising the potential as a practical thermosensor to indicate heat generation at any location within living cells.

Keywords : Thermosensor; Fluorescent protein; coiled-coil; Genetically encoded sensor

温度感受性領域と蛍光タンパク質で構成されるタンパク質温度センサーは細胞内温度を計測可能で、細胞活動による熱産生を可視化できるツールである。我々は以前、昇温に応じて解離する二量体タンパク質を持つ緑色蛍光タンパク質である tsGFP を開発した。tsGFP は細胞内で温度依存的な蛍光強度変化を示したが、ダイマーの形成が必要で、分子量が大きいなど、温度センサーとして欠点が存在した。

そこで、当研究ではモノマー型の温度センサータンパク質の作製を試みた。分子内で温度依存的に構造変化を誘起する必要があるため、逆並行型コイルド-コイルドメインを緑色蛍光タンパク質に融合し、モノマー型温度センサータンパク質を作製した。作製した温度センサータンパク質を生細胞に導入したところ、温度変化に応答した蛍光強度の変化が認められた。今回開発したモノマー型温度センサーは生細胞内のあらゆる場所の熱産生をリアルタイムに可視化できるツールとして期待できる。



Tag Pol-3 インテインの改変とスプライシング活性の評価

(群馬理工¹・群大院理工²) ○大友 真歩¹・高橋 剛²

Engineering of Tag Pol-3 intein and evaluation of their protein splicing activities
(¹*Department of Science and Technology, Gunma University*, ²*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○Maho Otomo¹, Tsuyoshi Takahashi²

Inteins are self-excising protein segments that ligate their flanking sequences in protein splicing. Inteins are classified into 3 classes based on sequence and the mechanism of splicing. Most inteins are members of class 1, and contain three conserved nucleophiles, serine, threonine, or cysteine. Inteins are widely used in a protein engineering field. However, widely used inteins contain Cys residues at position 1 and/or +1, and the reactions must be performed under reducing conditions. In the present study, we have attempted to develop active intein variants based on Tag Pol-3 intein that does not contain the Cys residue, and to evaluate the protein-splicing activity of the engineered inteins. Split β -lactamase is used as the extein, and the protein splicing can be characterized by β -lactamase activity.

Keywords : *intein*

インテインは、その両端に繋がっているポリペプチド鎖（NおよびCエクステイン）を連結させるタンパク質スプライシング活性をもつ酵素様のタンパク質である。インテイン部分が分割された分割型インテインは、2つのポリペプチド鎖を連結させることができるため、タンパク質工学分野で広く利用されている。これまでに、天然型だけでなく、人工的に分割した分割インテインが多数開発されている。これら汎用的に使われているインテインは、主にクラス 1 に分類されるものであり、インテインのスプライシング活性に必要なアミノ酸として、インテイン 1 残基目に Cys または Ser、C エクステイン 1 残基目に Cys、Ser、または Thr をもつ。特に、高いスプライシング活性をもつインテインの多くは、活性残基としての Cys をもっているため、スプライシング反応は、還元的条件下で行う必要がある。一方、抗体に薬物を修飾した抗体薬物複合体（Antibody-drug conjugates; ADC）などは、次世代抗体医薬として期待されているが、分割インテインを用いたタンパク質ラベル化法は、抗体などのジスルフィド結合をもつタンパク質への適用が困難である。本研究では、酸化的条件下でも反応が進行するシステインをもたないインテインの 1 つである、*Thermococcus aggregans* 由来 TagPol-3 インテインに着目し、高いスプライシング活性をもつ Tag Pol-3 インテイン変異体の構築を試みた。

スプライシング活性を簡便に評価するために、エクステインとして、 β ラクタマーゼ (β LA) を用いた。TagPol-3 インテイン遺伝子に、エラーブローン PCR によりランダムに変異を導入し、ライブラリを作製した。TagPol-3 インテインライブラリを大腸菌ペリプラズムで発現させ、アンピシリンを含む培地中で培養を行うことで、スプライシングが進行して活性型 β LA が生成するクローンの選別を試みた。

標的反応性 DNA プローブのビーズ集積を利用した多成分生体分子解析手法の開発

(青山学院大理工) ○菅原 正人・西原 達哉・田邊 一仁

Design of molecular system for multiplex biomolecular analysis using bead accumulation of target-reactive DNA probes (*College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*)

○Masato Sugawara, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

Multiplex biomolecular analysis is useful methodology for disease diagnosis. However, fluorescent molecular probes have significant limitations for the multiplex biomolecular analysis due to overlapping of fluorescence wavelength. To overcome these limitations, we have designed a molecular system using the target-reactive DNA probes and complementally DNA-labeled beads. Upon the reaction with target molecules, the product of DNA probes (product DNA) forms the duplex on the beads in the sequence dependent manner. After the accumulation, we can quantify the product DNA by monitoring the fluorescence signals from each bead to achieve the multiplex biomolecular analysis. To demonstrate the feasibility of this strategy, we designed the target responsive DNA probes for H_2O_2 and nitroreductase (NR). We succeeded in their detection by monitoring fluorescence of the product DNA.

Keywords : DNA encoding; Multiplex analysis

生体試料中の疾患関連生体分子の量は大きく変動することが知られている。そのため、生体分子解析は疾患診断に非常に有用な方法論である。生体分子検出にあたり、蛍光分子プローブは大変有用な方法論であるものの、蛍光スペクトルが重なるため、同時に解析可能な分子の種類は 4~6 個が限界である。そこで本研究では、複数種類の生体分子の同時分析を実現する方法論の構築に取り組んだ。具体的には、蛍光標識した DNA のリン酸部位に対して、標的分子に対する反応点を導入したプローブを用いた分子システムを検討した。具体的なシステムを Figure 1 に示す。標的分子として、主要な活性酸素種の一つである過酸化水素 (H_2O_2)、がん関連酵素であるニトロレダクターゼ (NR) を選択し、標的との反応に伴い反応点が脱離するよう設計した。反応した DNA は、二重鎖形成を惹起し得る。実際に H_2O_2 、および NR に対する反応点として、それぞれフェニルボロン酸、ニトロベンジル基を選択し、リン酸部位に導入した。各標的との反応を実施したところ、いずれの場合も、反応生成物となる DNA 鎖は二重鎖解離温度が上昇した。さらに、反応溶液と相補鎖 DNA を標識したビーズを混和したところ、標的分子存在下でビーズからの蛍光が観察された。すなわち、標的分子を検出できた。

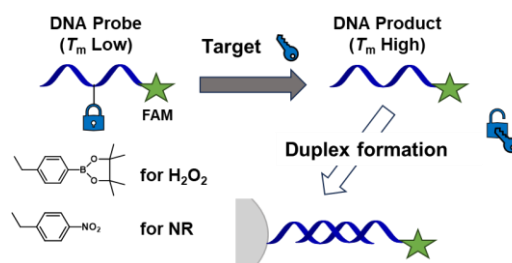


Figure 1. Strategy for the multiplex biomolecular detection in this study.

低酸素細胞で効果を示す BNCT 用薬剤の設計：クリック反応による BPA の機能化

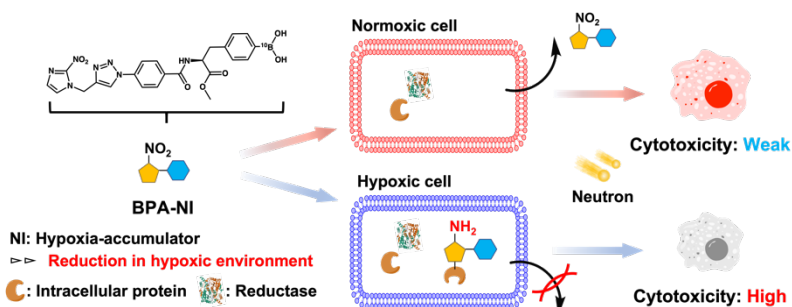
(青学大院理工¹・京大複合研²) ○小笹 達也¹・鈴木 実²・西原 達哉¹・田邊 一仁¹
 Drug design for BNCT against tumor hypoxic cells: functionalization of BPA by Click-Chemistry (¹Aoyama Gakuin University, ²Kyoto Univ.) ○Tatsuya Ozasa,¹ Minoru Suzuki,² Tatsuya Nishihara,¹ Kazuhito Tanabe¹

Hypoxic cells are known to cause cancer malignancy and radioresistance, and therefore, there are increasing demands for hypoxia-targeting drugs. In this study, we designed drugs that can treat hypoxic cells by BNCT. We focused on the nitroimidazole (NI) group, a hypoxic cell-accumulating molecule, and introduced it into BPA, which is well-documented BNCT agent. We prepared ¹⁰B-enriched BPA with NI unit (BPA-NI) by using click-chemistry. In cellular experiments of human tongue cancer cells SAS, BPA-NI significantly enhanced a cell-killing effect against hypoxic SAS cells upon thermal neutron irradiation, while their effect on aerobic SAS cells was limited.

Keywords : Hypoxic cells; Click-chemistry; Boron Neutron Capture Therapy (BNCT)

低酸素細胞は固形がんで特異的に発現し、がんの悪性化や放射線抵抗性等に関連することから、低酸素がん細胞を標的とした薬剤の開発は喫緊の課題である。本研究では、ホウ素原子と熱中性子との間で起こる核反応を利用したホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) による低酸素細胞の治療を可能にする薬剤の開発を進めた。具体的には、低酸素集積性分子であるニトロイミダゾール (NI) 基に着目し、BNCT 用薬剤 BPA を NI に修飾した。NI 基の導入により、低酸素がん細胞に対する蓄積特性を BPA に付与し、低酸素細胞での選択的薬効発現を目指した。NI 基は Huisgen 反応を活用することで BNCT 用薬剤 BPA に修飾し、得られた BPA-NI は NMR および MS スペクトルを用いて同定した。

実際に、BPA-NI を用いた中性子照射による殺細胞効果の検証を行った。BPA-NI を投与したヒト扁平上皮がん細胞 SAS を、各酸素濃度（有酸素：O₂ 21%、低酸素：O₂ 0.1%）で培養し、さらに、熱中性子線を照射した。その結果、有酸素細胞では殺細胞効果に制限がある一方で、低酸素細胞ではその効果が著しく向上した。これは、BPA-NI が低酸素細胞へ選択的に蓄積し、中性子照射下において殺細胞効果を発現したことを示している。



組織内チオールイメージング、及び組成解析を実現する TLC ラベル化剤の開発

(青山学院大理工) ○菅原優美佳・西原達哉・田邊一仁

Thiol imaging and compositional analysis in frozen tissue slice using TLC labelling reagent.
(College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) ○Yumika Sugawara, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

Mass spectrometry imaging (MSI) is powerful tool to image the distribution of small biomolecules. However, it is difficult to analyze the high reactive molecules such as thiol metabolites by using the MSI. Therefore, we attempted to develop a new methodology to enable thiol imaging and compositional analysis in frozen tissue slice. We designed photo cleavable thiol fluorescent labelling reagents for TLC imaging (ptFLAT). Frozen tissue slices are attached to the TLC coated with ptFLAT to give the thiol adduct on the TLC plate. It is possible to image the thiol metabolite distribution by developing with low polar solvent. Furthermore, by irradiating the region of interest with UV light and developing it with a highly polar solvent, it is possible to analyze the thiol composition in the photo-irradiated region.

Keywords : Thiol metabolite; Thin-layer chromatography

近年、組織内小分子の分布解析にあたり、質量分析イメージング (MSI) を用いた方法論に注目が集まっている。しかし、MSI は、測定や解析に時間を要し、高反応性分子解析には困難を伴う。以上を踏まえ、本研究では、組織内チオール代謝物のイメージング、及び組成解析を可能にする新たな方法論の構築を目指し、光解離性蛍光ラベル化剤 (ptFLAT) を設計した。ptFLAT は、リジンをも核構造として、蛍光色素としてメトキシマリンカルボン酸、チオールに対する反応点としてマレイミド、光解離性部位として、オルトニトロベンジルを導入した構造となる。具体的な解析手法を Figure 1 に示す。ptFLAT をコートした TLC に対して、凍結組織切片を貼り付け、組織内代謝物を TLC にトレースする。この際にチオール代謝物は ptFLAT と反応し、高極性の付加体を生成する。従って、低極性溶媒で展開操作を施すことで、組織全体のチオール分子の分布を画像化することが可能となる。さらに、解析部位に対して光照射し高極性溶媒で展開することで、光照射領域内に含まれるチオール組成の解析も可能となる。実際に、食肉用豚レバーに含まれるチオール代謝物イメージング、及びチオール組成解析に成功した。

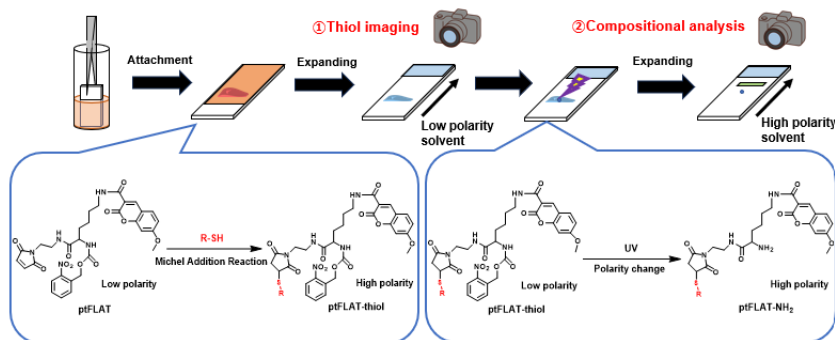


Figure 1. Thiol metabolites imaging and compositional analysis using ptFLAT coated TLC.

疎水性官能基を持つ Hoechst 誘導体の合成と機能

(青学大理工¹) ○永澤 侑也¹・西原 達哉¹・田邊 一仁¹

Preparation of Hoechst derivatives with hydrophobic substituents and their applications

(¹College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) ○Yuya Nagasawa,¹
Tatsuya Nishihara,¹ Kazuhito Tanabe¹

Hoechst is used as a reagent for cell nuclear staining because it binds to DNA and shows fluorescence emission. However, in recent years, various functional molecules that contain the Hoechst skeleton as a DNA binding site have been developed, in addition to its use as a nuclear staining reagent. In this study, we attempted modification of Hoechst derivatives by click reaction to introduce hydrophobic alkyl chain on Hoechst skeleton. We introduced alkyl chain (chain length: 3, 7 or 12) into Hoechst skeleton to prepare Hoe-C₁₂, Hoe-C₇, and Hoe-C₃, respectively. Evaluation of DNA binding properties of the synthesized Hoechst derivatives by fluorescence measurement revealed that all derivatives bound tightly to DNA duplex. We are currently investigating the possibility of complexing long DNA duplex with the Hoechst derivatives for efficient intracellular transport.

Keywords : Hoechst derivatives; Click reaction

Hoechst は DNA に結合し蛍光発光を示すことから、細胞核染色試薬として利用されている。しかし、近年では核染色試薬としての利用にとどまらず、Hoechst 骨格を DNA 結合部位として利用した機能性分子がさまざま開発されている。本研究では、クリック反応を用いた Hoechst 誘導体への官能基修飾を試みた。具体的には、アジド基を有する Hoe-N₃ に対して、異なる長さのアルキル基を有する鎖状アルキン、銅 (I) 触媒存在下で Click 反応により縮合した。これにより、炭素数が 12 個のアルキル基をもつ Hoechst 誘導体 Hoe-C₁₂、7 個の炭素数を持つ Hoe-C₇、3 個の炭素数をもつ Hoe-C₃ を合成した。これら合成した Hoechst 誘導体の DNA 結合評価を、蛍光スペクトルを用いて行ったところ、いずれも DNA 二重鎖に対して強固に結合することが確認できた。

DNA は本来親水性を示すが、疎水基を導入すると両親媒性を示し、水溶液中で細胞に取り込まれやすくなる。今回合成した Hoechst 誘導体の DNA 結合能を活用すると、DNA への疎水性官能基の導入が容易になり、DNA の速やかな細胞内への導入が期待できる。現在は、長鎖 DNA と Hoechst 誘導体を複合化して細胞内に効率的に運搬可能か検討している。

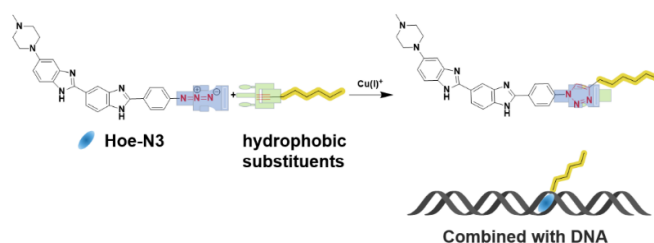


Figure 1. Preparation of Hoechst derivatives with hydrophobic unit and binding with DNA duplex.

光切断性プローブによる多成分酵素活性同時解析手法の構築

(青山学院大理工) ○永野舜也・西原達哉・田邊一仁

Establishment of a methodology to evaluate multicomponent enzyme activities using photo-cleavable fluorescent probes (*College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*)

○Shunya Nagano, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

Recently, an analysis of enzymatic activity has been paid attention for disease diagnosis. However, fluorescence probes have limitation in multicomponent analysis due to overlapping wavelengths. In this study, we designed molecular system using photocleavable fluorescent probes and thin-layer chromatography for the analysis of multiplex enzyme activities. We have employed coumarin-based photocleavable probe library. By corresponding the substrate structure and coumarin derivative, we can monitor the multicomponent enzymatic activity. To demonstrate the feasibility of this enzymatic activity analysis, we prepared esterase responsive probe based on the design strategy. In fact, we succeeded in the detection of esterase activity by using the TLC 2D development.

Keywords : *Fluorescent molecular probe, esterase activities, TLC*

近年、疾患関連酵素が多数見つかっており、これらの酵素活性評価に基づく、疾病診断に注目が集まっている。しかしながら、蛍光分子プローブは多成分の酵素活性評価を指向した場合、蛍光波長の重なりから制限を伴う。そこで本研究では、安価かつ簡便に多成分の酵素活性を同時評価可能にする方法論の確立を目指した。化合物を分離可能な薄層クロマトグラフィー (TLC) と光切断性の蛍光プローブを用いる方法論となる。標的酵素に対する基質構造と光照射後に得られるクマリン誘導体の構造を対応づけ、プローブライブラリーを構築する戦略となる (Figure 1)。具体的な解析手法としては、まず、プローブカクテルを検体に加え、TLC にて1次元展開することで粗く分離する。続いて、光照射を行うことにより、酵素に対応する蛍光色素誘導体を遊離させる。その後、2次元展開し、各 Rf 値に生じる蛍光スポットを解析することで多成分の酵素活性評価が実現する。本研究では、エステラーゼをモデル酵素として選択し、TLC を用いた酵素活性評価の実現可能性を評価した。エステラーゼプローブとして、基質部位にエチルエステル、光切断性蛍光色素として 7-(ジエチルアミノ)-4-(ヒドロキシメチル)クマリンを有する分子を設計し、2段階を経て合成した。次に、エステラーゼの活性評価を行った。その結果、TLC 上に基質、および、生成物に由来する蛍光スポットが酵素存在条件下で確かめられた。本発表では、蛍光分子プローブの合成、酵素反応評価の詳細について、発表する予定である。

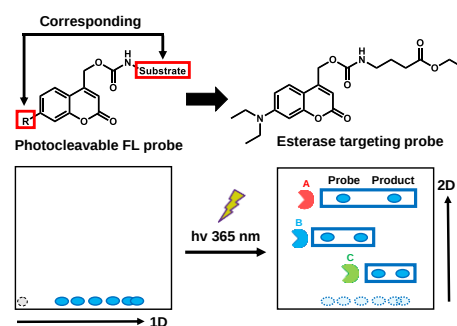


Figure 1 Molecular system using photocleavable fluorescent and TLC for detection of multiplex enzyme activity.