

アカデミックプログラム [ポスター] | 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー：ポスター

📅 2025年3月28日(金) 13:00 ~ 14:30 🏢 ポスター会場B(新関西大学会館北棟 [1階] ホール)

**[[PB]-3pm] 17. 生体機能関連化学・バイオテクノロジー**

🇯🇵 日本語

[[PB]-3pm-01]

小胞体標的型蛋白質フォールディング促進剤の開発

○佐藤 悠平<sup>1</sup>、三神 瑠美<sup>1</sup>、荒井 堅太<sup>1</sup> (1. 東海大)

🇯🇵 日本語

[[PB]-3pm-02]

細胞内滞留性プローブの開発に向けたPhosphonoRhodamine誘導体の開発

○石川 あおい<sup>1</sup>、藤岡 礼任<sup>1</sup>、河谷 稔<sup>1</sup>、橘 棕<sup>2</sup>、浦野 泰照<sup>2</sup>、神谷 真子<sup>1,3</sup> (1. 東京科学大学、2. 東大院薬、3. 自律システム材料学研究センター)

🇯🇵 日本語

[[PB]-3pm-03]

フレキシブルな糖部位を有するC2位置換蛍光性アデノシン誘導体の合成と光学特性

○小倉 隼<sup>1</sup>、安部 優歩<sup>1</sup>、奥 友里乃<sup>1</sup>、齋藤 義雄<sup>1</sup> (1. 日大院工)

🇯🇵 日本語

[[PB]-3pm-04]

非セコステロイド型リガンドを用いたビタミンD受容体PROTACの開発研究

○堤 梨乃<sup>1</sup>、坂本 良太<sup>1</sup>、岡本 侑樹<sup>2</sup>、安田 佳織<sup>2</sup>、榊 利之<sup>2</sup>、寺 正行<sup>1</sup>、長澤 和夫<sup>1</sup> (1. 東農工大院、2. 富山県大)

🇯🇵 日本語

[[PB]-3pm-05]

側根成長阻害あるいは促進作用を示すIBA誘導体の構造活性相関と作用機序の解明に向けた検討

○渡邊 愛美<sup>1</sup>、伊部 公太<sup>1</sup>、中川 理絵<sup>1</sup>、岡本 専太郎<sup>1</sup> (1. 神奈川大学)

🇯🇵 日本語

[[PB]-3pm-06]

新規アサイクリックESFヌクレオシドの設計と光学特性

○片山 聖己<sup>1</sup>、安部 優歩<sup>1</sup>、伊藤 慶一郎<sup>1</sup>、伊藤 駿佑<sup>2</sup>、齋藤 義雄<sup>1,2</sup> (1. 日大院工、2. 日大工)

🇯🇵 日本語

[[PB]-3pm-07]

可逆的酸化還元サイクルのイメージングが可能なニコチンアミドを母核とした新規蛍光プローブの開発

○竹山 裕美子<sup>1</sup>、濱口 尚斗<sup>1</sup>、中村 光<sup>1</sup>、太田 哲夫<sup>1</sup>、大江 洋平<sup>1</sup> (1. 同志社大学)

🇯🇵 日本語

[[PB]-3pm-08]

プラズモニクチップ上の温度応答性ハイドロゲルによる非特異吸着抑制

○藤田 祥吾<sup>1</sup>、Dario Mor<sup>2</sup>、名和 靖矩<sup>1</sup>、Jakub Dostalek<sup>2</sup>、田和 圭子<sup>1</sup> (1. 関西学院大学、2. チェコ科学アカデミー)

🇯🇵 日本語

[[PB]-3pm-09]

ホウ素クラスターとカチオン性ポリマーに基づくタンパク質被覆アモルファスマイクロ粒子を用いたタンパク質の細胞質送達

○牧田 佳真<sup>1</sup>、平井 悠哉<sup>1</sup>、藤原 真一<sup>1</sup> (1. 大阪歯科大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-10]

ガルバニ電位を利用した膜電位感受性色素の評価

○中田 みなみ<sup>1</sup>、六本木 誠<sup>2</sup>、大庭 亨<sup>3</sup> (1. 宇都宮大学大学院、2. 宇都宮大学機器分析センター、3. 宇都宮大学大学院物質環境化学プログラム)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-100]

単一波長励起蛍光スイッチ (MEFS) に基づく一分子追跡法を用いた脂質膜中ゲスト分子の拡散挙動計測

○吉原 行亮<sup>1</sup>、Bhagya Lakshmi Sankaramangalam Balachandran<sup>1</sup>、天津 祐樹<sup>1</sup>、渡邊 望美<sup>1</sup>、馬越大<sup>1</sup>、伊都 将司<sup>1</sup> (1. 大阪大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-101]

高分子型遷移金属錯体の陽イオン性糖鎖高分子とのブロックコポリマー化による細胞内膜通過機構の改善と抗がん活性の増強

○阿南 和希<sup>1</sup>、平田 鷹輔<sup>2</sup>、青木 元汰<sup>2</sup>、大塚 英典<sup>1,2</sup> (1. 東京理大理応化、2. 東京理大院理研化学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-102]

単一生細胞内からの標的オルガネラ抽出を目指した銀ナノワイヤー表面上分子修飾

○寺田 涼真<sup>1,3</sup>、立石 友紀<sup>2,3</sup>、古川 修平<sup>2,3</sup>、猪瀬 朋子<sup>2,3,4,5</sup> (1. 京大工、2. 京大院工、3. 京大アイセムス、4. 京大白眉センター、5. JSTさきがけ)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-103]

毛髪用ブリーチ剤におけるアルカリ臭低減の検討

○吉井 舞耶<sup>1</sup>、佐藤 聡太郎<sup>2</sup>、堀田 弘樹<sup>2,3</sup>、辻野 義雄<sup>3</sup>、鷲家 真吾<sup>4</sup> (1. 東洋大学附属姫路高等学校、2. 神戸大学大学院海事科学研究科、3. 神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科、4. 岡本株式会社)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-104]

ホスファターゼによる脱リン酸化反応によってゾル転移する過渡的ハイドロゲルの創製

○関谷 涼<sup>1</sup>、仲本 正彦<sup>1</sup>、松崎 典弥<sup>1</sup> (1. 阪大院工)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-105]

火薬成分2,4-dinitrotoluene によって蛍光色変化する微生物バイオセンサーを用いた埋設地雷の検出

○西村 快<sup>1</sup>、吉澤 太我<sup>1</sup>、秋元 卓央<sup>1</sup> (1. 東京工科大学 応用生物)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-106]

循環置換蛍光タンパク質を利用した細胞内ATPを指標とするBODセンサーの開発

○岸田 涼佑<sup>1</sup>、菅野 裕斗<sup>1</sup>、秋元 卓央<sup>1</sup> (1. 東京工科大学・応用生物)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-107]

含ピレンジオール類を用いたJames-bull法によるポリアミン類の分析

○村上 綺更<sup>1</sup>、濱口 尚斗<sup>1</sup>、中村 光<sup>1</sup>、太田 哲男<sup>1</sup>、大江 洋平<sup>1</sup> (1. 同志社大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-108]

分裂酵母のグルコースシグナル伝達経路を用いたドーパミンバイオセンサーの検出

○森本 佳月<sup>1</sup>、長田 俊哉<sup>1</sup> (1. 東京科学大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-109]

高分子ミセルを用いた光線力学療法

○松本 大知<sup>1</sup>、八尾 颯斗<sup>2</sup>、梗間 由幸<sup>3</sup>、Ping-Shan Lai<sup>4</sup> (1. 国立米子工業高等専門学校 物質工学科、2. 国立米子工業高等専門学校 物質工学専攻科、3. 国立米子工業高等専門学校 総合工学科 化学・バイオ部門、4. 台湾中興大学 理学部 化学科)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-11]

プラズモニクチップ上に光化学反応で結合したビオチンによるCy5-ストレプトアビジン検出

○谷口 萌衣<sup>1</sup>、浅野 恭平<sup>1</sup>、名和 靖矩<sup>1</sup>、田中 睦生<sup>2</sup>、田和 圭子<sup>1</sup> (1. 関西学院大学、2. 埼玉工業大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-110]

ポリグリセロール修飾酸化グラフェンを用いたナノメディシンの開発と抗がん剤への応用

○吉岡 瑠那<sup>1</sup>、仁科 勇太<sup>1</sup> (1. 岡山大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-111]

β-カロテンの化学酸化によるアポカロテノイド類の生成とクロマトグラフィー分析

○森田 壮<sup>1</sup>、浦上 千藍紗<sup>1</sup>、橋本 秀樹<sup>1</sup> (1. 関西学院大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-112]

両親媒性分子による疎水性空間の構築と機能開拓

○松本 尚子<sup>1</sup>、佐藤 浩平<sup>1</sup> (1. 関西学院大学)

◆ 英語

[[PB]-3pm-12]

光誘起電子移動型電位感受性色素の開発

○齊藤 聡志<sup>1</sup>、六本木 誠<sup>2</sup>、大庭 亨<sup>1</sup> (1. 宇都宮大学大学院、2. 宇都宮大学機器分析センター)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-13]

極性官能基をもつジアリールエテン誘導体の光誘起細胞毒性

○丸山 徳一<sup>1</sup>、須丸 公雄<sup>2</sup>、森下 加奈<sup>2</sup>、内田 欣吾<sup>1</sup> (1. 龍谷大学、2. 産業技術総合研究所(AIST))

◆ 日本語

[[PB]-3pm-14]

EGFR変異体を標的とした膜局在性ゲフィチニブの合成と阻害活性評価

○三田村 啓史<sup>1</sup>、筒井 啓太<sup>1</sup>、深谷 陽子<sup>1</sup>、築地 真也<sup>1</sup> (1. 名工大院工)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-15]

## 薬剤共有結合型ポリオン液体DDS製剤の開発

○熊田 陸人<sup>1</sup>、西口 宏泰<sup>2</sup>、北岡 賢<sup>3</sup>、信岡 かおる<sup>4</sup> (1. 大分大学大学院工学研究科、2. 大分大学研究マネジメント機構、3. 近畿大学工学部、4. 大分大学理工学部)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-16]

## タンパク質内近接駆動型反応に基づく光薬理学リガンドの開発

○藤原 壮汰<sup>1</sup>、瀬川 友香<sup>1</sup>、松尾 和哉<sup>1</sup>、和久 友則<sup>1</sup>、小堀 哲生<sup>1</sup> (1. 京工繊大)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-17]

## 立体反発誘導型ねじれ型分子内電荷移動(sr-TICT)に基づく蛍光プローブの開発

○杉本 瑞樹<sup>1</sup>、佐々木 栄太<sup>1</sup>、大野 久史<sup>1</sup>、花岡 健二郎<sup>1</sup> (1. 慶大院薬)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-18]

## 光に応答するチオールスカベンジャーの開発

○佐野 弘樹<sup>1</sup>、小場 一平<sup>1</sup>、松尾 和哉<sup>1</sup>、和久 友則<sup>1</sup>、小堀 哲生<sup>1</sup> (1. 京工繊大)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-19]

## アゾベンゼン誘導体の光異性化によるベシクルの形態変化

○塩路 幸生<sup>1</sup>、笠井 香澄<sup>1</sup>、出井 萌葉<sup>1</sup>、石原 弘哲<sup>1</sup>、岩下 秀文<sup>1</sup> (1. 福岡大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-20]

## イオン性の置換基を有するクロロフィル誘導体の合成と物性

○角田 優花<sup>1</sup>、仲村 明莉<sup>1</sup>、宮武 智弘<sup>1</sup> (1. 龍谷大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-21]

## 細胞毒性をもつフォトクロミックジアリールエテンへの水溶性の付与

○神波 碧<sup>1</sup>、丸山 徳一<sup>1</sup>、須丸 公雄<sup>2</sup>、森下 加奈<sup>2</sup>、内田 欣吾<sup>1</sup> (1. 龍谷大学、2. 産総研)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-22]

## オルトフェニレンジアミンで架橋されたクロロフィル二量体の合成と物性

○妹背 帆高<sup>1</sup>、宮武 智弘<sup>1</sup> (1. 龍谷大)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-23]

## 可逆的に光制御できるAurora kinase阻害剤の開発

○宮城 喜美<sup>1</sup>、松尾 和哉<sup>1</sup>、和久 友則<sup>1</sup>、小堀 哲生<sup>1</sup> (1. 京工繊大)

◆ 英語

[[PB]-3pm-24]

PYP-tagとJF<sub>635</sub>を用いた近赤外蛍光カルシウムイオン化学遺伝学センサーの開発

○斉藤 佑季<sup>1</sup>、柳町 拓海<sup>1</sup>、寺井 琢也<sup>1</sup>、Robert Campbell<sup>1</sup> (1. 東大院理)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-25]

## アゾベンゼン修飾ポリマーとシクロデキストリン修飾タンパク質による超分子形成

○能美 佳穂<sup>1</sup>、小林 裕一郎<sup>1</sup>、山口 浩靖<sup>1</sup> (1. 阪大院理)

---

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-26]

コウジ酸をベースとしたタンパク修飾用ケージド化合物の開発

○東 秀紀<sup>1</sup>、永岡 真至<sup>1</sup>、長崎 健<sup>1</sup> (1. 大阪公立大学)

---

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-27]

ペプトイドを基にした新規人工核酸の開発とその応用研究

○横尾 英知<sup>1</sup>、武田 紗和<sup>1</sup>、出水 庸介<sup>1</sup> (1. 国立衛研)

---

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-28]

蛍光性を有するトリフェニルメタン誘導体を用いた細胞内グアニン四重鎖の検出

○奥村 大地<sup>1</sup>、宇田 亮子<sup>1</sup> (1. 奈良工業高等専門学校)

---

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-29]

切断されたDNAの液滴内修復能の解析

○田立 ののか<sup>1</sup>、嶋 亮汰<sup>2</sup>、千田 隆誠<sup>3</sup>、田代 竜<sup>4</sup>、大吉 崇文<sup>1,3,5,6</sup> (1. 静岡大学理学部化学科、2. 沼津高等専門学校、3. 静岡大学大学院総合科学技術研究科、4. 鈴鹿医療科学大学薬学部、5. 静岡大学創造科学技術大学院、6. 静岡大学グリーン科学技術研究所)

---

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-30]

アルキル化分子を用いた細胞内RNA高次構造解析のための技術開発

○畑山 妃那<sup>1,2</sup>、鬼塚 和光<sup>1,2</sup>、Ping-Yun Lan<sup>1,2</sup>、Yutong Chen<sup>1,2</sup>、宮下 映見<sup>3,4</sup>、小松 馨<sup>3</sup>、齊藤 博英<sup>4</sup>、永次 史<sup>1,2</sup> (1. 東北大学多元物質科学研究所、2. 東北大学理学研究科化学専攻、3. xFOREST Therapeutics、4. 京都大学iPS細胞研究所 CiRA (サイラ))

---

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-31]

可逆的光架橋を利用したDNA鎖中プリン塩基への高速光クロスリンク

○藤岡 啓<sup>1</sup>、平原 令偉<sup>1</sup>、藤本 健造<sup>1</sup> (1. 北陸先端科学技術大学院大学)

---

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-32]

可逆的光架橋を利用したDNA鎖中プリン塩基への高速光クロスリンク

○武貞 龍<sup>1</sup>、小田井 柊也<sup>1</sup>、藤本 健造<sup>1</sup> (1. 北陸先端科学技術大学院大学)

---

## ◆ 英語

[[PB]-3pm-33]

Development of pH-dependent novel RNA-binding molecules with light-up property

○Dylan Christian Thomas<sup>1,2</sup>、Kazumitsu Onizuka<sup>1,2</sup>、Ryosuke Nagasawa<sup>1,2</sup>、Kosuke Tsuzuki<sup>1,2</sup>、Fumi Nagatsugi<sup>1,2</sup> (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials (IMRAM), 2. Graduate School of Science, Tohoku University)

---

## ◆ 英語

[[PB]-3pm-34]

Interstrand crosslinking of oligonucleotides functionalized with 2'-deoxythioguanosines

○Jamila Abbas Osman<sup>1,2</sup>, Kazumitsu Onizuka<sup>1,2</sup>, Yuuhei Yamano<sup>1</sup>, Fumi Nagatsugi<sup>1,2</sup> (1. Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, 2. Graduate School of Science, Tohoku University)

---

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-35]

光応答性人工核酸を用いた200bp以上の長鎖オリゴ核酸へのDNA 2本鎖侵入法開発

○YANG RUI<sup>1</sup>、Halili Zumila<sup>1</sup>、藤本 健造<sup>1</sup> (1. 北陸先端科学技術大学院)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-36]

pH変化によるアデノシン誘導体の塩基対形成特性に関する研究

○小野 颯大<sup>1</sup>、金澤 優多<sup>1</sup>、齋藤 義雄<sup>1</sup> (1. 日大院工)

## ◆ 英語

[[PB]-3pm-37]

脱リン酸化酵素の中間体識別DNAアプタマーの開発

○鈴木 由真<sup>1</sup>、原 侑希<sup>1</sup>、古川 和広<sup>1</sup>、Nunzio Bottini<sup>2</sup>、中馬 吉郎<sup>1</sup> (1. 新潟大学、2. カリフォルニア大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-38]

19Fを含む可視光クロスリンカーの開発と核酸検出への展開

○野田 達志<sup>1</sup> (1. 北陸先端科学技術大学院大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-39]

低酸素応答性官能基を備えた人工核酸塩基の合成と機能開拓

○落合 悠帆<sup>1</sup>、西原 達哉<sup>1</sup>、田邊 一仁<sup>1</sup> (1. 青山学院大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-40]

ペプチド核酸とプローブを利用した5-メチルシトシンの新規検出法の開発

○大池 美琴<sup>1</sup>、須磨岡 淳<sup>1</sup>、吉田 亘<sup>1</sup>、荒川 貴博<sup>1</sup> (1. 東京工科大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-41]

酸化損傷DNA切断を指向した求核性二級アミン導入オリゴDNAの合成と評価

○根本 壮<sup>1</sup>、金森 功吏<sup>1</sup>、湯浅 英哉<sup>1</sup> (1. 東京科学大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-42]

標的細胞へのDDSを目指したASOへの低分子リガンド導入法の開発

○有江 嶺美<sup>1</sup>、島村 大輝<sup>1</sup>、宮内 彩<sup>2</sup>、金山 朱里<sup>2</sup>、村上 英太郎<sup>1</sup>、清尾 康志<sup>1</sup>、正木 慶昭<sup>1</sup> (1. 東京科学大学大学院生命理工学院、2. 昭和大学医学部生化学講座)

## ◆ 英語

[[PB]-3pm-43]

潜在的ウォーヘッドを持つDNA型共有結合体の無サイクル選択

○李 朝会<sup>1</sup>、ヤング ジェイ<sup>2</sup>、乗原 正靖<sup>3</sup>、瀧 真清<sup>1</sup> (1. 電気通信大学、2. ウィスコンシン大学、3. 日本大学)

## ◆ 英語

[[PB]-3pm-44]

G4形成DNAアプタマーを用いたEGFR標的がん治療法の開発

○原 侑希<sup>1</sup>、萩原 秀隆<sup>1</sup>、小林 透也<sup>1</sup>、水沼 正昂<sup>1</sup>、古川 和広<sup>1</sup>、中馬 吉郎<sup>1</sup> (1. 新潟大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-45]

double-duplex invasion の高効率を目指したγ-pcPNAの合成

○岩井 蓮<sup>1</sup>、須磨岡 淳<sup>1</sup> (1. 東京工科大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-46]

酵素反応を利用した光異性化分子のDNA位置特異的導入技術の開発

○今井 さと<sup>1</sup>、中村 光伸<sup>1</sup>、高田 忠雄<sup>1</sup> (1. 兵庫県立大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-47]

DNA骨格を基盤としたマルチピレン集積体の構築と発光特性評価

○宮地 祐衣<sup>1</sup>、中村 光伸<sup>1</sup>、高田 忠雄<sup>1</sup> (1. 兵庫県立大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-48]

β-ガラクトシダーゼによって活性化されるプロドラッグ型オリゴヌクレオチドの合成と性質

宮地 健人<sup>1</sup>、○竹内 啓太<sup>1</sup>、清尾 康志<sup>1</sup> (1. 東京科学大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-49]

新規リン原子導入ピレンの合成とその蛍光特性およびDNAへの導入

○若狭 右京<sup>1</sup>、森口 朋尚<sup>1</sup> (1. 群馬大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-50]

π共役を拡張した3脚型キノン-シアニン色素の合成と核酸検出への応用

○坂本 隆<sup>1</sup> (1. 和歌山大)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-51]

非ヌクレオチド骨格を導入したGalNAc修飾デコイ核酸の合成

○茂木 祐太<sup>1</sup>、石井 希実<sup>1</sup>、松尾 一郎<sup>1</sup>、森口 朋尚<sup>1</sup> (1. 群馬大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-52]

2'水酸基にスルホネート型修飾を有する 5-メチルウリジン誘導体を含むオリゴヌクレオチドの合成と性質

○大石 健智<sup>1</sup>、瀧川 駿太郎<sup>2</sup>、友利 貴人<sup>2</sup>、村上 英太郎<sup>2</sup>、正木 慶昭<sup>2</sup>、清尾 康志<sup>2</sup> (1. 東京科学大学生命理工学院、2. 東京科学大学大学院生命理工学院)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-53]

核酸を光化学修飾するための光触媒導入型オリゴDNAプローブの開発

○山野 雄平<sup>1</sup>、鬼塚 和光<sup>1,2</sup>、佐藤 伸一<sup>3</sup>、永次 史<sup>1,2</sup> (1. 東北大多元研、2. 東北大院理、3. 東北大学際研)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-54]

ニトロベンジル基で修飾した人工核酸の合成と低酸素細胞集積特性

○佐藤 瞭<sup>1</sup>、前原 大悟、西原 達哉<sup>1</sup>、田邊 一仁<sup>1</sup> (1. 青山学院大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-55]

光増感剤修飾オリゴ核酸の細胞取り込みと光ノックダウン効果の評価

○吉田 七唯<sup>1</sup>、金森 功吏<sup>1</sup>、金子 翔大<sup>1</sup>、小倉 俊一郎<sup>1</sup>、湯浅 英哉<sup>1</sup> (1. 東京科学大)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-56]

固相合成を用いた長鎖ヌクレオペプチドの合成

○松本 衣理<sup>1</sup>、福島 由乃<sup>1</sup>、森口 朋尚<sup>1</sup> (1. 群馬大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-57]

細胞内で切断されるジスルフィド側鎖を有する核酸医薬の開発

○飯塚 健太<sup>1</sup>、見目 達哉<sup>1</sup>、藤原 章司<sup>1</sup>、小野 晶<sup>1</sup> (1. 神奈川大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-58]

抗CSVアプタマーを介した腫瘍細胞のシグナル増幅型検出

○津久井 瑞貴<sup>1</sup>、森 萌音<sup>1</sup>、北村 裕介<sup>1</sup>、中島 雄太<sup>1</sup>、岩槻 政晃<sup>2</sup>、熊本 清太郎<sup>3</sup>、安田 敬一郎<sup>3</sup>、勝田 陽介<sup>1</sup>、中西 義孝<sup>1</sup>、井原 敏博<sup>1</sup> (1. 熊大院先端、2. 熊大院生命、3. (株) オジックテクノロジーズ)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-59]

ブランチ型自己犠牲リンカーで核酸塩基間を架橋したチミジンダイマーの合成と性質

○羽生 愛深<sup>1</sup>、宮地 健人<sup>1</sup>、清尾 康志<sup>1</sup> (1. 東京科学大学生命理工学院)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-60]

リパーゼを用いた高エナンチオ選択的アセチル化による光学活性エポキシ化ジヒドロゼルンボールの合成と、ドッキングシミュレーションを用いた選択性の解明

○高橋 亮大<sup>1</sup>、寺田 百合香<sup>1</sup>、川村 彩夏<sup>1</sup>、平岩 和沙<sup>1</sup>、山本 智恵子<sup>1</sup>、辻本 早希<sup>2</sup>、平本 梨花子<sup>1</sup>、渡部 朋子<sup>1</sup>、藤原 智香子<sup>2</sup>、河合 あかね<sup>2</sup>、柏崎 玄伍<sup>1</sup>、河合 靖<sup>3</sup>、中村 薫<sup>4</sup>、山中 理央<sup>5</sup>、山下 光明<sup>1,2</sup>、北山 隆<sup>1,2</sup> (1. 近畿大院農、2. 近畿大農、3. 長浜バイオ、4. 独立研究、5. 姫路獨協大)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-61]

深共晶溶媒-水系でのリパーゼ触媒Mannich反応

○永本 泰斗<sup>1</sup>、大西 弘記<sup>2</sup>、小島 秀夫<sup>1</sup> (1. 大阪公立大学、2. 大阪府立大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-62]

酸化的フォールディングを促進するシクロデキストリン接合型ジセレニド化合物の開発

○岩田 悠希<sup>1</sup>、荒井 堅太<sup>1</sup> (1. 東海大)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-63]

## X線結晶構造に基づくヒスチジン脱炭酸酵素の触媒ループの役割

○小森 博文<sup>1</sup>、新田 陽子<sup>2</sup> (1. 香川大学、2. お茶の水女子大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-64]

細胞認識部位含有ペプチドによる金ナノロッドの修飾と細胞毒性評価・抗ガン剤の担持能評価

○山岡 湖ノ波<sup>1</sup>、今井 崇人<sup>1</sup>、浅野 昌弘<sup>1</sup>、富崎 欣也<sup>1</sup> (1. 龍谷大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-65]

金属触媒によるコラーゲンモデルペプチドの選択的水酸化の検討

○大藤 駿<sup>1</sup>、丸谷 晃弘<sup>1</sup>、大洞 康嗣<sup>1</sup>、平野 義明<sup>1</sup> (1. 関西大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-66]

DNAアプタマーを標的としたVHH抗体の試験管内選択

○轟 翔太<sup>1</sup> (1. 埼玉大学大学院)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-67]

細胞内送達機能を有するペプチド修飾金ナノロッドの合成およびペプチド修飾金ナノロッドの光熱療法への応用

○安 修央<sup>1</sup>、中村 翔也<sup>1</sup>、藤本 翔也<sup>1</sup>、今井 崇人<sup>1</sup>、山崎 正幸<sup>3,2</sup>、富崎 欣也<sup>1,2</sup> (1. 龍谷大学大学院 理工学研究科 物質化学専攻、2. 龍谷大学 革新的材料・プロセス研究センター、3. 龍谷大学 農学部 食品栄養学科)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-68]

ポリスチレン系固相酸化還元触媒による酸化的フォールディングの促進

○青山 ゆうり<sup>1</sup>、西沢 優也<sup>1</sup>、横瀬 颯人<sup>1</sup>、岡村 陽介<sup>1</sup>、荒井 堅太<sup>1</sup> (1. 東海大)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-69]

ヒトコラーゲンプロリル4-ヒドロキシラーゼの触媒ドメインの立体構造変化に関する分子動力学的研究

○福島 和明<sup>1</sup>、江崎 啓祥<sup>1</sup> (1. 兵庫医科大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-70]

N-メチルアミノ酸を含むペプチドと核移行シグナルペプチドを鋳型に用いた金ナノリボンの合成と光熱変換特性評価

○渡邊 琉気<sup>1</sup>、安 修央<sup>1</sup>、今井 崇人<sup>1</sup>、富崎 欣也<sup>1</sup> (1. 龍谷大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-71]

ミトコンドリア移行シグナルペプチド誘導体を用いたがん特異的作用性ペプチドの合成と特性評価

○齋田 颯心<sup>1</sup>、山崎 正幸<sup>1</sup>、富崎 欣也<sup>1</sup> (1. 龍谷大学)

◆ 日本語

[[PB]-3pm-72]

光増感剤と組換え大腸菌細胞との複合触媒系による光水素生産

○本田 裕樹<sup>1</sup>、丸山 季穂<sup>1</sup>、鈴木 彩純<sup>1</sup>、藤井 浩<sup>1</sup> (1. 奈良女子大)

---

◆ 英語

[[PB]-3pm-73]

グリセロール-3-リン酸を標的とした蛍光バイオセンサーの開発

○松村 悠聖<sup>1</sup>、Fu Chai、寺井 琢也<sup>1</sup>、Robert Campbell<sup>1</sup> (1. 東大院理)

---

◆ 日本語

[[PB]-3pm-74]

無機半導体光アノードと組換え大腸菌全細胞を用いたバイオカソードによる光電気化学的水素生産

本田 裕樹<sup>1</sup>、○濱川 怜那<sup>1</sup>、結城 里沙<sup>1</sup>、藤井 浩<sup>1</sup> (1. 奈良女子大)

---

◆ 日本語

[[PB]-3pm-75]

カロテノイド生合成の多様化を指向したヘム依存性酵素によるカルベン転移反応の検討

○村上 司<sup>1</sup>、加藤 俊介<sup>1</sup>、古林 真衣子<sup>2</sup>、林 高史<sup>1</sup> (1. 大阪大学、2. 産総研)

---

◆ 日本語

[[PB]-3pm-76]

出芽酵母に対する低重合度ポリ( $\epsilon$ -L-リシン)の抗真菌作用機構の解析

○竹原 宗範<sup>1</sup>、谷村 雨音<sup>1</sup>、田中 航輝<sup>1</sup>、新本 晶<sup>1</sup>、井上 善晴<sup>2</sup> (1. 滋賀県大、2. 京大)

---

◆ 日本語

[[PB]-3pm-77]

光応答性高分子による自己集合性ペプチドナノファイバーのバンドル化制御

○秋元 翔太<sup>1</sup>、内田 紀之<sup>1</sup>、村岡 貴博<sup>1,2</sup> (1. 東京農工大学、2. 神奈川県立産業技術総合研究所)

---

◆ 日本語

[[PB]-3pm-78]

統計解析と分子記述子を用いたペプチド配列とナノポアの会合数との相関の解明

○小林 もえ<sup>1</sup>、栢森 史浩<sup>1</sup>、寺尾 泰晟<sup>1</sup>、彭 祖癸<sup>2</sup>、川村 出<sup>3</sup>、川野 竜司<sup>2</sup>、臼井 健二<sup>1</sup> (1. 甲南大、2. 東京農工大工、3. 横浜国立大工)

---

◆ 日本語

[[PB]-3pm-79]

遷移金属錯体の高分子効果による抗がん活性の増強と免疫応答を抑制した腫瘍へのデリバリー法の検討

○興梠 雅朋<sup>1</sup>、平田 鷹輔<sup>2</sup>、青木 元汰<sup>2</sup>、大塚 英典<sup>1,2</sup> (1. 東京理大理応化、2. 東京理大院理研化学)

---

◆ 日本語

[[PB]-3pm-80]

ミトコンドリア移行シグナルペプチドを模倣した屈曲構造を有する両親媒性ペプチドの合成と特性評価

○宮崎 翔大<sup>1</sup>、富崎 欣也<sup>1</sup> (1. 龍谷大学)

---

◆ 日本語

[[PB]-3pm-81]

SARS-CoV-2のRBDおよび受容体ACE2を同時に分解する2機能抗体酵素の化学的性質と感染抑制作用

○八尋 隆明<sup>1,6</sup>、関 未来<sup>2</sup>、辻田 萌<sup>2</sup>、田口 博明<sup>3</sup>、宇田 泰三<sup>1,4</sup>、一二三 恵美<sup>5,6</sup> (1. 大分大・医、2. 大分大・院工、3. 鈴鹿医療大・薬、4. 九州先端研、5. 大分大・研究マネジメント機構、6. 大分大・グ

## ローカル感染研)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-82]

アンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するトリペプチドの機械学習による予測と検証

○田中 瑞穂<sup>1</sup>、畠中 登志也<sup>2</sup>、藤本 雄樹<sup>1</sup>、加藤 珠樹<sup>1</sup> (1. 九州工業大学、2. バイタルリソース応用研究所)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-83]

N末端修飾試薬1H-1,2,3-トリアゾールカルボアルデヒド誘導体を用いたキトサナーゼ固定化レジンの調製と酵素活性評価

○相内 優里<sup>1</sup>、小野田 晃<sup>1,2</sup>、小島 摩利子<sup>2</sup>、Ronny Martinez<sup>3</sup> (1. 北大院環境科学、2. 北大院地球環境科学、3. ラ・セレナ大食品工学部)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-84]

分子動力学シミュレーションによる脂質フリッパーゼMurJの機能サイクルにおけるイオンの役割

○村田 景菜<sup>1</sup>、森 貴治<sup>1</sup> (1. 東京理科大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-85]

アルコールのリパーゼ触媒ガロイル化

○長谷 千波矢<sup>1</sup>、大西 弘記<sup>1</sup>、大高 廉士郎<sup>2</sup>、小島 秀夫<sup>2</sup> (1. 大阪府立大学、2. 大阪公立大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-86]

機械学習によるアンジオテンシンI変換酵素阻害活性を有するトリペプチドの予測精度向上へのアプローチ

○西 祐一<sup>1</sup>、田中 瑞穂<sup>1</sup>、畠中 登志也<sup>2</sup>、加藤 珠樹<sup>1</sup> (1. 九工大、2. バイタルリソース応用研究所)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-87]

疎水性枝部を有する酸化的folding触媒 dendrimer の開発

○岩本 駿平<sup>1</sup>、戸羽 遥楽<sup>1</sup>、荒井 堅太<sup>1</sup> (1. 東海大)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-88]

オレンジカロテノイドタンパク質の光反応におけるN末端ヘリックスの重要性

○渡嘉敷 直志<sup>1</sup>、大畑 貴聖<sup>1</sup>、床次 俊郎<sup>2</sup>、中曽根 祐介<sup>1</sup>、寺嶋 正秀<sup>1</sup> (1. 京大院・理、2. 学習院大・理)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-89]

ペプチドの線維形成に関する実測データから得られる主成分得点と分子記述子の相関を用いた毒性配列予測

○寺尾 泰晟<sup>1</sup>、小林 もえ<sup>1</sup>、武川 公<sup>2</sup>、梅谷 智弘<sup>1</sup>、栢森 史浩<sup>1</sup>、臼井 健二<sup>1</sup> (1. 甲南大学、2. 神戸大院医)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-90]

マイクロ波照射による細胞内小器官移行性ペプチドのミトコンドリア取り込み効率の向上

○飯屋 拓斗<sup>1</sup>、平田 桃<sup>1</sup>、中西 伸浩<sup>2,3,4</sup>、栢森 史浩<sup>1,4</sup>、臼井 健二<sup>1,3,4</sup> (1. 甲南大学、2. 株式会社ディーエスピーリサーチ、3. Beyond5G 寄附講座、4. 非電離放射線生体環境総合研究所)

---

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-91]

ペプチド添加による血清アミロイドAのミスフォールディングの抑制

○長尾 大輝<sup>1</sup>、平松 巧<sup>1</sup>、井手 水紀<sup>1</sup>、佐伯 政俊<sup>1</sup> (1. 山口東理大)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-92]

イクオリンの生物発光過程についての理論的研究

○安東 智大<sup>1</sup>、林 重彦<sup>1</sup>、中津 亨<sup>2</sup>、船橋 俊也<sup>3</sup> (1. 京大院理、2. 和歌山県立医大、3. 京大院薬)

## ◆ 英語

[[PB]-3pm-93]

異なる冷却条件で調製したγ線照射ゼラチンゲルの力学的物性の違い

○原 正之<sup>1</sup>、森 英樹<sup>1</sup> (1. 大阪公立大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-94]

ダンシル基を持つ蛍光グルコースの合成

○BADA RONGGUI<sup>1</sup>、鳥居 朔弥<sup>2</sup>、柳田 滯<sup>1</sup>、上野 裕則<sup>2</sup>、中野 博文<sup>2</sup> (1. 愛知教育大学 大学院 教育学研究科、2. 愛知教育大学)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-95]

DDSキャリアとしてのpH 応答型膜融合性マラカイトグリーン含有リポソーム

○上垣 菜春<sup>1</sup>、宇田 亮子<sup>1</sup> (1. 奈良工業高等専門学校)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-96]

小児がんマーカーのバニリルマンデル酸計測用ペーパー分析デバイスの開発

○貞光 裕貴<sup>1</sup>、後藤 真司<sup>1</sup>、釘宮 章光<sup>1</sup> (1. 広島市大)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-97]

合成低分子TLR7リガンドを用いたナノ粒子アジュバントシステムの開発

○堤 萌夏<sup>1</sup>、若尾 雅広<sup>1</sup>、新地 浩之<sup>1</sup> (1. 鹿児島大・院理工)

## ◆ 日本語

[[PB]-3pm-98]

キャリアフリー有機ナノ粒子の細胞内溶解機構の究明

○成 晋宇<sup>1</sup>、テューマイトリィ ファーサイ<sup>2</sup>、鈴木 龍樹<sup>3</sup>、小関 良卓<sup>1</sup>、雲林院 宏<sup>2,4</sup>、若宮 淳志<sup>5</sup>、笠井 均<sup>1</sup> (1. 東北大、2. 北大、3. 仙台高専、4. ルーベン大学、5. 京大)

## ◆ 英語

[[PB]-3pm-99]

Integration of metal-organic frameworks with nanoendoscopy for intracellular delivery of unstable biomolecules

○Kai Huang<sup>1,2</sup>、Tomoko Inose<sup>1,2,3,4</sup>、Shuhei Furukawa<sup>1,2</sup> (1. Grad School of Eng., Kyoto Univ., 2. iCeMS, Kyoto Univ., 3. The Hakubi center, Kyoto Univ., 4. JST PRESTO)

## 小胞体標的型蛋白質フォールディング促進剤の開発

(東海大理化<sup>1</sup>・東海大先進生命研<sup>2</sup>) ○佐藤 悠平<sup>1</sup>・三神 瑠美<sup>1</sup>・荒井 堅太<sup>1,2</sup>  
Development of Endoplasmic Reticulum-Targeting Protein Folding Promoters (<sup>1</sup>*Department of Chemistry, School of Science, Tokai University*, <sup>2</sup>*Institute of Advanced Biosciences, Tokai University*) ○Yuhei Sato<sup>1</sup>, Rumi Mikami,<sup>1</sup> Kenta Arai<sup>1,2</sup>

Polypeptide chains synthesized in the ribosome are delivered to the endoplasmic reticulum (ER), where proteins with cysteine residues gain a specific three-dimensional structure by accompanying the formation of disulfide bonds. This oxidative protein folding is promoted by protein disulfide isomerase (PDI), but under conditions of oxidative stress, the enzymatic activity of PDI is significantly decreased, contributing to protein misfolding and eventually causing various misfolding diseases such as neurodegenerative disorders. We previously reported that water-soluble cyclic diselenides catalyze oxidative folding through a PDI-like catalytic mechanism.<sup>[1]</sup> In this study, to develop a new redox molecule that expresses appropriate catalytic activity in the ER, we attempted to design and synthesize new cyclic diselenide compounds with an ER-targeting motif. According to the literature methods, the ER-localizing structural motif was synthesized in 5 steps and was subsequently conjugated with a cyclic diselenide utilizing a click reaction to obtain the target compound. When the synthesized compound was applied as a catalyst for the reduction of hydrogen peroxide, enhancement of the reduction velocity was observed. We are currently investigating the catalytic ability of the compound for *in vitro* oxidative folding.

**Keywords:** *ER stress; Redox regulation; Disulfide bond; Reactive oxygen species*

リボソームで合成されたポリペプチド鎖は小胞体に輸送され、そこでシステイン残基を持つタンパク質は、ジスルフィド結合の形成を伴って特異的な立体構造を獲得する。この酸化的タンパク質フォールディングは、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) によって促進されるが、酸化ストレス条件下では PDI の酵素活性が著しく低下し、タンパク質のミスフォールディングの一因となり、最終的には神経変性疾患などの様々なミスフォールディング疾患の原因となる。我々はこれまでに、水溶性ジセレンドが PDI 様触媒機構を介して酸化的フォールディングを触媒することを報告してきた<sup>[1]</sup>。本研究では、小胞体内で適切な触媒活性を発現する新たな酸化還元分子の創出を目指し、ER 局在化構造モチーフを付与した新たな環状ジセレンド化合物の設計と合成を試みた。文献の方法を参考に、ER 局在化構造モチーフを 5 ステップで合成し、環状ジセレンド化合物とクリック反応を利用して接合することで目的化合物を得た。合成化合物を、過酸化水素の還元反応に触媒として応用したところ、還元反応速度の増進が見られた。現在、当該化合物の酸化的フォールディングの触媒能力について調査している。

[1] *Chem Asian J.* **2020**, *15*, 2646-2652.

## 細胞内滞留性プローブの開発に向けた PhosphonoRhodamine 誘導体の開発

(東京科学大生命理工<sup>1</sup>・東大院薬<sup>2</sup>・東京科学大自律システム材料学研究センター<sup>3</sup>)  
○石川 あおい<sup>1</sup>・藤岡 礼任<sup>1</sup>・河谷 稔<sup>1</sup>・橘 棕<sup>2</sup>・浦野 泰照<sup>2</sup>・神谷 真子<sup>1,3</sup>

Development of PhosphonoRhodamine derivatives for activatable fluorescent probe with improved cellular retention (<sup>1</sup>*Department of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo*, <sup>2</sup>*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo*, <sup>3</sup>*Research Center for Autonomous Systems Materialogy (ASMat), Institute of Science Tokyo*) ○Aoi Ishikawa,<sup>1</sup> Hiroyoshi Fujioka,<sup>1</sup> Minoru Kawatani,<sup>1</sup> Ryo Tachibana,<sup>2</sup> Yasuteru Urano,<sup>2</sup> Mako Kamiya<sup>1,3</sup>

We previously reported fluorescence probe for  $\beta$ -galactosidase with improved cellular retention whose fluorescence was controlled by intramolecular spirocyclization and intramolecular retention was controlled by quinone methide chemistry<sup>1</sup>. However, covalent labelling sometimes causes cytotoxicity. Therefore, based on the report that xanthene dye with phosphoryl group in the benzene moiety shows high cellular retention<sup>2</sup>, we set to develop a novel activatable fluorescent probe with improved cellular retention and reduced cytotoxicity if phosphono group function as intramolecular nucleophile to control the fluorogenicity of dye.

First, we synthesized a series of phosphonorhodamine derivatives and evaluated the optical properties. As a result, some derivatives form spirocyclic structure to show the decrease of visible wavelength absorption under neutral to basic condition, and some of them reached to the equilibrium with open form remained under basic condition, which are different from those of reported hydroxymethyl rhodamines. Moreover, we established a quantum chemical calculation model which could predict equilibrium constant of spirocyclization and open form residual ratio of these phosphonorhodamine derivatives. We are working on further derivatization, and will present the progress and future prospects.

**Keywords :** *phosphono rhodamine; spirocyclization; quantum computational calculation*

我々はこれまでに、キサンテン色素の分子内スピロ環化平衡に基づいた蛍光制御原理とキノンメチド化学に基づいたタンパク質ラベル化機構を組み合わせることで、細胞内滞留性  $\beta$ -galactosidase 活性検出蛍光プローブを開発したが、共有結合形成により細胞内に滞留する本設計では細胞毒性を生じやすいことが課題であった。そこで、ベンゼン環部位にホスホノ基を有するキサンテン色素が高い細胞内滞留性を示すこと<sup>2)</sup>に着目し、ホスホノ基を分子内求核基として色素の蛍光性を制御できれば、細胞毒性を低減した新規細胞内滞留性蛍光プローブが開発できるのではないかと考えた。

まず初めに、ホスホノ基が分子内求核基として働いてスピロ環化平衡が生じるか検証するため、ホスホノ基を有するローダミン誘導体を複数合成・評価したところ、これら誘導体の可視光吸収が中・塩基性条件下でスピロ環化形成によって低下することを確認した。一方で、いくつかの誘導体は塩基性条件下で可視光吸収が残存した状態で平衡に達するなど、分子内求核基をヒドロキシメチル基とした既報のローダミン誘導体とは異なる特性を示すことが明らかとなった。さらに、量子化学計算により、これらのホスホノローダミンの分子内スピロ環化平衡定数や開環体残存率を予測可能なモデルを確立した。現在、ホスホノ基を有するキサンテン色素母核の更なる構造展開をおこなっており、その進捗と展望についても合わせて発表予定である。

1) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, 9620–9624. 2) *Chem. Sci.*, **2023**, 14, 11365–11373.

## フレキシブルな糖部位を有する C2 位置換蛍光性アデノシン誘導体の合成と光学特性

(日大院工)○小倉 隼・安部 優歩・奥 友里乃・齋藤 義雄

Synthesis and photophysical properties of C2-substituted fluorescent acyclic adenosine derivatives (<sup>1</sup>*Graduate School of Engineering, Nihon University*) ○Shun Ogura,<sup>1</sup> Yuho Abe,<sup>1</sup> Yurino Oku,<sup>1</sup> Yoshio Saito<sup>1</sup>

Environmentally sensitive fluorescent (ESF) nucleosides change their fluorescence wavelength and intensity in response to microenvironmental changes such as polarity and viscosity, and can detect environmental changes such as DNA duplex formation and single-base mutations. In order to develop probes with high sensitivity and high base discrimination ability, we designed and synthesized novel ESF nucleosides with flexible sugar moiety.

**Keywords :** *fluorescent nucleoside, DNA probe*

環境感応型蛍光核酸 (ESF ヌクレオシド) は、極性や粘性といった微細な環境変化に応じて蛍光波長や強度を変化させる特徴を有する。ESF ヌクレオシドを含む DNA プロブを用いることで、核酸の二重鎖形成や一塩基変異に伴う環境変化の検出が可能であり、さまざまな応用が期待されている。

最近我々は、プリン塩基の C3 位に 2-ナフトニトリルを導入した ESF ヌクレオシド **2c37zA** や、その糖部位の柔軟性を高めた誘導体である **ac37zA** を報告している。**2c37zA** を含む DNA プロブを用いることで、標的 DNA (相補鎖) 中の **2c37zA** の対面のチミン塩基 (フルマッチ配列) を蛍光発光波長と強度の変化で検出することが可能であった。しかしながら、標的 DNA (相補鎖) 中の **2c37zA** の対面塩基がミスマッチ塩基の場合との蛍光スペクトルの変化は小さく、標的配列の一塩基変化を高感度で識別するには不十分であった。その一方、**2c37zA** の糖部位の柔軟性を高めた誘導体である **ac37zA** を含む DNA プロブを用いると、標的 DNA (相補鎖) 中のチミン塩基 (フルマッチ配列) とミスマッチ塩基との間での蛍光スペクトル変化がより大きくなることが確認され、塩基識別能が向上した。これらの結果から、一部の ESF ヌクレオシドにおいて、糖部位をフレキシブルにすることで標的 DNA (相補鎖) 中の一塩基変異の検出感度が向上することが示唆された。そこで、本研究では、従来の ESF ヌクレオシドに糖部位の柔軟性を取り入れた **C2-acA** を新たにデザインした。本発表では **C2-acA** の合成と光学特性の詳細について報告する。

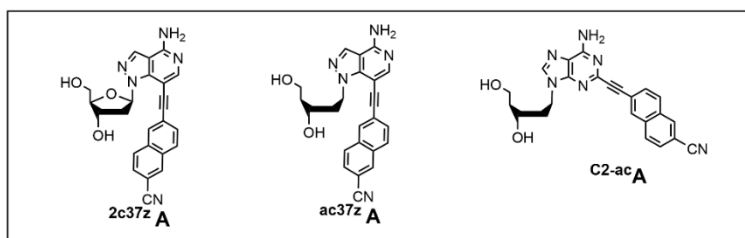


Fig. 1. Structure of ESF nucleosides.

1) Y. Oku, *et al.*, *Synlett*, **2024**, 34, 711.

## 非セコステロイド型リガンドを用いたビタミン D 受容体 PROTAC の開発研究

(東農工大院工<sup>1</sup>・富山県大院工<sup>2</sup>) ○堤梨乃<sup>1</sup>・坂本良太<sup>1</sup>・岡本侑樹<sup>2</sup>・安田佳織<sup>2</sup>・榊 利之<sup>2</sup>・寺 正行<sup>1</sup>・長澤和夫<sup>1</sup>

Development of vitamin D receptor PROTAC with a non-secosteroidal ligands

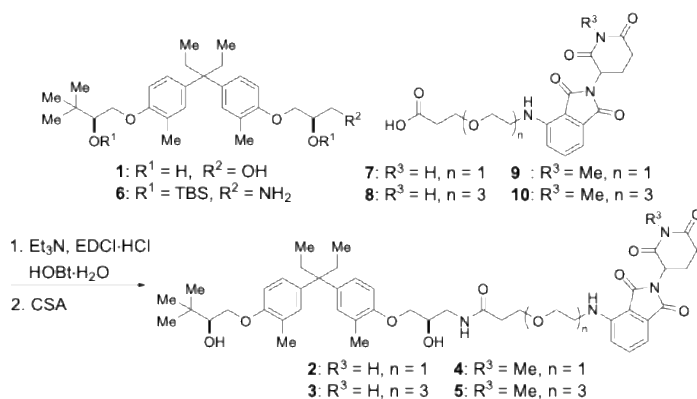
(<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, <sup>2</sup>Toyama Prefectural University) ○Rino Tsutsumi,<sup>1</sup> Ryota Sakamoto,<sup>1</sup> Yuki Okamoto,<sup>2</sup> Kaori Yasuda,<sup>2</sup> Toshiyuki Sakaki,<sup>2</sup> Masayuki Tera,<sup>1</sup> Kazuo Nagasawa<sup>1</sup>

The vitamin D receptor (VDR) forms a complex with the retinoid X receptor (RXR) and vitamin D response element (VDRE) upon binding of active vitamin D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>) to regulate the transcription of downstream genes. In this study, we synthesized PROTACs targeting the VDR using a non-secosteroidal ligand known to have similar activity to 1,25D<sub>3</sub>. In addition, the synthesized PROTACs were evaluated for protein resolution using Western Blot.

**Keywords :** Chemical biology; PROTAC; Nuclear receptor; Vitamin D

【目的】ビタミン D 受容体 (VDR) は、活性型ビタミン D<sub>3</sub> が結合すると核内に移行し下流遺伝子の転写調節を行うが、VDR が転写調節を行う際のクロマチン構造変化に関する分子機構 (関与するタンパク質等) が未解明である。そこで、クロマチンの構造変化に関与する VDR 結合タンパク質を選択的に化学的に分解することで、当該機構の解明につながると考えた。本研究ではまず、VDR の化学的分解を目的とし、VDR リガンドと E3 リガーゼ (タンパク質のプロテアソーム分解を誘発するタンパク質) リガンドをリンカーでつないだ VDR-PROTAC (proteolysis targeting chimera) **2**、**3** を開発することとした。具体的には、活性型ビタミン D<sub>3</sub> と同様の活性を示す非セコステロイド型 VDR リガンド **1** と E3 リガーゼリガンドとして pomalidomide を用いた。

【実験・結果】既知の手法<sup>1)</sup>を用いて合成した非セコステロイド型 VDR リガンド **1** より誘導したアミン **6** と別途合成した pomalidomide のカルボン酸誘導体 **7**、**8** を縮合した後、シリルエーテルを脱保護することで VDR-PROTAC **2**、**3** を得た (Scheme 1)。同様の手法で、環状イミドの窒素上の水素原子をメチル基に



Scheme 1. Synthesis of VDR-PROTAC **2** and **3**.

置換した E3 リガーゼ非結合リガンド **4**、**5** を合成した。合成した **2-5** について、HL-60 細胞での細胞分化誘導能及び HeLa 細胞での VDR 分解能を評価した。

【参考文献】 1) Y. Demizu and M. Kurihara *et al.*, *Lett. Org. Chem.* **2011**, *8*, 43-47.

## 側根成長阻害あるいは促進作用を示す IBA 誘導体の構造活性相関と作用機序の解明に向けた検討

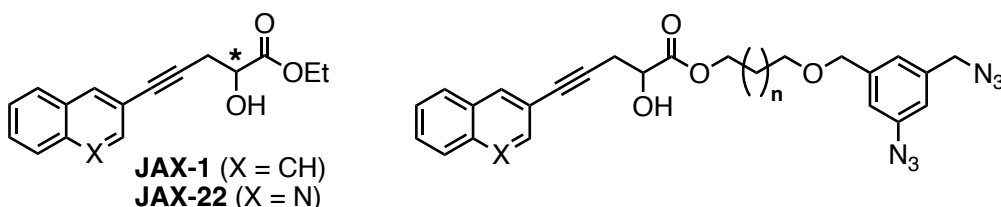
(神奈川大院工) ○渡邊 愛美, 伊部公太, 中川理絵, 岡本 専太郎

Studies on elucidating action mechanisms and the structure-activity relationship of IBA derivatives inhibiting or promoting lateral root growth and elongation selectively (*Graduate School of Engineering, Kanagawa University*) ○Ami Watanabe, Kota Ibe, Rie Nakagawa, Sentaro Okamoto

Regarding the plant hormones IAA and IBA, although extensive research has been conducted on IAA, including its biosynthesis and receptor-mediated mechanism of action, the role of IBA has not been clearly defined. IBA, which is interconverted into IAA in the plant, exists in only trace amounts. We have recently developed various IBA derivatives that selectively inhibit (e.g., JAX-1 and JAX-22) or promote (JAX-44) lateral root formation and elongation in *Arabidopsis*. Regarding JAX-44, mass spectrometry using the deuterated JAX-44 revealed that it is metabolized in the plant and converted to IBA. Meanwhile, the action mechanism of inhibitors such as JAX-1 remains unclear. In this study, we studied further structure-activity relationships, such as differences in activity between the enantiomers, and developed chemical probe molecules for imaging their distribution within the plant body.

**Keywords:** auxin, IBA derivative, inhibition of lateral root growth

植物ホルモンである **IAA** (インドール-3-酢酸) や **IBA** (インドール-3-酪酸) の内, **IAA** は生合成や受容体を介した作用機序など広く研究が進んでいるが, **IBA** についてはその役割は明確にされていない。**IBA** は植物体内で **IAA** と相互変換され、微量にしか存在しない。我々は、様々な **IBA** 誘導体を合成し、シロイヌナズナの側根形成・伸長を選択的に阻害する薬剤(**JAX-1**, **JAX-22** など)、および逆に促進する薬剤(**JAX-44**)を見出している。**JAX-44** については、その重水素化体を用いる質量分析によって、植物体内で代謝され **IBA** に変換されることがわかった。一方、**JAX-1** などの阻害剤の作用機序は未だ明確ではない。本研究では、これら誘導体の鏡像体による活性の相違などさらなる構造活性相関および植物体内での分布イメージングなどを指向した化学プローブ分子の開発を行なった。



## 新規アサイクリック ESF ヌクレオシドの設計と光学特性

(日大院工<sup>1</sup>・日大工<sup>2</sup>) ○片山聖己<sup>1</sup>・安部優歩<sup>1</sup>・伊藤慶一郎<sup>1</sup>・伊藤駿佑<sup>2</sup>・齋藤義雄<sup>1,2</sup>

Design and photophysical properties of novel acyclic ESF nucleosides. (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Nihon University, <sup>2</sup>College of Engineering, Nihon University) ○ Syogo Katayama,<sup>1</sup> Yuho Abe,<sup>1</sup> Keiichiro Ito,<sup>1</sup> Shunsuke Ito,<sup>2</sup> Yoshio Saito<sup>1,2</sup>

In our continuous effort to develop novel environmentally sensitive fluorescent (ESF) nucleosides that signal microenvironmental changes, we have developed novel acyclic ESF nucleosides, <sup>AC</sup>A and <sup>2C</sup>A. Among them, <sup>AC</sup>A and <sup>2C</sup>A exhibited strong fluorescences with high quantum yields and remarkable solvatofluorochromicity. Therefore, <sup>AC</sup>A and <sup>2C</sup>A can be a powerful tool for structural studies of nucleic acids and also in molecular diagnostics.

**Keywords :** DNA probe; Fluorescent nucleoside

我々は、これまで環境の違いに応じて蛍光スペクトルを変化させる様々な環境感応型蛍光核酸 (ESF ヌクレオシド) の開発を行ってきた。ESF ヌクレオシドを導入した DNA プロブを用いることで標的核酸の配列中の一塩基の違いなどを蛍光波長や蛍光強度の違いで識別でき、様々な分野への応用が期待されている。

これまでに、環境感応型蛍光核酸として天然のアデニンあるいはグアニン塩基の C8 位に色素を導入した蛍光ヌクレオシドを報告している。中でも、アデニン塩基にエチニル基を介してアセトフェノンを導入した蛍光ヌクレオシドが優れた溶媒クロミシティーを示し、これらを DNA 鎖に導入してプロブとして用いることで、標的 DNA や RNA 鎖を蛍光波長の違いで検出することに成功している。しかしながら、プリン塩基の C8 位に蛍光色素を導入したヌクレオシド誘導体は、DNA 二重鎖形成時にバックボーンとの間に立体障害を生じてしまい、対面塩基と塩基対を形成することが困難であると考えられる。そのため、対面の一塩基変異を検出するプロブへの応用は困難であった。そこで本研究では、これらの問題点をふまえた新規骨格を有する ESF ヌクレオシドの開発を目指した。ヌクレオシドの糖部位に柔軟性を持たせることで、プリン塩基の C8 位にバルキーな色素を導入した場合でも DNA 二重鎖中の対面塩基と塩基対を形成できるようになると考え、ヌクレオシドの糖部位に柔軟性を持たせた新規 ESF ヌクレオシドの合成を行った。

プリン塩基の C8 位に蛍光色素を導入した 2 種類のアサイクリック ESF ヌクレオシド(<sup>AC</sup>A、<sup>2C</sup>A)を開発したので、これらの合成と光学特性の詳細について報告する予定である。

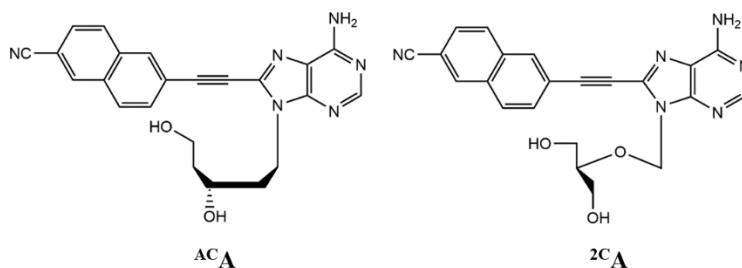


Fig. 1. Newly designed acyclic ESF nucleosides <sup>AC</sup>A and <sup>2C</sup>A.

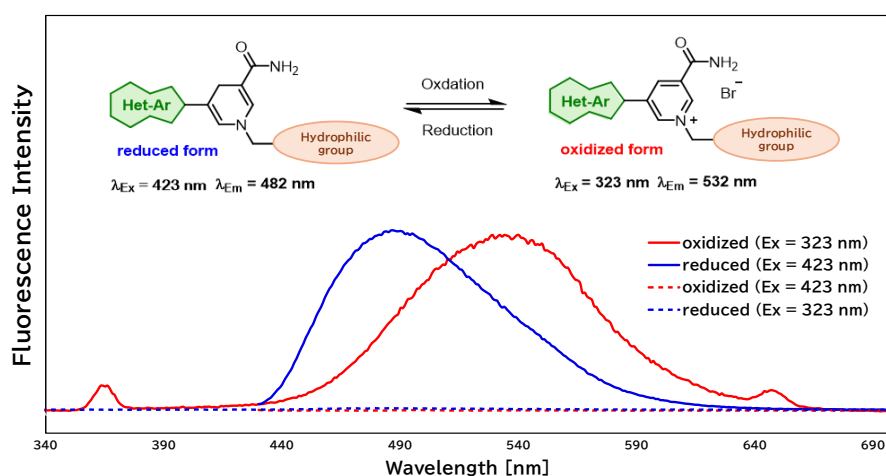
## 可逆的酸化還元サイクルのイメージングが可能なニコチンアミドを母核とした新規蛍光プローブの開発

(同志社大学<sup>1</sup>) ○竹山 裕美子<sup>1</sup>・濱口 尚斗<sup>1</sup>・中村 光<sup>1</sup>・太田 哲男<sup>1</sup>・大江 洋平<sup>1</sup>  
 Development of a Novel Fluorescent Probe Based on Nicotinamide Capable of Imaging Reversible Redox Cycles. (<sup>1</sup>*Doshisha University*) ○Yumiko Takeyama,<sup>1</sup> Naoto Hamaguchi,<sup>1</sup> Akira Nakamura,<sup>1</sup> Tetsuo Ohta,<sup>1</sup> Yohei Oe<sup>1</sup>

Fluorescent probes detecting redox changes are essential tools for understanding cellular redox dynamics. In this research, a novel water-soluble fluorescent probe mimicking  $\text{NAD}^+$  was developed to monitor redox changes. By introducing a hydrophilic group at the 1-position and a heteroaromatic ring at the 5-position of nicotinamide, the probe exhibits a reversible fluorescence response to multiple redox reactions, enabling the independent detection of oxidized and reduced forms through the use of different excitation wavelengths. This presentation outlines the probe's design, synthesis, and application, including the quantification of enzymatic reactions.

**Keywords :** Fluorescence probe; Nicotinamide; Redox; LDH; Enzyme reaction

酸化還元反応を検出する蛍光プローブは、細胞内の酸化還元動態を理解し、生化学的プロセスの可視化や解析において重要な役割を果たす。本研究では、ニコチンアミドを母核とした新規水溶性蛍光プローブを開発し、酸化還元反応のモニタリングを可能にした。すなわち、ニコチンアミドの1位に親水性官能基を、5位に芳香族複素環を導入する設計から、構造を最適化することで、酸化還元反応に対して可逆的な蛍光応答を示すプローブを開発した。本プローブは異なる励起波長（323 nm または 423 nm）を用いることで、酸化型と還元型を独立して検出可能である。本発表では、プローブの設計、合成過程、応答特性の詳細に加え、応用例として酵素反応の解析結果についても概説する。



## プラズモニクチップ上の温度応答性ハイドロゲルによる非特異吸着抑制

(関西学院大学<sup>1</sup>・チェコ科学アカデミー<sup>2</sup>) ○藤田 祥吾<sup>1</sup>・Dario Mor<sup>2</sup>・名和 靖矩<sup>1</sup>・Jakub Dostalek<sup>2</sup>・田和 圭子<sup>1</sup>

Suppression of Nonspecific Adsorption by Temperature Responsive Hydrogel on a Plasmonic Chip (<sup>1</sup>Kwansei Gakuin University, <sup>2</sup>Czech Academy of Sciences) ○Shogo Fujita,<sup>1</sup> Dario Cattozzo Mor,<sup>2</sup> Yasunori Nawa,<sup>1</sup> Jakub Dostalek,<sup>2</sup> Keiko Tawa<sup>1</sup>

One of the challenges in improving the performance of fluorescence biosensors is suppressing nonspecific adsorption. The temperature-responsive polymer pNIPAAm has a lower critical solution temperature (LCST) at 32 °C. In this study, the temperature response and the suppression of nonspecific adsorption was investigated on the plasmonic chips modified with pNIPAAm hydrogel (HG) using cy5-streptavidin. A shift in the resonance wavelength of pNIPAAm by the response to temperature was observed, showing suppression of nonspecific adsorption.

*Keywords; Plasmon, Biosensor, pNIPAAm, Temperature, Nonspecific Adsorption*

蛍光法を用いたバイオセンサーの高性能化の課題の一つとして非特異吸着の抑制が挙げられる。温度応答性高分子 pNIPAAm は 32°C の下限臨界溶液温度 (LCST) を持ち、32°C 以下では親水性、32°C 以上では疎水性を示す。本研究では、pNIPAAm では温度に対応して分子の極性が制御できることに注目し、銀薄膜でコーティングされた波長サイズの周期構造を持つプラズモニクチップ表面に pNIPAAm ハイドロゲル (HG) を修飾した基板を作製し、この基板の温度応答性と非特異吸着抑制能を評価した。

周期 400 nm で同心円構造を持つ銀と SiO<sub>2</sub> でコーティングされた基板を用い、PMMA 層 (疎水界面) を形成した。その上に pNIPAAm HG 溶液をスピコートし、UV 光 (2 J/cm<sup>2</sup>) を露光したスポットのみ HG 層を形成させた (Fig.1)。正立透過蛍光顕微鏡を用いて 166 μM に調製された蛍光標識タンパク質 CY5-ストレプトアビジン (SA) 溶液の非特異吸着量を評価した。

pNIPAAm HG を表面修飾した基板の反射スペクトルは温度に応じた pNIPAAm の構造変化によって共鳴波長のシフトを確認できた。また、pNIPAAm HG 部分での CY5-SA 非特異吸着量は PMMA 層に比べて減少したことが確認できた。

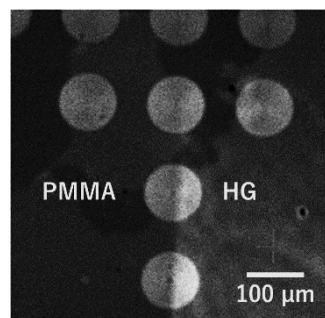


Fig.1 右半分に pNIPAAm HG 修飾された基板の明視野像。白い円内がプラズモニク構造内。

## ホウ素クラスターとカチオン性ポリマーに基づくタンパク質被覆アモルファスマイクロ粒子を用いたタンパク質の細胞質送達

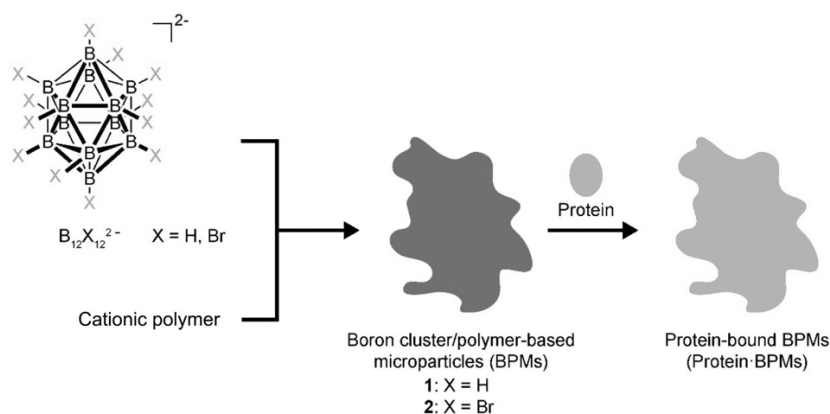
(大阪歯科大学) ○牧田 佳真・平井 悠哉・藤原 眞一

Cytosolic Protein Delivery via Protein-Coated Amorphous Microparticles Based on Boron Clusters and Cationic Polymers (*Osaka Dental University*)○Yoshimasa Makita, Yuya Hirai, Shin-ichi Fujiwara

Direct protein delivery to the cytosol facilitates immediate functional expression of proteins without the risks associated with gene introduction. However, the technology for delivering various proteins to the cytosol is still in its infancy. The combination of boron clusters ( $B_{12}X_{12}^{2-}$ ) with a cationic polymer containing quaternary ammonium resulted in the formation of micro-sized particles (BPMs) in both  $B_{12}H_{12}^{2-}$  and  $B_{12}Br_{12}^{2-}$  systems. When proteins were incorporated into these BPMs, the formation of protein-bound BPMs (protein-BPMs) was confirmed. Notably, protein-BPMs prepared with  $B_{12}Br_{12}^{2-}$  were found to be efficiently internalized into cells via endocytosis and subsequently released the encapsulated proteins into the cytosol.

**Keywords :** Microparticles; Boron Clusters; Cytosolic Protein Delivery

タンパク質を細胞質に直接送達することで、遺伝子導入に伴うリスクを回避しながら、タンパク質の即時的な機能発現を可能にする。しかし、多様なタンパク質を細胞質に送達する技術は、まだ発展途上の段階にある。ホウ素クラスター ( $B_{12}X_{12}^{2-}$ ) と 4 級アンモニウムのカチオン性ポリマーを混合すると、 $B_{12}H_{12}^{2-}$  および  $B_{12}Br_{12}^{2-}$  のそれぞれの場合においてマイクロサイズの粒子 (BPMs) の形成が確認された。BPMs にタンパク質を混合したところ、タンパク質が付加した BPMs (Protein-BPMs) の形成が確認された。得られた Protein-BPMs は特に  $B_{12}Br_{12}^{2-}$  の場合にエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれ後、タンパク質を細胞質内に放出することを明らかにした。



1) Y. Hirai, Y. Makita, J. Asaoka, Y. Aoyagi, A. Nomoto, H. Okamura, S. Fujiwara. *ACS Omega* **2023**, 8, 35321.

## 界面活性剤分子膜の電気的環境を利用したガルバニ電位の測定

(宇都宮大院 物質環境科学プログラム<sup>1</sup>・宇都宮大機器分析センター<sup>2</sup>) ○中田みなみ<sup>1</sup>・六本木誠<sup>2</sup>・大庭 亨<sup>1</sup>

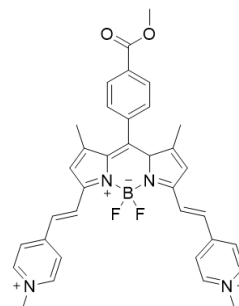
### Measurement of galvanic potential using the electrical environment of surfactant molecular films

(<sup>1</sup>Department of Material and Environmental Chemistry, Utsunomiya University, <sup>2</sup>Center for Instrumental Analysis, Utsunomiya University) ○Minami Nakada,<sup>1</sup> Makoto Roppongi,<sup>2</sup> Toru Oba<sup>1</sup>

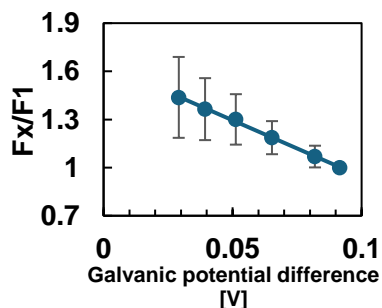
Voltage-sensitive dyes (VSDs) have been used to visualize potentials across cellular and organelle membranes. A simple method screening voltage sensitivity of the candidate dyes is required for efficient development of VSD. In this presentation, we will report on the evaluation of the electrostatic potential of oil-in-water emulsion droplets using VSDs we developed. The oil phase (dye **1** (**Fig. 1**) and tetrapropylammonium (TPrA<sup>+</sup>) salt of tetrakis(4-chlorophenyl)borate in 1,2-dichloroethane) was dispersed by sodium dodecyl sulfate (SDS) in water. Addition of TPrACl (0.5 ~ 5 mM) to the dispersion increased the fluorescence intensity of **1**. A rate of increase was proportional to the equilibrium Galvanic potential difference of the O/W-emulsion droplets (**Fig. 2**).

**Keywords :** Galvanic potential, membrane potential, micelle, voltage-sensitive dyes.

膜電位感受性色素 (VSD) は、細胞膜やオルガネラ膜にかかる電位の可視化に利用されている。VSD の電位応答性の評価にはパッチクランプ法が使われてきたが、これは多数の候補分子をスクリーニングしてVSDの合成開発サイクルを効率よく進めていく方法としては適していない。我々はより簡便な評価法として、界面活性剤ミセル表層の電気的環境を利用する方法を検討してきた。本発表では、界面活性剤分子膜を介したガルバニ電位と蛍光プローブの蛍光特性の相関について報告する。疎水性の電解質と色素 **1** (**Fig. 1**)を溶かしたジクロロエタン液滴をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で水中に分散した。このエマルション分散液にテトラプロピルアンモニウムクロリド (TPrACl) 水溶液を添加していくと (0.5 ~ 5 mM)、色素 **1** の蛍光強度が増加し、その変化率は SDS 分子膜を介したガルバニ電位に比例した(**Fig. 2**)。



**Fig. 1.** 色素 **1** の分子構造.



**Fig. 2.** 色素 **1** の蛍光強度比とガルバニ電位の関係.

## 単一波長励起蛍光スイッチ (MEFS) に基づく一分子追跡法を用いた脂質膜中ゲスト分子の拡散挙動計測

(阪大基礎工<sup>1</sup>・阪大院基礎工<sup>2</sup>) ○吉原 行亮<sup>1</sup>・Bhagya Lakshmi Sankaramangalam Balachandran<sup>2</sup>・天津 祐樹<sup>2</sup>・渡邊 望美<sup>2</sup>・馬越 大<sup>2</sup>・伊都 将司<sup>2</sup>

Measuring the lateral diffusion behavior of single guest molecules in lipid layers using single-molecule tracking based on monochromatic excitation fluorescence switching (MEFS) (<sup>1</sup>*School of Engineering Science, Osaka University*, <sup>2</sup>*Graduate School of Engineering Science, Osaka University*) ○Kosuke Yoshihara,<sup>1</sup> Bhagya Lakshmi Sankaramangalam Balachandran,<sup>2</sup> Yuki Amatsu,<sup>2</sup> Nozomi Watanabe,<sup>2</sup> Hiroshi Umakoshi,<sup>2</sup> Syoji Ito<sup>2</sup>

Phospholipids forming the major constituents of cell membrane mediates the entry and exit of biomolecules in the cell. This role has been advantageous in the field of membrane lipid therapy (MLT) for treating diseases. Understanding the structure, viscoelastic properties, and fluidity of lipid membrane can be helpful in optimizing the key processes in the MLT. We, in this study, applied monochromatic excitation fluorescence switching (MEFS) for diarylethene derivatives (DAEs)<sup>1-3)</sup> to investigating spatiotemporal properties of lipid membranes. Lipid membranes containing DAEs were prepared on glass substrates. The DAEs exhibited fluorescence switching under CW 532-nm photoexcitation and lateral diffusion in the membranes, confirming the validity of the application of MEFS-SMT to the membrane systems. Their photo-switching properties and lateral diffusion behaviors of the DAEs were tracked at the single molecule level and analyzed.

**Keywords :** Fluorescence switching, Diarylethene, Lipid layer, Single-molecule imaging

脂質膜の諸物性の高時空間分解評価は、細胞膜が司る生命機能の理解や、高効率薬剤送達系実現などに対して重要な知見を与える。そこで、脂質膜の局所構造や場所に依存した流動性などを評価するために、近年我々が開発した、ジアリールエテン (DAE) 誘導体<sup>1)</sup>の単一波長励起蛍光スイッチ (MEFS)<sup>2,3)</sup>に基づく単一分子追跡法(MEFS-SMT)を適用し

た。MEFS-SMT ではホスト物質中の単一 DAE 分子の並進拡散挙動を長時間 (> 数時間) にわたり追跡することが可能である。DAE を添加した脂質膜 (ジオレオイルフォスファチジルコリン等) をガラス基板上に作製し、波長 532nm の CW レーザー照射下において蛍光スイッチング及び並進運動を示すことを確認した。この系での蛍光 ON 時間は数秒程度であり、単一分子追跡が可能な条件を実現できた。講演では、膜中での並進拡散挙動に関して、その空間及び時間依存性などに関するデータを示し、膜物性評価に対する MEFS-SMT の有効性を議論する。

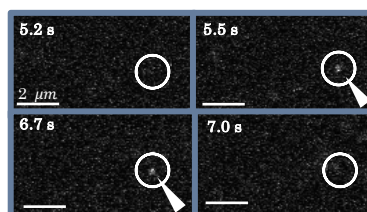


Figure 1. An example of fluorescence switching behavior of single DAE in a lipid membrane.

1) R. Kashihara, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 16498. 2) Y. Arai, et al., *Chem. Commun.* **2017**, 53, 4066. 3) S. Ito, et al., *Polym. Chem.* **2022**, *13*, 736.

## 高分子型遷移金属錯体の陽イオン性糖鎖高分子とのブロックコポリマー化による細胞内膜通過の改善と抗がん活性の増強

(東京理大理応化<sup>1</sup>・東京理大院理研化学<sup>2</sup>) ○阿南 和希<sup>1</sup>・平田 鷹輔<sup>2</sup>・青木 元汰<sup>2</sup>・大塚 英典<sup>1,2</sup>

Enhancement of anticancer activity employing block copolymers of polymeric transition metal complexes and cationic glycopolymers through improving the intracellular membrane passage mechanism (<sup>1</sup>Dept. of Appl. Chem., Facul. of Sci., Tokyo Univ. of Sci., <sup>2</sup>Dept. of Chem., Grad. Sch. of Sci., Tokyo Univ. of Sci.) ○Kazuki Anami,<sup>1</sup> Yosuke Hirata,<sup>2</sup> Genta Aoki,<sup>2</sup> Hidenori Otsuka<sup>1,2</sup>

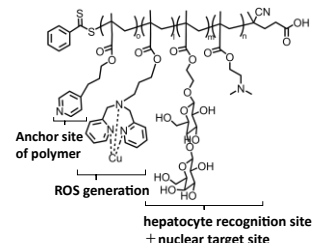
Polymerizing a metal complex DPA[Cu] has been reported to intercalate with DNA, form an oxygen-copper complex dinuclear intermediate, produce ROS, and cleave DNA, exhibiting anticancer activity [1]. This DPA[Cu] polymer, which has anticancer properties, was designed to formulate triblock copolymer, Lac-co-DMAE-*b*-pDPA[Cu]-*b*-pPy, to enhance its drug efficacy and tumor targeting (Fig. 1). This polymer was loaded on gold nanoparticles to investigate the synthesis of nanoparticles targeting cell nuclei. We have succeeded in synthesizing a diblock copolymer of AcLac<sub>30</sub>-co-DMAE<sub>31</sub>-*b*-pDPA<sub>27</sub> (Fig. 2). We also synthesize Lac-co-DMAE-*b*-pDPA[Cu]-*b*-pPy by sequential pyridine polymerization and copper complexation, and evaluate its anticancer activity against hepatocellular carcinoma cells (HepG2) by loading it onto gold nanoparticles. Furthermore, we will investigate the nuclear membrane-passing function of Lac-co-DMAE by evaluating the selective anticancer activity against lung cancer cells and breast cancer cells by loading a random copolymer formed by cationic DMAE and Mannose mixed with above gold nanoparticles as a cell recognition site.

**Keywords :** multivalent effect by polymer, cell nucleus, glycans, copper complex, anti-cancer drug

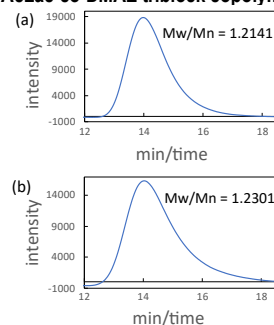
金属錯体 DPA[Cu] の高分子化は DNA に対するインターカレートを促し、酸素と銅錯体複核系の間接体を經由した ROS 生成により DNA を切断する結果、抗がん活性を示すことを報告した [1]。本研究では、抗癌剤となる DPA[Cu] の高分子化による薬効強化と腫瘍集積を目的として、カチオン(DMAE)と Lactose(AcLac) で形成するランダムコポリマーと金属表面に高い結合性を有するピリジン(Py)とのトリブロック共重合体 Lac-co-DMAE-*b*-pDPA-*b*-pPy を設計した (Fig.1)。この高分子を金ナノ粒子に担持し細胞核を標的するナノ粒子の合成の検討を行った。これまでに、単分散性の AcLac<sub>30</sub>-co-DMAE<sub>31</sub>-*b*-pDPA<sub>27</sub> のジブロックコポリマーの合成に成功した

(Fig. 2)。引き続きピリジンの逐次重合、銅錯体化を行って Lac-co-DMAE-*b*-pDPA[Cu]-*b*-pPy の合成を行い金ナノ粒子に担持させ肝臓細胞に対する抗がん活性を評価する。また、カチオンと Mannose で形成するランダムコポリマーを細胞認識部位に用いて、肺癌細胞および乳癌細胞への選択的抗癌活性を評価することによって、Lac-co-DMAE の核膜通過機能について検討を行う。

[Reference] 1. S. Osawa, H. Otsuka et al. *Macromol. Rapid Commun.* 2021, 42, 2100274.



**Fig.1** Sequence controlled AcLac-co-DMAE triblock copolymer



**Fig.2** Schematic representation of the sequence controlled multiblock copolymerization of AcLac-co-DMAE(a) and AcLac-co-DMAE-*b*-pDPA(b), (a,b) GPC chromatogram

## 単一生細胞内からの標的オルガネラ抽出を目指した銀ナノワイヤー表面上分子修飾

(京大工<sup>1</sup>・京大院工<sup>2</sup>・京大アイセムス<sup>3</sup>・京大白眉センター<sup>4</sup>・JST さきがけ<sup>5</sup>) ○寺田 涼真<sup>1,3</sup>・立石 友紀<sup>2,3</sup>・古川 修平<sup>2,3</sup>・猪瀬 朋子<sup>2,3,4,5</sup>

Surface modification of silver nanowires for the extraction of target organelles from single live cell (<sup>1</sup>Eng., Kyoto Univ., <sup>2</sup>Grad School of Eng., Kyoto Univ., <sup>3</sup>iCeMS, Kyoto Univ., <sup>4</sup>The Hakubi center, Kyoto Univ., <sup>5</sup>JST PRESTO) ○ Ryoma Terada,<sup>1,3</sup> Tomoki Tateishi,<sup>2,3</sup> Shuhei Furukawa,<sup>2,3</sup> Tomoko Inose,<sup>2,3,4,5</sup>

Organelles play an essential role in maintaining cellular functions, such as metabolism and energy production. For instance, mitochondria are vital organelles responsible for energy production. However, even within a single cell, mitochondria exhibit heterogeneity in protein levels and other factors. This heterogeneity influences processes such as tissue regeneration and tumor progression, yet its impact on cellular functions remains insufficiently understood.

In this study, we aimed to develop a novel technology to extract targeted organelles exclusively from living single cells, enabling the quantitative evaluation of DNA and protein components within these organelles. We employed a technique called Plasmonic Nanowire Single Live-Cell Endoscopy, which utilizes noble metal nanowires that can be inserted into cells without damage. Specifically, we developed a method to modify silver nanowires with diazirine compounds that bind to proteins on target organelles upon light stimulation.

First, we synthesized a novel diazirine compound through amidation. We then investigated the conditions for immobilizing the diazirine onto the surface of azide-modified silver nanowires using click chemistry. The modification process was evaluated using <sup>1</sup>H NMR, Raman spectroscopy, and IR spectroscopy.

**Keywords :** *Plasmonic Nanowire Single Live-Cell Endoscopy, Diazirine, Surface Modification*

細胞小器官（オルガネラ）は代謝やエネルギー生産など細胞機能維持に重要な役割を果たす。例えばミトコンドリアはエネルギー生産を担う重要なオルガネラであるが、単一細胞内に存在するミトコンドリアであっても、構成するタンパク質量などの不均一性を示すことが知られている。この不均一性は組織修復や腫瘍進行などに影響を与えるものの、細胞機能への影響は十分解明されていない。

本研究では、生きた単一細胞内の標的オルガネラの DNA やタンパク質量の定量評価を可能にするため、標的オルガネラのみを抽出する新たな技術開発を目的とした。単一細胞内視鏡法と呼ばれる貴金属ナノワイヤーを細胞への損傷を与えることなく挿入可能な技術を用いた。具体的には、標的オルガネラ上に存在するタンパク質と光刺激により結合するジアジリンを、銀ナノワイヤー上に修飾する方法の開発を行った。まずアミド化ジアジリンを新規に合成した。さらに、アジド基修飾した銀ナノワイヤー表面へ、クリック反応を利用して固定する条件を検討した。修飾過程は <sup>1</sup>H NMR、ラマン分光法、IR 分光法で評価した。

## 毛髪用ブリーチ剤におけるアルカリ臭低減の検討

(東洋大姫路高<sup>1</sup>・神戸大院海事<sup>2</sup>・神戸大院イノベ<sup>3</sup>・岡本(株)<sup>4</sup>) ○吉井 舞耶<sup>1</sup>・佐藤 聡太郎<sup>2</sup>・片山 拓哉<sup>2</sup>・池内 亮太<sup>2</sup>・堀田 弘樹<sup>2</sup>・辻野 義雄<sup>3</sup>・鷲家 真吾<sup>4</sup>

Study on Reducing the Alkaline Odor of Hair Bleaching Agent (<sup>1</sup>Toyo University Himeji Senior High School, <sup>2</sup>Graduate School of Maritime Sciences, Kobe University, <sup>3</sup>Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University, <sup>4</sup>Okamoto Corporation) ○Maya Yoshii<sup>1</sup>, Sotaro Sato<sup>2</sup>, Takuya Katayama<sup>2</sup>, Ryota Ikeuchi<sup>2</sup>, Hiroki Hotta<sup>2</sup>, Yoshio Tsujino<sup>3</sup>, Shingo Washika<sup>4</sup>

When bleaching hair, melanin is generally decomposed and bleached by oxidants such as hydrogen peroxide in an alkaline solution. However, since amine-based alkaline agents such as ammonia water are used, a strong odor is an important issue. Therefore, in this study, persulfate, which is known as an active ingredient in bleaching agents, was added to ammonia to increase the efficiency of the bleaching process and to reduce the alkaline odor. Figure 1 shows the results of a comparison of L\* values, an index of brightness, between samples decolorized with ammonia alone and those with ammonia plus persulfate. In both cases, the L\* value increased with the number of treatments. However, after four or more treatments, the sample decolorized by adding persulfate to ammonia was found to be brighter and more effective. The results of further treatments and changes in the amount of cysteine acid on the hair surface with treatment will be reported.

**Keywords :** Hair Bleaching; Ammonia; Persulfate; Brightness L\*; Cysteic acid

毛髪をブリーチする際には、アルカリ性溶液中で過酸化水素などの酸化剤によってメラニンを分解し、脱色することが一般的である。アルカリ剤としては主にアンモニア水が用いられており、強い臭気が発生することが課題となっている。そこで本研究では、ブリーチ剤の有効成分として知られている過硫酸塩をアンモニアに加えてアルカリ臭の低減を図った。アンモニアのみで脱色したサンプルとアンモニアに過硫酸を加えて脱色したサンプルを明るさの指標である L\*値で比較した結果を図 1 に示す。どちらも処理回数（30 分を 1 回の処理とした）とともに L\*値が増加し、処理回数に伴い脱色が進行していることが分かる。しかし 4 回以上処理を繰り返すと、過硫酸カリウムをアンモニアに加えて脱色したサンプルのほうがより明るく、脱色効果が高いことがわかった。さらに処理回数を重ねた結果や、処理に伴う毛髪表面システイン酸量の変化、表面画像についても観察を行ったので、それらを報告する。

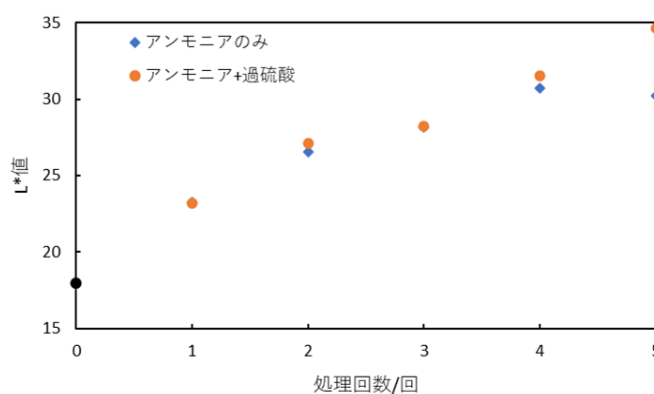


図 1. ブリーチ処理（30 分／回）に伴う明度（L\*値）の変化。◆ アンモニア水による処理、● アンモニア水+過硫酸塩による処理。

## ホスファターゼによる脱リン酸化反応によってゾル転移する過渡的ハイドロゲルの創製

(阪大院工<sup>1</sup>) ○関谷 涼<sup>1</sup>・仲本 正彦<sup>1</sup>・松崎 典弥<sup>1</sup>

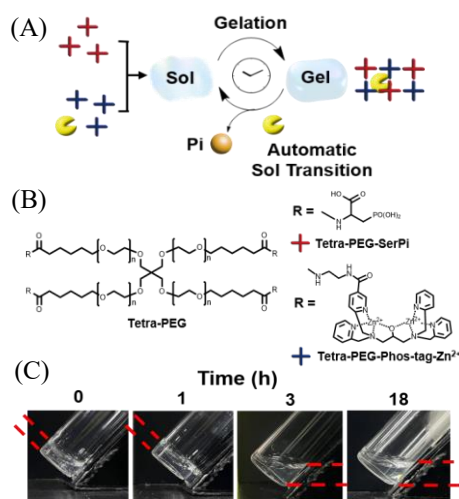
Development of Transient Hydrogel that Exhibits Programmable Sol Transition Driven by Enzymatic Dephosphorylation (<sup>1</sup>*Graduate School of Engineering, Osaka University*) ○Ryo Sekiya,<sup>1</sup> Masahiko Nakamoto,<sup>1</sup> Michiya Matsusaki<sup>1</sup>

Biological reactions-responsive hydrogels are of great interests as drug release systems. However, in contrast to the kinetic control of various biological phenomena under out-of-equilibrium conditions, the response of many hydrogels is based on equilibrium control. We present here a transient hydrogel with phosphate ester-mediated cross-linking that exhibits autonomous sol transition driven by enzymatic dephosphorylation. Controlling the kinetic balance between gelation and sol transition pathways, the lifetime can be programmed on a wide range from an hour to three months. The encapsulation of the sol transition pathway within the hydrogel provides autonomy, robustness and regulatory capacity. This work would provide a strategy for engineering carriers of proteins and/or cells in tissue engineering and/or drug release system.

**Keywords :** Hydrogel; Sol-Gel Transition; Dephosphorylation; Enzyme; Out-of-Equilibrium

生体反応に応答するハイドロゲルは、薬物担持・徐放材料として注目されている<sup>1)</sup>。しかしながら、種々の生命現象が非平衡条件下で速度論的に制御されるのとは対照的に、多くのハイドロゲルは平衡論的な機能制御に基づいている。そのため、ゲルの寿命制御や過渡的な応答の設計は困難である。本研究では、生体内でのリン酸化・脱リン酸化反応を介したシグナル伝達に着想を得て、ゲル内に内包した酵素による脱リン酸化反応によって自律的にゾル転移する過渡的なハイドロゲル材料を報告する。具体的には、4分岐型ポリエチレングリコールを骨格として、リン酸エステルアニオンおよび亜鉛二核錯体リガンド間の分子間相互作用によって架橋構造を形成するハイドロゲルを作製した (Fig. 1A, 1B)。このゲル内に脱リン酸化酵素であるホスファターゼを内包することで、ゲル形成後に自動的に溶解する過渡的なハイドロゲルを作製した (Fig. 1C)。また、ゲル形成経路と溶解経路の速度論的バランスを制御することで、ハイドロゲルの寿命を数時間から数か月という幅広いスケールでプログラムした。ハイドロゲルへのゾル転移経路の内包は、外部刺激に依存しない機能の自律性・堅牢性・調節能を提供し、細胞・タンパク質の担持材料や薬物徐放材料としての応用が期待される。

1) H. Wang *et al.*, *Adv. Mater.* **2015**, 27, 3717.



**Figure 1.** (A) Conceptual illustration of this study  
(B) Chemical structure of gel precursors  
(C) Autonomous sol transition of the hydrogel

## 火薬成分 2,4-dinitrotoluene によって蛍光色変化する微生物バイオセンサーを用いた埋設地雷の検出

(1. 東京工科大学 応用生物) ○西村 快<sup>1</sup>・吉澤 太我<sup>1</sup>・秋元 卓央<sup>1</sup>

Detection of buried landmines using a microbial biosensor that changes fluorescent color with 2,4-dinitrotoluene, an explosive component (1. Sch. of Biosci. and Biotechnol., Tokyo Univ. of Technol.) ○Kai Nishimura<sup>1</sup>, Taiga Yosizawa<sup>1</sup>, Takuo Akimoto<sup>1</sup>

Landmines have become an international problem, because they remain semi-permanently in an area. A microbial biosensor which can detect landmines by changes of fluorescence color owing to FRET has been developed in our laboratory. For this purpose, we constructed a gene of TVMV protease placed downstream of *yqjF* promoter which responds to 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT), a decomposition product of trinitrotoluene, and a gene of fluorescence protein pair comprising tdTomato and GFP connected with TVMV recognition peptide (tdTomato-GFP). However, the fluorescence protein pair required more than 48 hours to mature in this system, and, moreover, the changes in fluorescence color by 2,4-DNT was not significant. Thus, in this study, fluorescence protein pair of TagRFP-Ametrine was constructed to reduce the time for the maturation and to obtain the distinct change of fluorescence color.

**Keywords :** *Microbial biosensor, Landmine, 2,4-dinitrotoluene, FRET*

地雷は一度埋設されるとその地域に半永久的に残り、国際的な問題になっている。そこで、微生物を利用した地雷を検出するバイオセンサーの開発を考えた。本研究室では、地雷の火薬成分 trinitrotoluene の分解生成物の 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT) に応答する *yqjF* プロモーターを用いた、蛍光色変化により地雷を検出する微生物バイオセンサーの開発を行っている。このために、*yqjF* プロモーターの下流にタンパク質分解酵素の TVMV プロテアーゼを導入した遺伝子と、蛍光タンパク質のペアとして tdTomato と GFP を TVMV linker で接続した tdTomato-GFP の遺伝子を使用していた。しかし、tdTomato は成熟までに 48 時間以上と時間が必要であった。また、tdTomato-GFP のペアでは蛍光色変化の差が小さいことが問題であった。このことから、本研究では、蛍光タンパク質ペアを TagRFP-Ametrine に変更し、誘導時間の短縮と蛍光変化を明確にすることを目的とした。

## 循環置換蛍光タンパク質を利用した細胞内 ATP を指標とする BOD センサーの開発

(東京工科大学・応用生物<sup>1)</sup>) ○岸田 涼佑<sup>1</sup>・菅野 裕斗<sup>1</sup>・秋元 卓央<sup>1</sup>

Development of a BOD sensor using circularly permuted fluorescent protein as an indicator of intracellular ATP (<sup>1</sup>*Bio Science, Tokyo University of Technology*) ○Ryosuke Kishida,<sup>1</sup> Yuto Kanno,<sup>1</sup> Takuo Akimoto<sup>1</sup>

BOD can be evaluated using intracellular ATP of microorganism. To evaluate BOD, *Saccharomyces cerevisiae* expressing a fusion protein comprising a bacterial ATP synthase  $\epsilon$  subunit sandwiched with CFP and YFP was constructed<sup>1)</sup> and has been reported to exhibit the changes of fluorescence color depending on BOD<sup>2)</sup>. However, the changes of fluorescence color was not significant. Therefore, BOD sensor based on intracellular ATP measurement using  $\epsilon$  subunit and circularly permuted GFP (cpGFP) was developed in this study.

Because a fusion protein comprising  $\epsilon$  subunit and cpGFP ( $\epsilon$  subunit-cpGFP) can show the change of fluorescence intensity by ATP<sup>3)</sup>, *S. cerevisiae* expressing  $\epsilon$  subunit-cpGFP can be expected to exhibit the changes of fluorescence intensity depending on BOD. If this BOD measurement based on intracellular ATP could be developed, continuous monitoring of BOD could be achieved without electrode and reagents.

**Keywords :** *Biochemical Oxygen Demand; microbial biosensor; circularly permuted GFP*

微生物の細胞内 ATP を指標とすると、環境水の BOD を測定することが可能である。このため、細菌由来の ATP 合成酵素の  $\epsilon$  subunit と 2 つの蛍光タンパク質を組み合わせた CFP- $\epsilon$  subunit-YFP<sup>1)</sup> を発現する酵母を利用することで、蛍光色の変化から BOD の測定が可能である<sup>2)</sup>。しかし、この方法では蛍光の差異が明確ではないため、本研究では循環置換型 GFP (circularly permuted GFP : cpGFP) と  $\epsilon$  subunit を利用した細胞内 ATP を指標とした BOD センサーの開発を目的とした。

cpGFP と  $\epsilon$  subunit を融合した  $\epsilon$  subunit-cpGFP は、ATP が  $\epsilon$  subunit に結合することにより、cpGFP の蛍光強度が変化する<sup>3)</sup>。このため、 $\epsilon$  subunit-cpGFP を発現した酵母は、有機物の豊富な環境では ATP 産生が増加し、この結果蛍光強度が増加する。本方法を用いると、電極や試薬に依存しない BOD の連続的な測定が可能になると期待できる。

1) H. Imamura et al., *PNAS* (2009), 106(37),15651

2) Y. Kanno et al., *Anal. Sci.* in press

3) H. Yaginuma et al., *Sci Rep.* (2014), 4,6522

## 含ピレンジオール類を用いた James-Bull 法によるポリアミン類の分析

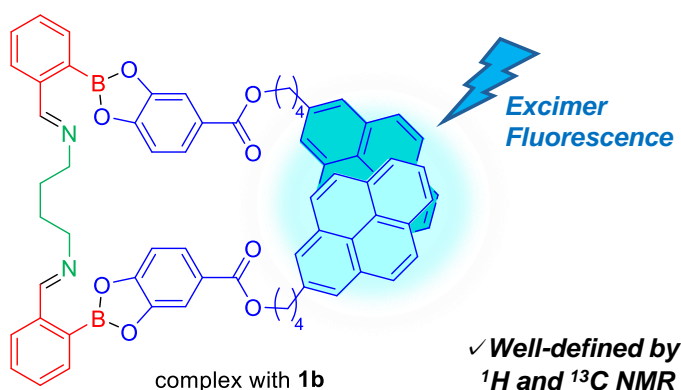
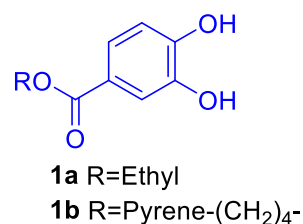
(同志社大学<sup>1</sup>) ○村上 綺更<sup>1</sup>・濱口 尚斗<sup>1</sup>・中村 光<sup>1</sup>・太田 哲男<sup>1</sup>・大江 洋平<sup>1</sup>  
 Analysis of polyamines by the James-Bull method using a diol having pyrene moiety (<sup>1</sup>Doshisha University) ○Kisara Murakami,<sup>1</sup> Naoto Hamaguchi,<sup>1</sup> Akira Nakamura,<sup>1</sup> Tetsuo Ohta,<sup>1</sup> Yohei Oe<sup>1</sup>

Pyrene-tethered diol was prepared by the condensation reaction of 1-pyrenebutanol with 3,4-dihydroxybenzoic acid. 1,4-Diaminobutane was treated with the prepared diol and 2-formylphenylboronic acid in acetone to form the complex, which showed the expected excimer fluorescence at 475 nm. The linkage of the three components was investigated by <sup>1</sup>H NMR experiments. After exploring qualitative analysis, consideration is given to the opportunities for possibility of quantitative analysis.

**Keywords :** Fluorescence; Polyamine; Excimer; Pyrene; James-Bull method

ポリアミン類は生体内に低濃度で存在し、細胞の成長などの役割を果たすことから、分析が非常に重要である。我々は James-Bull 法を応用し、ポリアミン類に複数個のピレン誘導体を結合させることで、これらを「エキシマー蛍光ラベル化」し、蛍光検出する手法の開発に取り組んでいる<sup>1)</sup>。本発表では、目的の「エキシマー蛍光ラベル化」に関する NMR 実験と定量評価の検討結果について報告

する。はじめに、ethyl 3,4-dihydroxybenzoate (**1a**), 2-formylphenylboronic acid および 1,4-diamino butane を重溶媒中にて混合し、<sup>1</sup>H NMR 測定を行った。その結果、acetone-d<sub>6</sub> 中、室温下、上記の三成分を 2 : 2.2 : 1 のモル比で混合すると、ほぼ定量的に目的の付加生成物を与えることがわかった。次に、**1a** を含ピレンエステル **1b** に変更し、同様の反応条件にて三成分の集積を行ったところ、含ピレンエステルでも類似した付加生成物を与えることが <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR により確認できた。得られた付加生成物の蛍光分析を行ったところ、ピレン由来のエキシマー蛍光が観測された。これにより目的の「エキシマー蛍光ラベル化」が達成できたと言える。この手法によるアミン濃度の定量評価については現在検討中であり、その結果も併せて報告する。



- 1) 村上綺更, 濱口尚斗, 太田哲男, 大江洋平, 日本化学会第 104 春季年会, P1-1vn.

## 分裂酵母のグルコースシグナル伝達経路を用いたドーパミンバイオセンサーの検討

(東京科学大生命理工<sup>1</sup>) ○森本 佳月<sup>1</sup>・長田 俊哉<sup>1</sup>

Investigation of conditions for a dopamine biosensor using the glucose signaling pathway in fission yeast(<sup>1</sup>*Graduate School of Life Science Technology, Institute of Science Tokyo*,) ○Kazuki Morimoto,<sup>1</sup> Toshiya Osada<sup>1</sup>

Since G protein-coupled receptors (GPCRs) are involved in diverse signal transductions in vivo and cause various diseases, it is expected to construct a novel ligand discovery system for orphan GPCRs. In this study, we used fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*), which has a GPCR signaling pathway similar to that of mammals, as a foothold for the construction of a novel ligand discovery system. By incorporating green fluorescent protein (GFP) downstream of the signal pathway in fission yeast, we constructed an assay system that can detect ligand responses as fluorescence changes. Based on this system, the G protein and adenylate cyclase in the pathway were replaced with those from mouse. In this study, we explored the potential application of this system for dopamine receptor agonist and antagonist discovery. As a result, ligand-specific responses were confirmed by optimizing the conditions. The application of this system to the antagonist search for the same receptor was also evaluated.

**Keywords :** *G protein-coupled receptor; dopamine receptor; Schizosaccharomyces pombe*

G タンパク質共役受容体 (GPCR) は生体内で多様なシグナル伝達に関与し、さまざまな疾患の原因となることから、オーファン GPCR に対する新規リガンド探索系の構築が期待されている。本研究では、新規リガンド探索系構築の足がかりとして、哺乳類に類似した GPCR のシグナル経路を有する分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を利用した。分裂酵母におけるシグナル経路の下流に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を組み込むことにより、リガンド応答を蛍光変化として検出可能なアッセイ系を構築した。この系を基に、経路内の G タンパク質およびアデニル酸シクラーゼを、マウス由来のものに置換した。(Fig. 1) 本研究では、この系を用いてドーパミン受容体のアゴニストおよびアンタゴニスト探索への応用可能性を探った。その結果、条件を最適化したことで、リガンド特異的な反応を確認した。また、同受容体のアンタゴニスト探索への適用についても評価を行った。

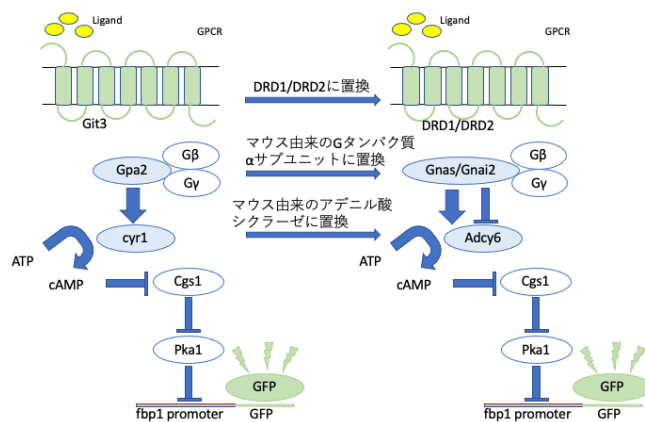


Fig.1 改変したシグナル伝達経路における受容応答の様式図

## 高分子ミセルを用いた光線力学療法

(米子高専物質工学科<sup>1</sup>・米子高専物質工学専攻科<sup>2</sup>・米子高専総合工学科・化学バイオ部門<sup>3</sup>・国立台湾中興大学理学部化学科<sup>4</sup>) ○松本 大知<sup>1</sup>・八尾 颯斗<sup>2</sup>・粂間 由幸<sup>3</sup>・Ping-Shan Lai<sup>4</sup>

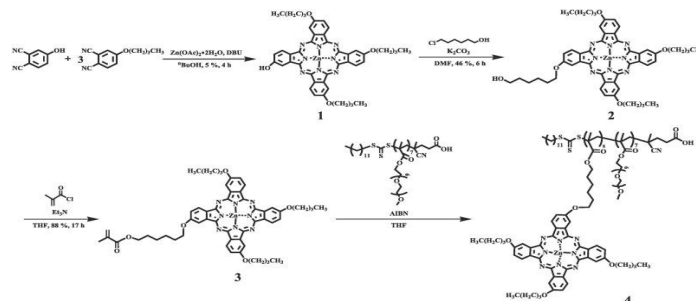
**Photodynamic therapy using polymeric micelles** (<sup>1</sup>National Institute of Technology, Yonago College Department of Materials Engineering,<sup>2</sup>National Institute of Technology, Yonago College Department of Materials Engineering advanced course,<sup>3</sup>Bioengineering, National Institute of Technology, Yonago College Department of Materials Engineering,<sup>4</sup>Chung Hsing University, Taiwan, Faculty of Science, Department of Chemistry) ○Daichi Matsumoto,<sup>1</sup> Hayato Yao,<sup>2</sup> Yoshiyuki Uruma,<sup>3</sup> Ping-Shan Lai<sup>4</sup>

PDT is a selective treatment that utilizes the photochemical reaction between light and a photosensitizer. It has the advantage of being noninvasive and less invasive for patients. However, the photosensitizer remaining in the body after PDT treatment reacts with sunlight and causes photosensitivity. To solve this problem, the development of photodynamic therapy using a drug delivery system (DDS) is expected. We have investigated polymeric micelles, which have advantages such as high accumulation in cancer tissue and low toxicity, as nanocarriers for DDS.

In this study, we synthesized zinc butoxyphthalocyanine-containing block copolymers and succeeded in developing new polymeric micelles. We also clarified that the critical micelle concentration (CMC) was 0.16 mg/mL and performed photocytotoxicity tests at CMC using cervical cancer cells (HeLa) and breast cancer cells (MCF-7). The results of photocytotoxicity will be presented on the day.

**Keywords :** Cancer; PDT; Photosensitizer; DDS; Polymeric micelles

PDT は光と光増感剤の光化学反応を利用した選択的治療法であり、非侵襲的で患者への負担が少ない利点がある。しかし、PDT 治療後、体内に残留した光増感剤が太陽光と反応し、光線過敏症を引き起こす<sup>1)</sup>。この問題を解決するために、ドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いた PDT の展開が期待されている。我々は、癌組織への集積性が高く、毒性が低い利点を持つ高分子ミセルを DDS のナノキャリアとして検討してきた。本研究では、亜鉛ブトキシフタロシアニン含有ブロック共重合体を合成し、新規高分子ミセルの開発に成功した<sup>2)</sup>。また、臨界ミセル濃度(CMC)が 0.16 mg/mL であることを明らかにし、子宮頸癌細胞 (HeLa) と乳癌細胞(MCF-7)を用いて CMC での光細胞毒性試験を行った。当日は光細胞毒性の結果を発表する予定である。



- 1) Zheng, Y., Li, Z., Chen, H., Gao, Y. : *Eur.J. Pharma.Science* 144,105213(2020)
- 2) Uruma, Y., Yao, H., Altannavch, B., Hara, N., Chen, L., Lai, P. : *Result in Chemistry*, 7,101499(2024)

## プラズモニックチップ上に光化学反応で結合したビオチンによる Cy5-ストレプトアビジン検出

(関西学院大学<sup>1</sup>・埼玉工業大学<sup>2</sup>) ○谷口 萌衣<sup>1</sup>・浅野 恭平<sup>1</sup>・名和 靖矩<sup>1</sup>・田中 睦生<sup>2</sup>・田和 圭子<sup>1</sup>

Detection of Cy5-streptavidin on the plasmonic chip photochemically modified with Biotin (<sup>1</sup>Kwansei Gakuin University, <sup>2</sup>Sitama Institute of Technology) ○Moe Taniguchi,<sup>1</sup> Kyohei Asano,<sup>1</sup> Yasunori Nawa,<sup>1</sup> Mutuo Tanaka,<sup>2</sup> Keiko Tawa<sup>1</sup>

The plasmonic chip is a substrate with a wavelength-sized structure covered with thin metal layers, and an electric field enhancement based on the plasmon resonance can be provided. In this study, a photoresponsive molecule (4-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)benzoic acid) (B-O-MBA) conjugated to the chip surface reacted with biotin-maleimide in the irradiation spots and the fluorescence intensity of Cy5-labeled streptavidin (Cy5-SA) was detected using the biotin-avidin interaction. The fluorescence images of Cy5-SA prepared at 1 nM and 10 nM were observed by upright-inverted fluorescence microscopy with transmission light. As a result of the analysis, the promotion rate of reaction was around 3.

**Keywords :** Plasmon, photochemical reaction, biosensor, Biotin

プラズモニックチップは金属で覆われた波長サイズの構造を持つ基板で、プラズモン共鳴による電場増強が生じる。光応答性分子（4-((2-formyl-3-methylphenyl)thio)benzoic acid) (B-O-MBA) を修飾したチップに可視光を照射すると、光化学反応により照射箇所のみ中間体が生成され、マレイミドと結合できるようになる。本研究では、光照射スポットにのみ形成された B-O-MBA 中間体とビオチン-マレイミドを結合させて補足界面を形成し、Cy5 標識ストレプトアビジン(Cy5-SA)の蛍光強度計測からビオチン-アビジン相互作用を評価した。さらにこの方法によるマルチアレイ型の高感度バイオセンサーの構築を目指した。

洗浄したカバーガラスにピッチ 480 nm、溝深さ 30 nm の同心円状（ブルズアイ型）アレイのレプリカを光硬化性樹脂(PAK-02-A)で光ナノインプリント法により調製した。この基板に RF スパッタ法で Ti、Ag、Ti、ZnO、SiO<sub>2</sub>をこの順で成膜してプラズモニックチップを作製した後、表面をアミノ化した。さらにイエロールームで B-O-MBA をアミド結合で修飾した。正倒立顕微鏡を用いて基板の裏面から水銀ランプ光( $\lambda = 414 \pm 23$  nm)を 100 倍対物レンズで照射し中間体を形成した。その後 1 nM と 10 nM に調製された Cy5-SA 溶液を加え、これらの蛍光像を正倒立蛍光顕微鏡で観察した。解析の結果、反応促進率はおよそ 3 倍であった。また、1 枚のプラズモニックチップ内で照射スポットごとに濃度が異なる Cy5-SA の結合量を評価することができ、マルチアレイ化も実行できた。

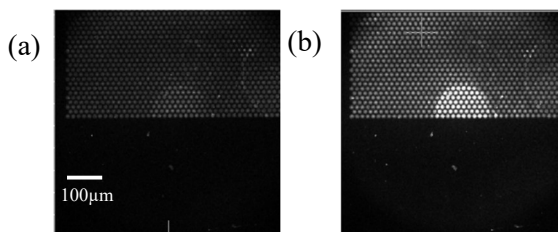


Figure 1. 光化学反応で形成したビオチン領域に結合した Cy5-SA の蛍光像: (a) 1 nM、(b) 10 nM。バーは 100  $\mu$ m。

## ポリグリセロール修飾酸化グラフェンを用いたナノメディシンの開発と抗がん剤への応用

(岡山大学<sup>1</sup>) ○吉岡 瑠那<sup>1</sup>・仁科 勇太<sup>1</sup>

Development of nanomedicines using polyglycerol-modified graphene oxide and its anticancer application (<sup>1</sup>*The Univ. of Okayama*) ○Runa Yoshioka<sup>1</sup>, Yuta Nishina<sup>1</sup>

Nanomedicines can act on cancer cells through the accumulation of nanoparticles in tumor tissue with EPR effect, reducing side effects.

Therefore, polyglycerol with a highly branched structure containing many hydrophilic OH groups was modified on the surface of graphene oxide to enhance biocompatibility. The graphene oxide-polyglycerol composite was complexed with cisplatin.

The behavior of drug release at different pH was confirmed in vitro and the tumor tissue accumulation of nanoparticles in vivo using mice.

**Keywords :** Graphene oxide, Nanomedicine, Polyglycerol

ナノメディシンは腫瘍組織へのナノ粒子の蓄積 (EPR 効果) により、がん細胞に作用し、副作用を軽減できると考えられている。<sup>1</sup>

用いるナノキャリア粒子として酸化グラフェン (GO) に着目した。GO は高い比表面積を持つシート状の炭素材料であり、表面に豊かな酸素官能基 (ヒドロキシ基、エポキシ基、カルボキシ基) を持っている。この多様な酸素官能基により、表面修飾を容易に行うことができる。しかし、GO 単体では生体内環境下でタンパク質の吸着が起こり、ドラッグデリバリーシステムが十分に働かなくなる。タンパク質吸着は疎水性相互作用と静電相互作用に影響を受けるため、非常に高い親水性を持つ官能基をつけることでタンパク質吸着を防ぐことができ、生体親和性を高めることができる。

そこで本研究では、従来検討されてきたポリエチレングリコールよりも親水性が高い OH 基を多く含む高分岐構造を有するポリグリセロール (PG) に着目した。PG は、グリシドールを GO 表面のヒドロキシ基と反応させることで成長させ、カルボキシ化を行い、シスプラチンを複合化させた (Figure 1)。<sup>2</sup>

pH 応答性によりがん細胞内でより多くの薬物放出を行うことを目指した。その結果、*in vitro* で薬物放出挙動の pH 応答性が確認できた。また、ナノ粒子に蛍光色素を結合させ、マウスを用いて *in vivo* でナノ粒子の腫瘍組織の蓄積を検討した。詳細は当日ポスターにて報告する。

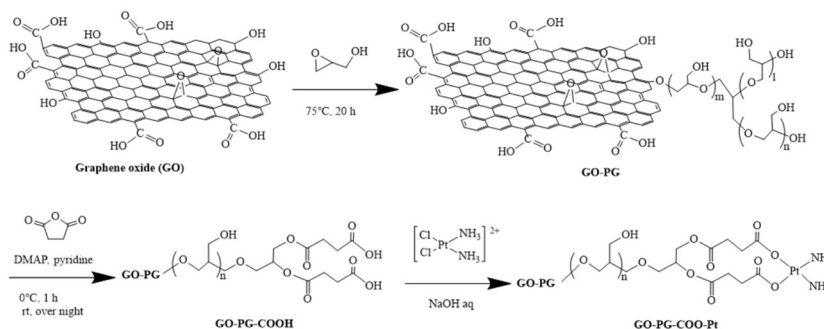


Figure1. シスプラチンを複合化させたポリグリセロール修飾酸化グラフェンの合成法

1) Sun T, Zhang Y, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 12320-12364 (2014). 2) Zhao L, Xu Y, Chen X, *et al.*, *Adv. Funct. Mater.*, **24**, 5348-5357 (2014).

## $\beta$ -カロテンの化学酸化によるアポカロテノイド類の生成とクロマトグラフィー分析

(関学大・生命環境) ○森田 壮, 浦上千藍紗, 橋本秀樹

Production of Apocarotenoids via Chemical Oxidation of  $\beta$ -Carotene and Chromatographic Analysis (Kwansei Gakuin University, School of Biological and Environmental Sciences) Sou Morita, Chiasa Uragami, Hideki Hashimoto

Astaxanthin, a type of carotenoid, is known to decompose into apocarotenoids through oxidation by  $\text{KMnO}_4$ . In contrast, the oxidative degradation pathway of  $\beta$ -carotene, another carotenoid, has not been extensively analyzed. This study aimed to determine the optimal conditions for efficiently producing apocarotenoids by oxidizing  $\beta$ -carotene using  $\text{KMnO}_4$ <sup>1)</sup>. Open-column chromatography was employed to separate and purify the resulting products, confirming the degradation into multiple compounds. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was performed on the obtained products, and the results (Figure 1) were used to further optimize the reaction conditions. This research seeks to enhance the understanding of the oxidative degradation mechanism of  $\beta$ -carotene and contribute to the development of synthetic methods for apocarotenoids.

**Keywords :** apo-carotenoid ;  $\beta$ -carotene

カロテノイドの一種であるアスタキサンチンは、 $\text{KMnO}_4$ による酸化反応でアポカロテノイドに分解されることが知られている。一方で、同じくカロテノイドである $\beta$ -カロテンの酸化分解経路については、詳細な解析が行われていない。

本研究では、 $\text{KMnO}_4$ を用いて $\beta$ -カロテンを酸化<sup>1)</sup>し、アポカロテノイド類を効率的に生成するための最適条件を検討した。さらに、生成物の分離・精製にはオープンカラムクロマトグラフィーを適用し、複数の化合物への分解を確認した。得られた生成物については HPLC 分析を実施し、その結果(Figure 1)に基づいて反応条件の最適化を進めた。本研究は、 $\beta$ -カロテンの酸化分解メカニズムの理解を深めるとともに、アポカロテノイド類の合成手法の開発に貢献することを目指している。

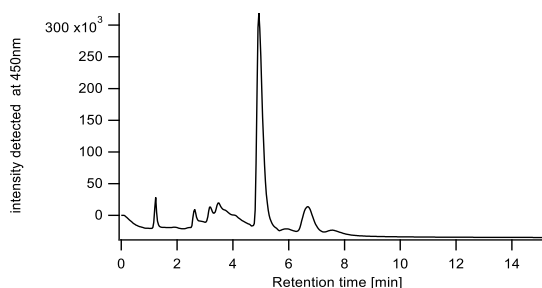


Figure 1. HPLC chromatogram of the apo-carotenoid solution

1) ACS Omega 2022, 7, 22341–22350

## 両親媒性分子による疎水性空間の構築と機能開拓

(関西学院大理工) ○松本尚子・佐藤 浩平

Construction of functional hydrophobic lumen by amphiphilic molecule (*Graduate School of Science and Technology, Kwansei Gakuin University.*) ○Naoko Matsumoto, Kohei Sato

Tubular assembly of proteins is known to be essential for various biological events. Inspired by these supramolecular assemblies found in nature, various artificial nanotubes have been synthesized and their functions have been studied in detail.<sup>1-3</sup> However, most of the nanotubes are formed in organic solvents and the construction of artificial nanotubes in aqueous conditions remains challenging. Here, we designed novel amphiphilic molecules

composed of hydrophilic oligo(ethylene glycol) (OEG) chains and hydrophobic aromatic units. The introduction of OEG chains is expected to improve the solubility in water, and the hydrophobic aromatic units were designed to form a hydrophobic functional lumen in aqueous environments. Details of the synthesis of amphiphiles and their functions will be presented at the conference.

**Keywords:** *Amphiphilic molecule; Biomimetics; Nanotube*

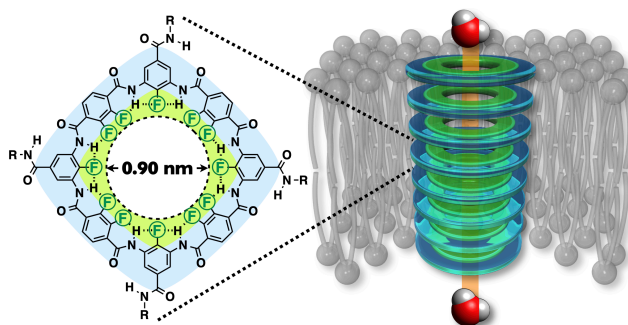


Figure. Schematic illustration of the formation of artificial nanotube through the self-assembly of fluorinated oligoamide macrocycle.

我々の体内にはチューブ状に自己集合して多様な機能を発現するタンパク質が数多く存在している。このような天然の構造体から着想を得て、現在に至るまで数多くの人工ナノチューブが合成されるとともに、その機能が詳細に調べられてきた<sup>1-3)</sup>。しかし、その多くは有機溶媒系であり、水系の環境下における人工ナノチューブの構築は依然として困難が付きまとっている。そこで本研究では、親水性オリゴエチレングリコール (OEG) 鎖を疎水性芳香族部位の周囲へと導入した両親媒性分子を新たに設計した。OEG 鎖の導入により、水への十分な溶解性を担保することが可能となり、水中に疎水的な機能性空間を構築できると期待している。本発表では、これらの化合物の合成とその機能について報告する予定である。

- 1) M. N. Tahir, A. Nyayachavadi, J.-F. Morin, S. Rondeau-Gagné, *Polym. Chem.* **2018**, 9, 3019.
- 2) D. Talukdar, J. M. Kumar, B. Gole, *Cryst. Growth Des.* **2023**, 23, 7582.
- 3) Y. Itoh, S. Chen, R. Hirahara, T. Konda, T. Aoki, T. Ueda, I. Shimada, J. J. Cannon, C. Shao, J. Shiomi, K. V. Tabata, H. Noji, K. Sato, T. Aida, *Science*. **2022**, 376, 738.

## 光誘起電子移動型電位感受性色素の開発

(宇都宮大学大学院 物質環境化学プログラム<sup>1</sup>・宇都宮大学機器分析センター<sup>2</sup>)

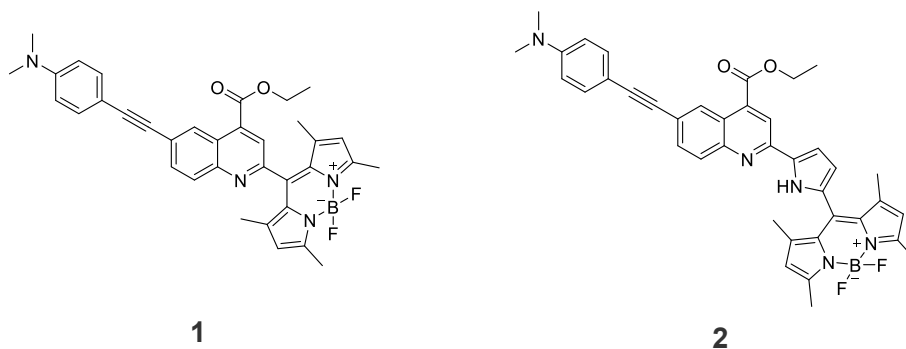
○齊藤聡志<sup>1</sup>・六本木 誠<sup>2</sup>・大庭 亨<sup>1</sup>

Development of PeT-type Voltage-sensitive dyes (<sup>1</sup> Department of Material and Environmental Chemistry, Utsunomiya University, <sup>2</sup> Center for Instrumental Analysis, Utsunomiya University) ○Satoshi Saito,<sup>1</sup> Makoto Roppongi,<sup>2</sup> Toru Oba<sup>1</sup>

We have been studied voltage-sensitive dyes with higher sensitivity. We synthesized bodipy analogues with a molecular wire that connects electron-donating aniline and electron-deficient quinoline moieties. Dye **1** gave a fluorescence peak at 545 nm in CHCl<sub>3</sub>. Dye **2** gave a sharp fluorescence peak at 521 nm and a broad emission band at 599 nm in diethyl ether. We examined their voltage-sensitivity by changing surface potential of SDS micelles that solubilized the dyes. The fluorescence intensity of Dye **1** increased monotonically with the change of the micellar environment, while the two fluorescence bands of Dye **2** increased at different rates. It is suggested that two excited states of Dye **2** were in response to the environmental changes differently.

**Keywords :** membrane potential, molecular wire, photo-induced electron transfer, quinoline, voltage-sensitive dye.

我々はより高感度な電位感受性色素の開発を目指し、電子移動型発光メカニズムを持つ bodipy 類縁体を検討してきた。本研究では、キノリン骨格を含む分子ワイヤーを接続した bodipy 類を合成した。キノリンの 2 位に bodipy を導入した **1** は、クロロホルム中で 545 nm に蛍光ピークを与えた。キノリンと bodipy の間にピロールを挟んだ **2** は、ジエチルエーテル中で 521 nm に鋭い蛍光ピークを、599 nm に幅広い蛍光発光帯を与えた。**1** を SDS ミセルに内包すると、ミセル表層の電位の変化に伴い、蛍光強度が単調に増加した。一方、**2** では、2 つの蛍光発光帯の増加率はそれぞれ異なり、2 つの状態が異なる環境応答をしていると考えられた。



## 極性官能基をもつジアリールエテン誘導体の光誘起細胞毒性

(龍谷大学<sup>1</sup>・産業技術総合研究所<sup>2</sup>) ○丸山 徳一<sup>1</sup>・須丸 公雄<sup>2</sup>・森下 加奈<sup>2</sup>・内田 欣吾<sup>1</sup>

Photoinduced cytotoxicity of Diarylethene derivatives with polar functional groups

(<sup>1</sup>Ryukoku University, <sup>2</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)) ○Norikazu Maruyama,<sup>1</sup> Kimio Sumaru,<sup>2</sup> Kana Morishita,<sup>2</sup> Kingo Uchida.<sup>2</sup>

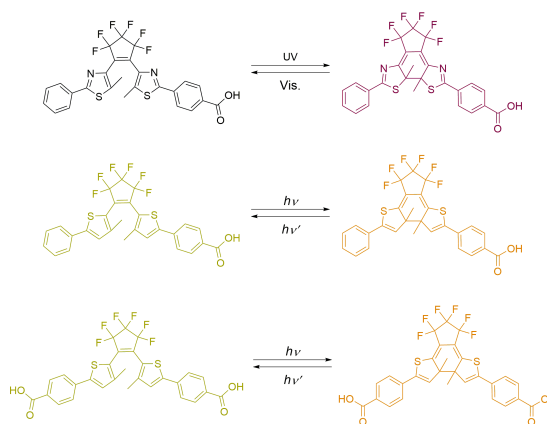
Diarylethene (DAE) is a photochromic compound that is reversibly isomerized by light. We have reported that the double-strand breaks of DNA are induced by repetitive cyclization and cycloreversion reactions when planar and hydrophobic DAE closed-ring isomers are intercalated between base pairs of DNA upon irradiation with blue light where both isomers have the absorbance. However, drugs that are too hydrophobic may have problems with solubility, bioavailability, etc. Therefore, it is one of challenges to improve the hydrophilicity of DAE. Adding polar functional groups to molecules is the easiest way to improve hydrophilicity, but the introduction of polar functional groups may alter membrane permeability and intercalation ability, which may affect photoinduced cytotoxicity. In this study, we evaluate the effect of DAE derivatives with added polar functional groups on photoinduced cytotoxicity and report the results.

**Keywords :** Photochromism; Diarylethene; Photoinduced cytotoxicity; polar functional group

ジアリールエテン(DAE)は光により可逆的に異性化するフォトクロミック化合物である。我々は分子平面性の高く疎水性の高いDAEの閉環体がDNAの塩基対間に挿入された状態で開環/閉環両異性化を起こす波長の光を照射することでDNAのdouble-strand breaksを誘起し、光照射部の細胞のみを殺傷することを報告している<sup>1)</sup>。しかし、疎水性が高すぎる医薬品は溶解性やバイオアベイラビリティ等に問題が出る恐れがあり、DAEにおいても親水性の向上は課題の一つである。

極性官能基を分子に加えることは親水性向上の最も単純な手段であるが、極性官能基導入によって膜透過性やインターカレート能が変化し、光誘起細胞毒性に影響を及ぼす可能性がある。本研究では極性官能基を加えたDAE誘導体(Scheme 1)の光誘起細胞毒性への影響を評価し、これを報告する。

1) Y. Nakagawa, T. Hishida, E. Hatano, K. Sumaru, K. Morishita, K. Kirito, S. Yokojima, Y. Sakamoto, S. Nakamura, K. Uchida, *J. Med. Chem.*, **2023**, 66, 5937-5949.



**Scheme 1.** 本研究で使⽤した DAE 誘導体の分子構造とフォトクロミック反応

## EGFR 変異体を標的とした膜局在性ゲフィチニブの合成と阻害活性評価

(名工大院工) ○三田村 啓史・筒井 啓太・深谷 陽子・築地 真也

Synthesis and evaluation of membrane-localizable gefitinib derivatives targeting an EGFR mutant (*Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology*) ○Keishi Mitamura, Keita Tsutsui, Yoko Fukaya, Shinya Tsukiji

Once inside the cell, inhibitors “diffuse” and bind to specific proteins, thereby blocking their activity. However, the target proteins of these inhibitors are often localized to specific membranes or organelles within the cell. Therefore, we hypothesized that the inhibitory effect could be dramatically improved by “self-localizing” the inhibitor to the target protein's localized region, rather than allowing the inhibitor to diffuse freely within the cell. By concentrating the inhibitor in the localized region of the target, its local concentration can be increased, potentially improving both the inhibitory effect and specificity. In this study, we present a proof-of-concept demonstration of this strategy using gefitinib, a compound that targets epidermal growth factor receptor (EGFR) mutants. The presentation will cover the design and synthesis of self-localizable gefitinib derivatives and an evaluation of their inhibitory activity against EGFR mutants.

*Keywords: Inhibitor, Gefitinib, Epidermal Growth Factor Receptor, Plasma Membrane*

阻害剤は一般に、細胞内を“拡散”し、特定のタンパク質に結合することでその活性を阻害する。一方、阻害剤の標的となる癌・疾患関連タンパク質は細胞内の特定の膜やオルガネラに局在していることが多い。そこで我々は、細胞内で阻害剤を“拡散”させるのではなく、標的タンパク質の局在領域に“自己局在”させることができれば、阻害効果を飛躍的に向上させられるのではないかと考えた。阻害剤を標的の局在領域に集めることによって、標的周辺における阻害剤の局所濃度が高まり、阻害効果や特異性を向上できるものと期待される。また、局所的に阻害剤濃度を高めることができれば、親和性が低くて十分な阻害効果が得られなかったような阻害剤でも高い阻害効果を発揮させられる可能性が期待される。

本研究では、上皮成長因子受容体 (EGFR) 変異体を標的とするゲフィチニブを標的分子として、本戦略の概念実証に取り組んだ。EGFR は細胞膜上に局在し、細胞膜内膜付近に活性サイト (キナーゼドメイン) を有するため、細胞膜内膜にゲフィチニブを自己局在させることにした。本発表では、膜局在性ゲフィチニブの設計、合成、および EGFR 変異体に対する阻害活性評価の詳細を報告する。

## 薬剤結合型ポリイオン液体微粒子 DDS 製剤の開発

(大分大院工<sup>1</sup>・大分大研究マネジメント機構<sup>2</sup>・大分大理工<sup>3</sup>・近畿大工<sup>4</sup>) ○熊田 陸人<sup>1</sup>・西口 宏泰<sup>2</sup>・北岡 賢<sup>4</sup>・信岡 かおる<sup>3</sup>

Synthesis of covalent drug polyionic liquid particle conjugates for DDS (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Oita University, <sup>2</sup>Research Management Organization, Oita University, <sup>3</sup>Faculty of Engineering, Kindai University, <sup>4</sup>Faculty of Science and Technology, Oita University) ○Rikuto Kumada,<sup>1</sup> Hiroyasu Nisiguti,<sup>2</sup> Satoshi Kitaoka,<sup>4</sup> Koaru Nobuoka<sup>3</sup>

Our group has been studying biopolyionic liquid-derived nanoparticles as biocompatible DDS carriers. In this study, drug loading via covalent bonding onto biopolyionic liquid nanoparticles was investigated. The nanoparticles were obtained by suspension polymerization of PDMAEMA with acetylcholine motifs and drug cisplatin derivatives were bound via ester bonds.

**Keywords :** Drug Delivery System; Ionic Liquid

現在、様々な DDS キャリアが報告されているが、それらの共通課題の一つに生体適合性の向上がある。そこで、我々のグループでは、生体イオン液体微粒子の適用を検討している。本研究では微粒子に対し、より安定な薬剤の搭載を目指し、アセチルコリンモチーフのポリイオン液体微粒子にシスプラチン誘導体をエステル結合を介して結合させた DDS 製剤を開発した(Fig.1)。この DDS 製剤は生体内に存在するエステラーゼによる薬剤放出が期待できる。

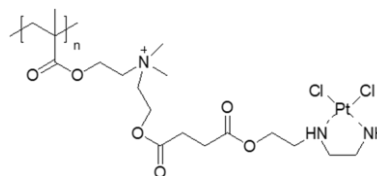


Fig.1 Cisplatin derivative-loaded polyionic liquid particles

DDS キャリアとなる PDMAEMA の微粒子は懸濁重合により検討した (Table.1)。Entry 2 の条件において平均粒子径 0.26  $\mu\text{m}$  という EPR 効果も期待可能なサイズの粒子が得られた。(Fig.2)。

Table1 Investigation of polymerization of DMAEMA by radical polymerization

Entry	DMAEMA[mL]	溶媒[mL]	PVP[g]	開始剤[g]	温度[°C]	時間[h]	粒子径[ $\mu\text{m}$ ]
1	0.50	5.0 (水:MeOH= 1 : 1)	0.05	0.02 (V-50)	60	24	1.00
2	0.50	5.0 (水:MeOH= 1 : 1)	0.10	0.02 (V-50)	60	24	0.26
3	0.50	5.0 (水:MeOH= 1 : 1)	0.10	0.04 (V-50)	60	24	0.77
4	0.50	5.0 (水:MeOH= 1 : 1)	0.10	0.02 (V-50)	60	3	0.43

合成された DDS キャリアを HeLa 細胞に添加したところ、1000 mg/L でも細胞はほぼ生存しており、高い生体適合性を示したことから DDS キャリアとしての有用性が示唆された。発表では、DDS キャリアへのシスプラチンの担持(Fig.1)も検討したので、併せて報告する。

## タンパク質内近接駆動型反応に基づく光薬理学リガンドの開発

(京工繊大<sup>1</sup>) ○藤原 壮汰<sup>1</sup>・瀬川 友香<sup>1</sup>・松尾 和哉<sup>1</sup>・和久 友則<sup>1</sup>・小堀 哲生<sup>1</sup>

Development of photoswitchable inhibitors based on the proximity-driven reaction on the surface of proteins (<sup>1</sup>Kyoto Institute of Technology) ○Sota Fujiwara,<sup>1</sup> Yuka Segawa,<sup>1</sup> Kazuya Matsuo,<sup>1</sup> Tomonori Waku,<sup>1</sup> Akio Kobori<sup>1</sup>

Photopharmacological ligands<sup>1</sup> are small-molecule ligands integrated with reversible photoswitches including azobenzene derivatives. Using reversibly photo-controllable ligands, their pharmacological effects can be precisely controlled with high spatiotemporal resolution through light illumination, thereby promising significant enhancements in selectivity and toxicity. However, we usually suffer from the potent difficulties of the discovery of the effective photopharmacological ligands due to the lack of rational and logical strategies to design the photoswitchable ligands. To overcome this drawback, the DNA encoded library (DEL)<sup>2</sup> for photoswitchable inhibitors will be designed based on the proximity-driven bioorthogonal reactions on the surface of proteins. In this poster presentation, we report the results of our photofunctional DEL system for carbonic anhydrase (CA) as the target protein based on hydrazone formation.

**Keywords :** photopharmacology; DNA encoded library; photoswitch; bioorthogonal reaction

タンパク質の小分子リガンドに、可逆的な光応答性を示すアゾベンゼンなどの光スイッチ分子を融合した光薬理学リガンド<sup>1</sup>は、操作性に優れた外部刺激である「光」を用いることで、任意の時空間でリガンド効果を発揮させることができる。光薬理学リガンドを獲得するためには、光スイッチ分子をリガンド骨格へ導入する必要があるが、単純に導入してもその効果に光応答性がなかったり、リガンド効果自体が無くなったりすることも多い。そのため、効果的な光薬理学リガンドの開発は、偶発性に大きく依存しているのが現状であり、光薬理学の戦略を適用できるタンパク質は極めて限定的である。

本研究では、タンパク質表面での近接効果による生体直交反応を利用し、光薬理学リガンドを探索するための DNA encoded library (DEL)<sup>2</sup>法の確立を目指した。標的タンパク質として炭酸脱水酵素 (CA) を選択し、そのリガンドである benzenesulfonamide にアルデヒド基を導入したアンカー化合物と、ヒドラジン基を導入したアゾベンゼン誘導体を調整した。これらを用いて、光応答性ヒドラゾン誘導体を合成し、その CA 阻害活性および光応答性を評価した。さらに、DEL 法への展開を目指し、アンカー化合物と DNA 鎖を付与したヒドラゾン型アゾベンゼン誘導体を連結させ、定量 PCR 法により、CA への結合活性を評価した。本発表では、これらの詳細と CA の光薬理学リガンドを効率的に獲得するための DEL 法に関して報告し、議論する。

1) P. Kobauri, F. J. Dekker, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, 62, e202300681.

2) A.L. Satz, A. Brunschweiler, M. E. Flanagan, *et al. Nat. Rev. Methods Primers*, **2022**, 2, 3.

## 立体反発誘導型ねじれ型分子内電荷移動(sr-TICT)に基づく蛍光プローブの開発

(慶大院薬) ○杉本 瑞樹・佐々木 栄太・大野 久史・花岡 健二郎

Development of fluorescence probes based on steric repulsion-induced twisted intramolecular charge transfer (sr-TICT) (*Graduate School of Pharmaceutical Science, Keio University*)

○Mizuki Sugimoto, Eita Sasaki, Hisashi Ohno, Kenjiro Hanaoka

Fluorescence probes show high sensitivity and ease of use for detecting biomolecules. Recently, we demonstrated that the fluorescence of rhodamine dyes, which are widely used in bioimaging, can be quenched through the steric repulsion-induced twisted intramolecular charge transfer (sr-TICT)<sup>1)</sup>. In this study, we applied this quenching mechanism to develop novel fluorescence probes in which a fluorescence is restored upon cancellation of the intramolecular steric repulsion by the specific reactions with the target molecules. Specifically, we designed and synthesized fluorescence probes by introducing a bulky benzyl substituent to the nitrogen atom at 3-position of the xanthene ring in Rhodamine 6G, generating the steric repulsion with the methyl group at 2-position of the xanthene ring to quench a fluorescence via sr-TICT. These probes exhibited a negligible fluorescence in PBS but showed a large increase in fluorescence intensity upon addition of the target molecules, while the benzyl group was eliminated as an (imino)quinone methide<sup>2)</sup>. This molecular design can be widely applied to enzymatic reactions involving (imino)quinone methide elimination, thus would provide a promising approach for the development of new fluorescence probes that have not previously developed by the conventional methods.

**Keywords:** Fluorescence probe; rhodamine; quenching mechanism.

発蛍光によって生体分子を検出する蛍光プローブは、その高い感度と操作の簡便さから、生命科学研究において広く利用されている。新しいプローブを開発するためには、生体分子との反応前後で蛍光特性が変化する新たな原理を考案することが重要である。近年、我々は分子内立体反発に伴うねじれ型分子内電荷移動(sr-TICT)を誘導する分子デザインによって、ローダミン類の蛍光を消光させることに成功した<sup>1)</sup>。本研究では、sr-TICT 機構を応用し、標的分子との反応に伴う立体反発の解消によって蛍光が回復する新たなローダミン誘導体の開発を行った。具体的にはローダミン 6G のキサランテン環 3 位の窒素原子にかさ高い置換基（ベンジル誘導体）を導入し、2 位のメチル基との立体反発による sr-TICT によって消光させたプローブを設計・合成した。本プローブは、PBS 中でほぼ無蛍光性を示し、標的分子によりベンジル基がキノンメチドとして脱離し、蛍光強度が大きく上昇した<sup>2)</sup>。本研究で用いた sr-TICT 機構に基づく分子設計法は、(イミノ)キノンメチドを脱離する様々な酵素反応等に応用可能であり、従来の手法では困難な新規蛍光プローブの開発に貢献することが期待される。

- 1) K. Hanaoka, *et al*, *Sci. Adv.*, **2024**, 10, eadi8847. 2) M. Sugimoto, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **2024**, 72, 810.

## 光に応答するチオールスカベンジャーの開発

(京工繊大<sup>1</sup>) ○佐野弘樹<sup>1</sup>・小場一平<sup>1</sup>・松尾和哉<sup>1</sup>・和久友則<sup>1</sup>・小堀哲生<sup>1</sup>  
Development of the photocontrollable thiol scavengers (<sup>1</sup>*Kyoto Inst. of Tech.*) ○Hiroki Sano,<sup>1</sup>  
Ippei Koba,<sup>1</sup> Kazuya Matsuo,<sup>1</sup> Tomonori Waku,<sup>1</sup> Akio Kobori<sup>1</sup>

Reactive oxygen species (ROS) generated during cellular activities damage the cells themselves, but cells can survive by effectively quenching ROS with thiol species such as glutathione, which are present in high concentrations in the cells. Thus, it is expected that the cancer cell-specific depletion of thiols can contribute to the cancer treatment, but the strategy of thiol depletion is still difficult due to the lack of spatiotemporal controllability of the conventional thiol scavengers. We have recently found that some azobenzene derivatives showed no reactivities with the reductive thiol species in the thermally stable *trans* form, but the effective reductive reaction in the metastable *cis* form. In this study, we develop photocontrollable thiol scavengers with high spatiotemporal resolution using these azobenzene derivatives. In the poster presentation, we will discuss the details and cellular application of our photocontrollable thiol scavengers.

**Keywords :** Glutathione; thiol depletion; *cis-trans* photoisomerization

細胞は活動する際に発生する活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) により、損傷を受けるが、細胞内に高濃度に存在するグルタチオンなどのチオール種によって ROS を消去することで致命的な損傷を免れ、生存している。そのため、ガン細胞選択的に細胞内のチオール種を枯渇できれば、ガン細胞を死滅させることができると期待されるものの、*N*-methylmaleimide や iodoacetamide のような既存のチオールスカベンジャーは時空間的に制御できない。

我々は、ごく最近、あるアゾベンゼン誘導体が熱安定な *trans* 体ではチオール種と反応せず、光照射後に生成する準安定な *cis* 体でのみチオール種と反応することを見出した。そこで、本研究では、このアゾベンゼン誘導体を利用し、時空間特異的に細胞内チオール種を消去できる光応答性チオールスカベンジャーを開発することを目的とした。

合成したアゾベンゼン誘導体に種々の波長の光を照射すると、*cis-trans* 光異性化反応を呈した。また、還元性グルタチオン (1-10 mM) と反応させると、光照射前の *trans* 体では全く反応しなかったのに対し、405 nm の光を照射し、*cis* 体リッチな光定常状態としたところ、 $k_2 = 6.1 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  で反応した。HPLC による生成物解析を行うと、アゾ基 (-N=N-) の還元体であるヒドラジン (-NH-NH-) 誘導体が確認された。以上から、開発したアゾベンゼン誘導体は光によって生じる *cis* 体だけが還元性チオール種と反応することが示唆された。

本発表では、開発した光応答性チオールスカベンジャーの詳細と細胞系への応用を報告し、議論する。

## アゾベンゼン誘導体の光異性化によるベシクルの形態変化

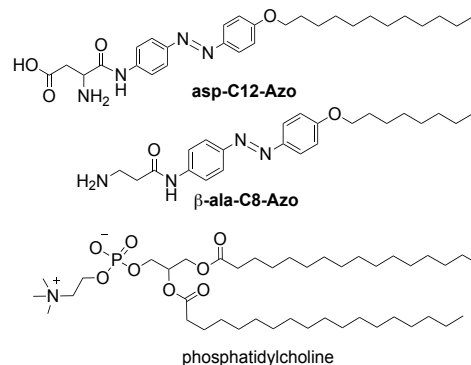
(福大理) ○塩路 幸生・笠井 香澄・出井 萌葉・石原 弘哲・岩下 秀文

Morphological Changes of Vesicles by Photoisomerization of Azobenzene Derivatives  
(Department of Science, Fukuoka University) ○Kosei Shioji, Kasumi Kasai, Moeha Dei,  
Hironori Ishihara, Hidefumi Iwashita

Photoisomerization of azobenzene is used in various fields. There are some reports that azobenzene derivatives, which have been functionally modified to increase their affinity with lipid membranes, are introduced into various vesicles composed of phospholipids, and the membranes undergo morphological changes by photo-irradiation. To clarify the mechanism of morphological changes of vesicles due to the photo-isomerization of the azobenzene derivatives, vesicles formed by phospholipid bilayer membranes including several azobenzene derivatives were prepared. When vesicles of different particle sizes including the azobenzene derivatives were mixed and irradiated, a reduction in the particle size distribution was observed. We found the narrowing of the particle size distribution width is more remarkable as the photo-isomerization rate of the introduced azobenzene derivative increases.

**Keywords :** azobenzene derivatives, photo-isomerization, phospholipid bilayer membranes, morphological changes

アゾベンゼンの光異性化は様々な分野で利用されている。脂質膜との親和性を高めるために修飾されたアゾベンゼン誘導体を、リン脂質からなる種々のベシクルに導入すると、光照射により膜の形態変化を起こすことが報告されている<sup>1)</sup>。今回我々は、アゾベンゼン誘導体の光異性化によるベシクルの形態変化のメカニズムを明らかにするために、リン脂質の極性官能基と相互作用するアミノ酸部分と、リン脂質の疎水性部分と相互作用するアルキル鎖をもつ2つのアゾベンゼン誘導体を合成し、それらのアゾベンゼン誘導体を含むリン脂質二重膜で形成されたベシクルを調製した。アゾベンゼン誘導体を含む異なる粒径のベシクルを混合し光を照射すると、粒径分布の減少が見られた。導入したアゾベンゼン誘導体の光異性化率が増加するほど、粒度分布幅の減少がより顕著であることがわかった。



**Fig. 1** Structure of **asp-C12-Azo** and **β-ala-C8-Azo**.

- 1) T. Lohmüller, *et. al. Langmuir*, **2017**, 33, 4083-4089. T. Hmamada, *et. al. Langmuir*, **2017**, 33, 2671-2676. K. Kasai, *et. al., J. Oleo Sci.*, **2022**, 71, 747-757. K. Shioji, *et. al., Chem. Pap.*, **2023**, 77, 3025-3034

## イオン性の置換基を有するクロロフィル誘導体の合成と物性

(龍谷大先端理工) ○角田優花・仲村明莉・宮武智弘

Syntheses and Properties of Chlorophyll Derivatives with an Ionic Substituent (*Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku Univ.*) ○ Yuka Sumida, Akari Nakamura, Tomohiro Miyatake

Chlorophyll molecules are natural photosynthetic pigments and generally exhibit poor water solubility. To enhance their solubility and form stable aqueous assemblies, hydrophilic ionic substituents were introduced. Using natural chlorophyll-*a* as the starting material, chlorophyll derivatives with cationic or anionic substituents were synthesized by replacing  $Mg^{2+}$  with two  $H^+$  and modifying vinyl and ester moieties at the 3- and 17<sup>2</sup>-positions. The properties including optical spectra of these ionic chlorophylls in aqueous solutions were investigated.

**Keywords :** Chlorophyll; Photosynthesis; Amphiphilic Molecules

天然色素であるクロロフィル分子は、 $\pi$ 共役系を持つテトラピロール構造と、その環状骨格の17位の側鎖に長鎖炭化水素基を持つ。そのため、クロロフィルは水に溶けにくく、水中での扱いが容易ではない。そこで、親水性のイオン性の置換基を導入することで、水に対する溶解性が向上するとともに、両親媒性をもつことにより、水中で安定な分子集合体を形成することが期待できる。ここでは、カチオン性またはアニオン性の置換基を有するクロロフィル誘導体(図1右)を設計・合成した。

天然から抽出したクロロフィル-*a*(図1左)を原料として、中心の  $Mg^{2+}$  を2つの  $H^+$  に置き換えたフリーベース体とし、その3位のビニル基ならびに17位のエステル部位を改変することで、17位の側鎖にカチオン性あるいはアニオン性の置換基をもつ **1** および **2**、3位にアニオン性の置換基をもつ **3** をそれぞれ合成した。ここでは、これらのイオン性クロロフィル類の水中での会合挙動および分光学的特性を検討する。

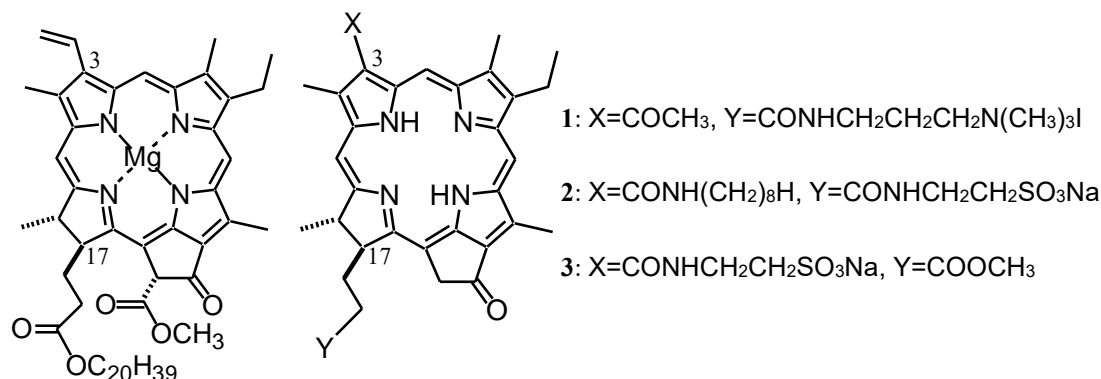


図1. クロロフィル-*a*(左)およびイオン性クロロフィル誘導体(右)の構造

## 細胞毒性をもつフォトクロミックジアリールエテンへの水溶性の付与

(龍谷大<sup>1</sup>・産総研<sup>2</sup>) ○神波 碧<sup>1</sup>・丸山 徳一<sup>1</sup>・須丸 公雄<sup>2</sup>・森下 加奈<sup>2</sup>・内田 欣吾<sup>1</sup>  
 Imparting water solubility to cytotoxic photochromic diarylethenes (<sup>1</sup>*Graduate School of Engineering, Ryukoku University*, <sup>2</sup>*National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*) Kamba Midori,<sup>1</sup> Maruyama Norikazu,<sup>1</sup> Sumaru Kimio<sup>2</sup>, Morishita Kana<sup>2</sup>, Uchida Kingo<sup>1</sup>

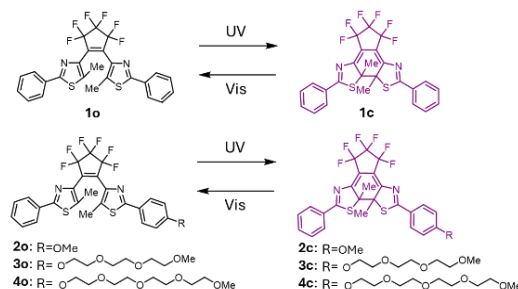
Diarylethene (DAE) is a photochromic compound that is isomerized by light. We have reported that the addition of DAE **1c**, which has two thiazole ring moieties, to cell culture medium of HeLa cells derived from human cervical carcinoma and irradiation with 436 nm blue light caused cell death only in the irradiation zone<sup>1)</sup>. The mechanism of cytotoxicity is thought to be that the DAE derivative intercalated between base pairs of DNA is irradiated with light of a wavelength at which both cycloreversion and cyclization reactions occur, and the repeated these reactions result in DNA double strand break (DSB)<sup>2)</sup>. This new cell-killing scheme has the potential to overcome the challenges of conventional photodynamic therapy, which is less effective in hypoxic environments within tumors. However, the challenge for actual in vivo use is to improve hydrophilicity. In this study, we designed and synthesized DAE derivative **2** with methoxy groups and DAE derivatives **3** and **4** with ethylene glycol chains and evaluated the improvement of hydrophilicity and photocytotoxicity against HeLa cells.

**Keywords** : cytotoxicity; diarylethene; water solubility, HeLa cells

ジアリールエテン(DAE)は光によって異性化するフォトクロミック化合物の一種である。我々は、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞の細胞培養液中に、チアゾール環をもつ DAE **1c** を添加し、436 nm の青色光を照射すると照射域のみで細胞が死滅することを報告した<sup>1)</sup>。細胞毒性のメカニズムは、

DNA の塩基対間にインターカレートした DAE 誘導体に、開環・閉環反応が共に起こる波長

の光を照射し、開環・閉環反応が繰り返されることで DNA の二重鎖破壊 (DSB) が起こるためだと考えられている<sup>2)</sup>。この新たな細胞殺傷スキームは、腫瘍内の低酸素環境で効果が低下する従来の光線力学療法の課題をクリアする可能性がある。しかし、実際に生体内で用いる上で、親水性の向上が課題である。そこで本研究では、メトキシ基を導入した DAE 誘導体 **2** とエチレングリコール鎖を導入した DAE 誘導体 **3, 4** を設計・合成し、親水性の向上と HeLa 細胞に対しての光細胞毒性について評価した。



**Scheme 1.** ジアリールエテン誘導体 **1, 2, 3, 4** のフォトクロミック反

- 1) K. Sumaru, K. Uchida, et al., *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 10957.
- 2) Y. Nakagawa, T. Hishida, E. Hatano, K. Sumaru, K. Morishita, K. Kirito, S. Yokojima, Y. Sakamoto, S. Nakamura, K. Uchida, *J. Med. Chem.*, **2023**, 66, 5937.

## オルトフェニレンジアミンで架橋されたクロロフィル二量体の合成と物性

(龍谷大先端理工) ○妹背 帆高・宮武 智弘

Synthesis and Properties of Chlorophyll Dimers Linked with an *o*-Phenylenediamine (Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku Univ.) ○Hodaka Imose, Tomohiro Miyatake

Chlorophyll and their derivatives often exhibit pigment–pigment interactions when the  $\pi$ -conjugate macrocycles are closely oriented. In this study, we synthesized novel chlorophyll dimers in which the two chlorophyll moieties are linked with *o*-phenylenediamine at the 3-position, and evaluated their optical properties.

**Keywords:** *Chlorophyll, Schiff Base, Dimer*

光合成色素であるクロロフィル類は可視～近赤外領域に特徴的な光吸収をもち、近接したクロロフィル分子間で色素間相互作用を示すことが知られている。これまで、エステルやアミド結合を介してクロロフィルを結合させた二量体分子が合成され、その色素間相互作用について検討されてきた。

本研究ではオルトフェニレンジアミンでクロロフィル誘導体の 3 位および 3' 位をシッフ塩基で架橋したクロロフィル二量体を合成し、その物性を検討した。まず天然より抽出したクロロフィル *a* を原料とし、3 位にホルミル基をもつ誘導体を得た。このホルミル基に対してオルトフェニレンジアミンを縮合させることで、クロロフィル二量体分子 **1** (図 1 左) を合成した。二量体分子 **1** の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルにおいては、隣りあうテトラピロール環の環電流による化学シフトの変化が観測された。また、この二量体分子 **1** はクロロホルムによく溶解し、693 nm に  $Q_y$  吸収極大を示し、対照となる単量体分子 **2** (図 1 右:  $\lambda_{\text{abs}}=690$  nm) と比較してやや長波長側に吸収帯を与えた。

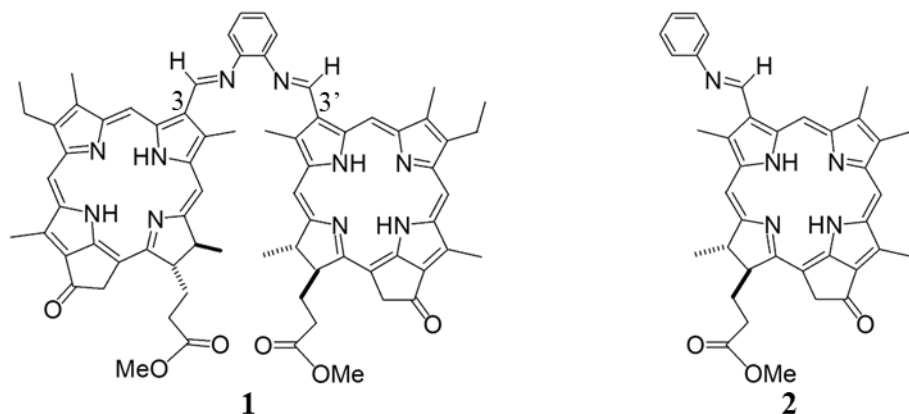


図1. シッフ塩基を有するクロロフィル誘導体

## 可逆的に光制御できる Aurora kinase 阻害剤の開発

(京工繊大<sup>1</sup>) ○宮城 喜美<sup>1</sup>・松尾 和哉<sup>1</sup>・和久 友則<sup>1</sup>・小堀 哲生<sup>1</sup>

Development of photoswitchable Aurora kinase inhibitors (<sup>1</sup>*Graduate School of Engineering, Kyoto institute of technology*) ○Kimi Miyagi,<sup>1</sup> Kazuya Matsuo,<sup>1</sup> Tomonori Waku,<sup>1</sup> Akio Kobori<sup>1</sup>

Aurora kinases are serine-threonine kinases that are essential for maintaining the mitotic checkpoint and chromosome segregation during mitotic cell division. Dysfunction of Aurora kinases results in the induction of polyploidy, through the failure of cell division.

Herein, we develop photoswitchable Aurora kinase inhibitors to control mitotic cell division with the high spatiotemporal resolution. Compound **1** was designed and chemically synthesized by converting the diphenylamide moiety in **ZM447439** to the azobenzene moiety. The inhibitory properties were explored through *in vitro* kinase assay and cell-based phenotypic assays. In this presentation, we report the details of photoswitchable Aurora kinase inhibitors.

**Keywords** : Photopharmacology; Photoswitchable inhibitors; Aurora kinase

オーロラキナーゼ<sup>1</sup>は、有糸分裂におけるチェックポイント制御や染色体分離を制御するセリン・スレオニンキナーゼであり、その機能異常によって細胞分裂が正常に進行せず、polyploidy 化される。

本研究では、光によって可逆的に制御できる光制御型オーロラキナーゼ阻害剤を開発し、細胞分裂を自在に操作することを目指した。標準的なオーロラキナーゼ阻害剤である **ZM447439**<sup>2</sup> (Fig. 1a) のジフェニルアミド構造をアゾベンゼン構造へと変換したオーロラキナーゼ阻害剤 **1** (Fig. 1b) を設計・合成した。**1** は、光照射前には安定かつ剛直な *trans* 体を形成し、種々の波長の光照射によって準安定な *cis* 体を与えることが吸収スペクトル解析より確認された。この *cis* 体の熱緩和時間は 4.14 分であった。**1** を用いて精製オーロラキナーゼによるキナーゼアッセイを行ったところ、光照射前の *trans* 体ではオーロラキナーゼを効果的に阻害し、光照射時の *cis* 体リッチな条件では阻害効果が大きく減弱した。さらに、**1** を用いて細胞系でのフェノタイプを確認したところ、オーロラキナーゼの基質である histone H3 のリン酸化が阻害されており、最終的に polyploidy 化した細胞が確認された。本発表では、光制御型オーロラキナーゼ阻害剤 **1** の詳細に関して報告し、議論する。

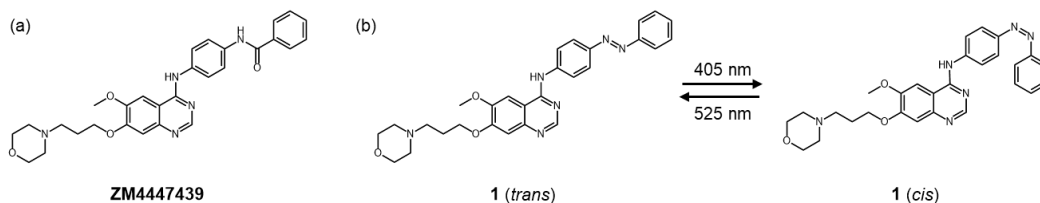


Fig. 1. (a) Chemical structure of **ZM447439**, (b) Photoswitchable Aurora kinase inhibitor **1**.

1. P. T. Stukenberg, *et al. Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, *11*, 1139367.
2. S. S. Taylor, *et al. J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 267-280.

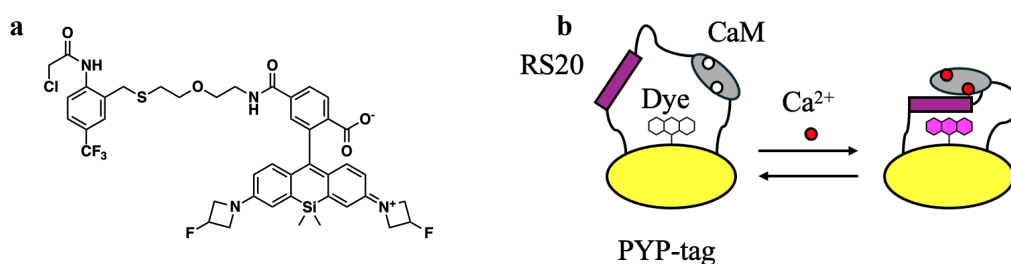
## Development of a near-infrared (NIR) fluorescent chemigenetic sensor for $\text{Ca}^{2+}$ based on photoactive yellow protein (PYP)-tag and JF<sub>635</sub>

(<sup>1</sup>Graduate School of Science, The University of Tokyo) ○Yuuki Saito,<sup>1</sup> Takumi Yanagimachi,<sup>1</sup> Takuya Terai,<sup>1</sup> Robert E. Campbell<sup>1</sup>

**Keywords:** Chemigenetic sensor, Near-infrared (NIR), Calcium ion, Fluorescence, Directed evolution

Calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is an important second messenger involved in many biological activities. To study  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics *in vivo*, near-infrared (NIR) fluorescence imaging tools with a bright fluorogenic  $\text{Ca}^{2+}$  response are ideal because of the better penetration of longer wavelength light through tissues. Currently, several  $\text{Ca}^{2+}$  sensors have been developed for NIR imaging, yet these conventional sensors have some problems, such as the lower brightness of the fluorescent protein-based biosensors and the lower cell penetration of the synthetic sensors. Recently, a new type of chemigenetic indicator, HaloCaMP,<sup>1</sup> was developed that combined advantages of both protein biosensors and synthetic sensors, by using HaloTag as a self-labeling tag, calmodulin (CaM) as a  $\text{Ca}^{2+}$  receptor, and the synthetic NIR fluorescent dye Janelia Fluor 635 (JF<sub>635</sub>). Inspired by this work, we have been focusing on expanding the palette of chemigenetic indicators by using other orthogonal self-labeling tag proteins to enable multiplex imaging. Our lab has already developed a family of new chemigenetic  $\text{Ca}^{2+}$  indicators, the PYCaMP series, which consist of CaM, photoactive yellow protein (PYP)-tag,<sup>2</sup> and a synthetic fluorescent ligand such as DMAC-CMK (green)<sup>3</sup> or PCAF-SP-Small (red).<sup>4</sup> However, NIR fluorescence  $\text{Ca}^{2+}$  indicators based on PYP-tag have not been developed yet.

In this study, we designed and synthesized a new NIR fluorescent ligand PCAF-JF<sub>635</sub>-Small (**Fig. 1a**). The synthesized ligand was then assayed with existing PYCaMP variants, leading to the discovery of a prototype sensor with a fluorescence response to  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\Delta F/F_0 = 1.2$ ) (**Fig. 1b**). Further optimization by directed evolution is ongoing to achieve higher  $\Delta F/F_0$  and higher fluorescence intensity.



**Figure 1.** a) Structure of PCAF-JF<sub>635</sub>-Small. b) Mechanism of the indicator based on PYP-tag.

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) Terai, T. *et al.* The 16th Symposium of Biorelevant Chemistry **2022**, P141. 4) Yanagimachi *et al.* The 104th CSJ Annual Meeting **2024**, H936-3pm-11.

## 光応答性を利用した酵素再利用システムの構築

(阪大院理<sup>1</sup>・阪大 ICS-OTRI<sup>2</sup>) ○能美 佳穂<sup>1</sup>・小林 裕一郎<sup>1,2</sup>・山口 浩靖<sup>1,2</sup>  
 Supramolecular Formation of Azobenzene-Modified Polymers with Cyclodextrin-Modified  
 Proteins (<sup>1</sup>Grad. Sch. of Sci., Osaka Univ., <sup>2</sup>ICS-OTRI, Osaka Univ.) ○Kaho Noumi,<sup>1</sup> Yuichiro  
 Kobayashi,<sup>1,2</sup> Hiroyasu Yamaguchi<sup>1,2</sup>

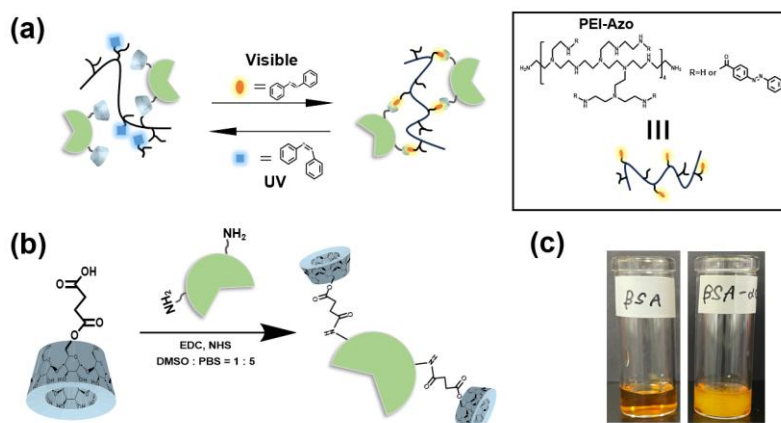
Enzymes are widely used in the chemical industry because of their diverse catalytic functions. However, enzymes themselves are often expensive, and it is extremely important to easily separate trace amounts of enzyme and the products for reuse. We aimed to create an enzyme recovery system that can homogenize or phase-separate enzymes in response to light via host-guest interactions.

In this study, BSA was chosen as a model protein instead of enzyme. Mono-substituted  $\alpha$ -cyclodextrin ( $\alpha$ CD) was synthesized and condensed with BSA to obtain BSA- $\alpha$ CD. When branched polyethyleneimine polymer with azobenzene as a side chain (PEI-Azo) was mixed with BSA- $\alpha$ CD, phase separation occurred. The formation of supramolecular complexes between  $\alpha$ CD and Azo modified on each polymer cross-links multiple polymers and makes it possible to phase-separate proteins in aqueous solution.

**Keywords :** Enzyme; Cyclodextrin; Azobenzene; Photo-stimuli; Phase-separation

酵素は多様な触媒機能を持つため化学工業において多く利用されている。しかし、酵素自身が高価な場合が多く、酵素と生産物を容易に分離して、再利用することが極めて重要となる。我々は、ホストゲスト相互作用を利用して光刺激により酵素を均一・不均一系に切り替えることができる回収システムの構築を目的とした。本研究ではモデルタンパク質として BSA を選択し、 $\alpha$ -シクロデキストリン( $\alpha$ CD)を修飾した BSA- $\alpha$ CD を合成した。

アゾベンゼン (Azo) を側鎖に持つ分岐ポリエチレンジイミンポリマー (PEI-Azo) と BSA- $\alpha$ CD を混合したところ、CD が Azo と超分子錯体を形成することによりポリマーと酵素が架橋され、水溶液中でタンパク質が相分離することがわかった。



**Figure 1.** (a) Schematic representation of reversible binding between proteins and polymers via interaction of photo-responsive Azo with  $\alpha$ CD. (b) Preparation of BSA- $\alpha$ CD. (c) Photographs of BSA (left) and BSA- $\alpha$ CD (right) mixed with PEI-Azo.

## コウジ酸をベースとしたタンパク修飾用ケージド化合物の開発

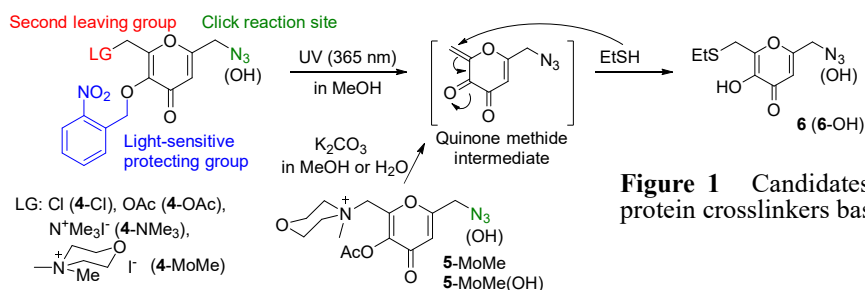
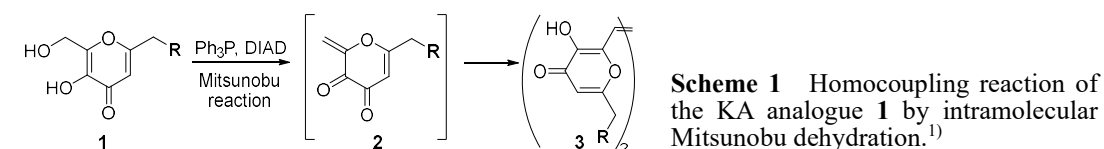
(阪公大院工) ○東 秀紀・永岡真至・長崎 健

Development of Kojic Acid-based Caged Compounds for Protein Modification (*Graduate School of Engineering, Osaka Metropolitan University*) ○Hideki Azuma, Shinji Nagaoka, Takeshi Nagasaki

In previous study, we identified a novel one-pot dimerization from the kojic acid (KA) analogues **1** occurring under the Mitsunobu reaction conditions. It was thought that the dimerization might proceed via generation of a quinone methide-like intermediate **2**. In this study, we tried to synthesize new KA-based photocleavable quinone methide precursors for the purpose of protein cross-linking. Caged compound **4s** and EtSH were dissolved in MeOH and then photoirradiated (365 nm, 100 W, 2 h). Formation of the EtSH adducts **6** (or **6-OH**) were observed in the cases of **4-Cl** (34%), **4-MoMe** (50%) and **4-MoMe(OH)** (67%). In the cases of acetyl-type compounds, the reactivity of **5-MoMe** (52%) against thiol was also lower than that of **5-MoMe(OH)** (82%) under the typical deacetyl condition. It is thought that the azido group might act suppressively on Michael addition of thiol to quinone methide intermediate.

**Keywords** : Kojic Acid; Caged Compound; Cross-linking; Quinone Methide; Michael Addition

我々は以前の研究で、コウジ酸から合成した誘導体 **1** に対して光延反応による脱水反応を行うと二量体 **3** が形成することを見出し、この反応がキノンメチド **2** を経由していることが示唆された (Scheme 1)<sup>1)</sup>。そこで本研究では、新たなタンパク架橋剤の開発を目的とし、コウジ酸をベースに UV 照射によりキノンメチド **2** を生成するようなケージド化合物 **4** の合成を試みた (Fig. 1)。MeOH 中、EtSH (4 eq) の存在下で光照射を行った結果、**4-Cl** (34%)、**4-MoMe** (50%) と **4-MoMe(OH)** (67%) でエタンチオール付加体 **6** の形成が確認された。一方、脱アセチル基をトリガーとした場合でも、アジド型の方が低い反応性を示したことからアジド基が付加反応に抑制的に働いている可能性が示唆された。



1) H. Azuma et al. *Tetrahedron*, **2021**, 94, 132314.

## ペプトイドを基にした新規人工核酸の開発とその応用研究

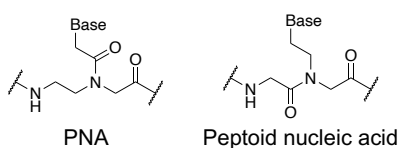
(国立衛研<sup>1</sup>) 横尾 英知<sup>1</sup>・武田 紗和<sup>1</sup>・出水 庸介<sup>1</sup>

Development of novel artificial nucleic acids based on peptoid and their application (<sup>1</sup>NIHS)  
Hidetomo Yokoo,<sup>1</sup> Sawa Takeda,<sup>1</sup> Yousuke Demizu<sup>1</sup>

PNA (Peptide Nucleic Acid) is a DNA mimic in which the sugar and phosphate group of DNA are replaced with *N*-(2-aminoethyl)-glycine. PNA can bind to DNA and show strong interactions, even short sequence matches, which is expected to lead to non-specific binding to nucleic acid sequences. Therefore, we focused on peptoid-based nucleic acid, which shows weaker interaction with complementary sequences than PNA. The length of nucleic acid required to recognize a nucleic acid is potentially extended. Thus, we aimed to develop a peptoid-based nucleic acid that can recognize long-chain nucleic acids with a moderate interaction. In this study, we designed and synthesized peptoid-based nucleic acids and analyzed their structural characteristics and interaction with complementary sequences.

**Keywords :** *PNA; Peptoid; Peptoid-based nucleic acids*

PNA (Peptide Nucleic Acid) は、DNA や RNA の糖とリン酸部位を N-(2-aminoethyl)glycine に置き換えた人工核酸であり、化学プローブや遺伝子発現を制御する創薬モダリティとして有用となる。一方で、核酸塩基配列への非特異的結合を抑制して高機能化する手法として、人工核酸の認識配列の伸張が試みられている<sup>1)</sup>。そこで我々は PNA の主鎖を N-置換型ペプチド (ペプトイド) へ変換することで、相補鎖配列への相互作用が弱まることに着目し<sup>2)</sup>、中程度の相互作用により長鎖核酸を認識しうるペプトイド核酸の開発することとした。ペプトイドは窒素原子にアルキル置換基を有するアミド結合を主鎖としており、PNA と同様に細胞内において高い化学的安定性を示す。本研究では、側鎖に核酸塩基を導入したペプトイド核酸を設計、合成し、その構造特性や相補鎖配列への相互作用解析を行った。



1) The relationship of recognition sequence and off-target of the antisense oligonucleotide has been reported. T. Yoshida, Y. Naito, K. Sasaki, E. Uchida, Y. Sato, M. Naito, T. Kawanishi, S. Obika, T. Inoue *Genes Cells* **2018**, 23, 448.

2) Peptoid-based nucleic acid has been reported. O. Almarsson, T. C. Bruice, J. Kerr, R. N. Zuckermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 7518.

## 蛍光性を有するトリフェニルメタン誘導体を用いた細胞内グアニン四重鎖の検出

(奈良高専物質工) ○奥村 大地・宇田 亮子

Detection of G-quadruplexes in cells by using fluorescence triphenyl methane derivative

(Department of Chemical Engineering, National Inst. of Tech., Nara College)

○Daichi Okumura, Ryoko Uda

Cationic triphenyl methane derivatives upon binding with nucleic acids afford fluorescence in the visible region. We have reported that triphenyl methane derivatives showed affinity to G-quadruplexes formed by oligonucleotide and fluorescence of the ligand was increased. The purpose of this work is to detect G-quadruplexes within cells by using triphenylmethane derivatives.

Confocal fluorescence microscopic observation shows that fluorescence of brilliant green (BG) was obtained from nucleuses and cytoplasm of fixed HeLa cells (cervical carcinoma). Confocal images of nuclease treated cells indicate that the fluorescence is attributed to BG binding with DNA (Fig.). Furthermore, the results of urea treated cells suggest that the fluorescence can be explained by BG binding with G-quadruplex.

**Keywords :** G-quadruplex; Triphenyl methane; Fluorescence probe; Cancer cell

カチオン性色素であるトリフェニルメタン誘導体は、核酸との結合により可視領域に蛍光を発することが知られている。我々はこれまでに、トリフェニルメタン誘導体がオリゴヌクレオチドで形成したグアニン四重鎖に結合し蛍光を発することを見出しており、トリフェニルメタン誘導体はグアニン四重鎖のよいプローブとして期待できる。そこで本研究では、トリフェニルメタン誘導体を用いた細胞内のグアニン四重鎖検出を試みた。

固定したヒトの子宮頸ガン細胞である HeLa 細胞を用いた観察像より、トリフェニルメタンであるブリリアントグリーン (BG) の示す蛍光は核内と細胞質内に存在することが明らかになった。核酸分解酵素で処理をした細胞の観察像より、BG の蛍光は DNA への結合に由来することが明らかになった。(Fig.) 尿素で処理をした細胞の観察像より、BG の蛍光はグアニン四重鎖への結合由来であることが示された。

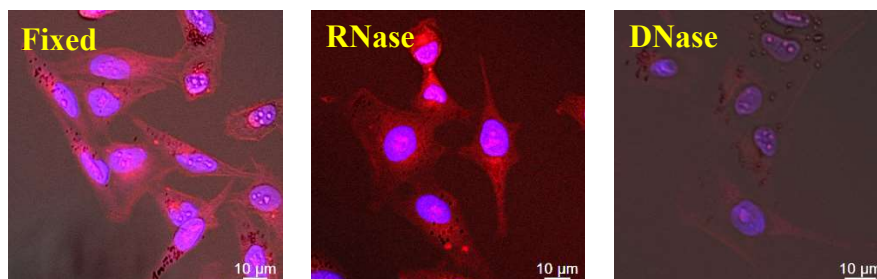


Fig. Confocal imaging of simply fixed HeLa cells and HeLa cells treated by RNase and DNase.

## 切断された DNA の液滴内修復能の解析

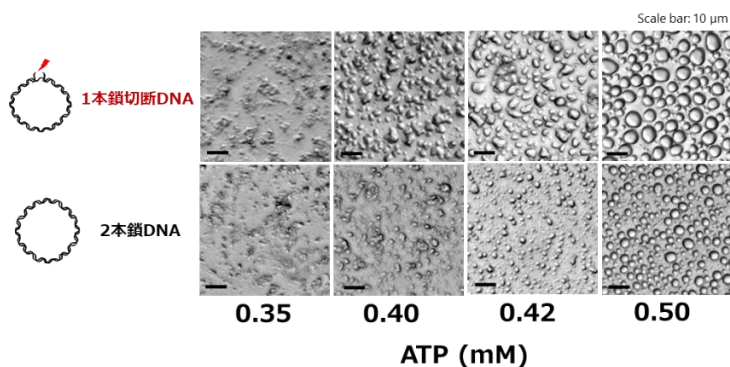
(静大理<sup>1</sup>・沼津高専<sup>2</sup>・静大院理<sup>3</sup>・鈴鹿医療科学大<sup>4</sup>・静大院創造<sup>5</sup>・静大グリーン研<sup>6</sup>) ○田立 ののか<sup>1</sup>・嶋 亮汰<sup>2</sup>・千田 隆誠<sup>3</sup>・田代 竜<sup>4</sup>・大吉 崇文<sup>1,3,5,6</sup>

Analysis of repair capacity in droplets containing cleaved DNA (<sup>1</sup>*Faculty of Science, Shizuoka University*, <sup>2</sup>*NIT, Numazu College*, <sup>3</sup>*Graduate School of Science, Shizuoka University*, <sup>4</sup>*Faculty of Pharmacy, Suzuka University of Medical Science*, <sup>5</sup>*Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University*, <sup>6</sup>*Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University*) ○Nonoka Tadachi,<sup>1</sup> Ryota Shima,<sup>2</sup> Ryusei Senda,<sup>3</sup> Ryu Tashiro,<sup>4</sup> Takanori Oyoshi<sup>1,3,5,6</sup>

DNA in cells is continuously damaged by various factors. When DNA is damaged, repair proteins accumulate around DNA damage sites and form droplets. It is generally known that biochemical reactions are promoted in the droplets, but the relationship between DNA repair and droplet formation is unknown. In this study, we used the plasmid DNA as a model to investigate the ability of single-strand break DNA to be repaired within droplets. We observed the mixture containing single-strand break DNA, polyamines, and ATP in a test tube with a microscope. As a result, it was found that single-strand break DNA tends to form droplets. Furthermore, we will examine the repair reaction within these droplets.

**Keywords :** *Liquid-Liquid Phase Separation (LLPS); DNA Repair; DNA Topology*

細胞内の DNA は様々な要因により絶えず損傷を受けている。これらの損傷は突然変異を誘発し、がん化を引き起こすことから、DNA 修復は細胞のがん化の抑制に重要である<sup>1)</sup>。DNA が損傷を受けると、DNA 損傷部位周辺に修復タンパク質が集まり、液滴を形成する<sup>2)</sup>。一般的に、形成された液滴内では生化学反応が促進されることが知られているが、DNA 修復と液滴形成の関係は不明である。本研究では、切断 DNA の液滴内修復能の効果を明らかにすることを目的として、環状 DNA をモデルとして用いて、一本鎖切断 DNA をポリアミンと ATP を試験管内で混合して顕微鏡で観察した。その結果、一本鎖切断 DNA は液滴を形成しやすいことが分かった。さらに、この液滴内の修復反応を検討する。



1) Dall' Agnese, G., Dall' Agnese, A., Banani, S. F., Codrich, M., Malfatti, M. C., Antoniali, G. and Tell, G. *J. Biol. Chem.* **2023**, 299, 104800.

2) Caldecott, K. W. *Trends in Cell Biology.* **2022**, 32, 733-745.

## アルキル化分子を用いた細胞内 RNA 高次構造解析のための技術開発

(東北大多元研<sup>1</sup>・東北大院理<sup>2</sup>・xFOREST Therapeutics<sup>3</sup>・京大 CiRA<sup>4</sup>) ○畑山妃那<sup>1,2</sup>・鬼塚和光<sup>1,2</sup>・Ping-Yun Lan<sup>1,2</sup>・Yutong Chen<sup>1,2</sup>・宮下映見<sup>3,4</sup>・小松リチャード馨<sup>3</sup>・齊藤博英<sup>4</sup>・永次史<sup>1,2</sup>

Development of technology using alkylating molecules for the analysis of higher-order structure of intracellular RNA (<sup>1</sup>IMRAM, Tohoku University, <sup>2</sup>Graduate School of Science, Tohoku University, <sup>3</sup>xFOREST Therapeutics, <sup>4</sup>CiRA, Kyoto University) ○Hina Hatayama<sup>1,2</sup>, Kazumitsu Onizuka<sup>1,2</sup>, Ping-Yun Lan<sup>1,2</sup>, Yutong Chen<sup>1,2</sup>, Emi Miyashita<sup>3,4</sup>, Kaoru Richard Komatsu<sup>3</sup>, Hirohide Saito<sup>4</sup>, Fumi Nagatsugi<sup>1,2</sup>

The higher-order structures of RNA are involved in various biological processes, and their analysis is becoming increasingly important. Alkylating molecules that form covalent bonds with RNA have been used to control and label target RNA. Our laboratory previously reported that berberine-conjugated vinyl-quinazolinone (VQ) derivatives selectively react with G4 RNAs (Fig. 1A). In this study, we aimed to detect G4 RNA sequences by next-generation sequencing (NGS) analysis of mutations induced by probe addition followed by reverse transcription and amplification (Fig. 1B).

**Keywords :** RNA alkylation, next generation sequencing, G4 RNA, vinyl-quinazolinone (VQ)

RNA の高次構造は様々な生命現象の過程に関与しており、その解析の重要性が高まっている。また、RNA と共有結合を形成するアルキル化分子は、標的 RNA の制御や標識に利用されている。当研究室ではこれまでに、ベルベリンをコンジュゲートしたビニルキナゾリノン (VQ) 誘導体が G4 重鎖構造を持つ RNA の U と選択的に反応することを報告した (Fig. 1A)。本研究では、種々の構造を含む RNA ライブラリに対し VQ 誘導体添加とそれに続く逆転写および増幅によって誘発される変異を次世代シーケンサー (NGS) で分析することで、G4 形成配列の検出を目指した (Fig. 1B)。

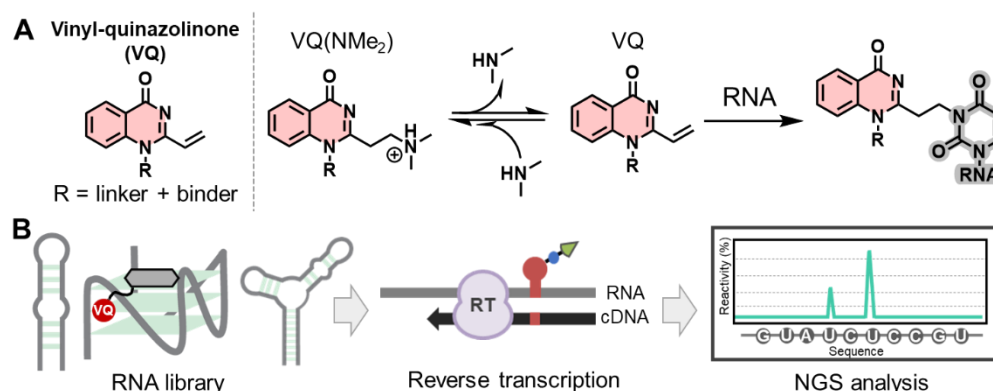


Figure 1. (A) Structure and alkylation mechanism of VQ. (B) Overall illustration of NGS analysis of RNA alkylation positions.

- 1) K. Onizuka, M. E. Hazemi, F. Nagatsugi, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, 6578–6589.
- 2) Y. Chen, K. Onizuka, M. E. Hazemi, F. Nagatsugi, *Bioconjugate Chem.* **2022**, 33, 2097–2102.

## 可逆的光架橋を利用した DNA 鎖中プリン塩基への高速光クロスリンク

(北陸先端科学技術大学院大学<sup>1)</sup>) ○藤岡 啓<sup>1</sup>・平原 令偉<sup>1</sup>・藤本 健造<sup>1</sup>

Ultrafast photo-crosslinking of purine bases in DNA strands using reversible DNA photo-crosslinking(<sup>1</sup>*Japan Advanced Institute of Science and Technology*) ○Akira Fujioka,<sup>1</sup> Rei Hirahara,<sup>1</sup> Kenzo Fujimoto<sup>1</sup>

The crosslinking of DNA strands has potential applications in SNP typing and genetic disease treatment. However, purine base crosslinking is known to require long reaction times. We previously reported the use of 3-cyanovinylcarbazole nucleoside (<sup>CNV</sup>K), which enables site-selective [2+2] photocycloaddition with pyrimidine bases such as thymine and cytosine. Recently, our lab developed 4-methylpyranocarbazole nucleoside (<sup>MEP</sup>K), which selectively crosslinks with thymine. While pyrimidine crosslinking is well-documented, purine crosslinking remains limited. Previous methods achieved a low efficiency of 0.015% per day. Here, we applied a reversible photo-crosslinking reaction using <sup>CNV</sup>K, improving guanine crosslinking efficiency to 37% per day, a 2500-fold enhancement. This breakthrough addresses the long-standing challenges of purine crosslinking and opens new avenues for applications in genetic analysis and diagnostics.

**Keywords :** *Nucleic acid drug; Photo Crosslink*

DNA 鎖間の架橋は、SNP タイピング、遺伝病治療などへの応用が期待されているが、特にプリン塩基の架橋には長時間を有することが知られている。我々は、これまで光架橋性素子 3-cyanovinylcarbazole nucleoside (<sup>CNV</sup>K) を用い、DNA 鎖や RNA 鎖内に存在するチミンやシトシンといったピリミジン塩基と[2+2]光環化することで位置選択的な架橋反応を示すことを報告している<sup>1)</sup>。最近ではチミンにのみ選択的な光架橋を示す 4-methylpyranocarbazole nucleoside (<sup>MEP</sup>K)の開発に成功し、その結果について当研究室より報告している<sup>2)</sup>。ピリミジン塩基への架橋例は多いもののプリン塩基の架橋例は少なく、先行研究で報告されている無塩基部位を組み込んだ人工核酸を用いたプリン塩基への架橋率は1日あたり 0.015%という低い架橋率が課題だった。

今回、<sup>CNV</sup>K を用いた可逆的な光架橋反応を導入することで、プリン塩基（グアニン）への架橋率を1日あたり 37%に向上させ、約 2500 倍の高速化を達成した。この手法により、長時間を要していたプリン塩基の架橋問題を克服し、遺伝子解析や診断分野での応用が期待される重要な進展を得ることができた。

1) I. Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3227.

2) J. Mihara, K. Fujimoto, *Organic & Biomolecular Chem.*, **2021**, 10, 1039

## 可逆的光架橋を利用したDNA鎖中プリン塩基への高速光クロスリンク

(北陸先端科学技術大学院大学) ○武貞龍、小田井柊也、藤本健造

Ultrafast photo-crosslinking of purine bases in DNA strands using reversible DNA photo-crosslinking (Japan Advanced Institute of Science and Technology)○Ryu Takesada, Shuuya Odai, Kenzo Fujimoto

Recently, advances in genome editing have highlighted the critical need for precise and efficient DNA manipulation. Among these techniques, DNA manipulation utilizing light has drawn considerable attention due to its exceptional specificity and ability to achieve spatiotemporal control. Our research has focused on developing innovative photoreaction systems, including photoligation and photocrosslinking methods, using photo-responsive artificial nucleic acids. In particular, we succeeded in synthesizing 4-methylpyranocarbazole nucleoside (MEPK), which demonstrates selective thymine photocrosslinking under mild conditions with visible light (400 nm). This discovery provides a safer and more efficient alternative for DNA manipulation compared to conventional methods involving UV light, which often causes significant phototoxicity. Furthermore, we conducted a comprehensive analysis of photoligation reactions using cytosine-containing templates and revealed that sequence-dependent switching reactions are achievable. This ability to control photoreactions based on DNA sequences represents a groundbreaking step toward optically decoding nucleic acid information. We anticipate that this technology will contribute significantly to the development of advanced tools for studying and regulating gene expression within living cells.

*Keywords: Photo-manipulation; Gene expression regulation*

*; Photo-crosslinking reaction, Genome editing; 4-Methylpyranocarbazole nucleoside (MEPK)*

近年、遺伝子編集技術の急速な進展により、DNA操作の精度や効率性の向上がますます重要視されている。これらの中でも、特に光を用いたDNA操作法は、従来の技術に比べて高い特異性や時空間制御能力の面で優れており、今後の応用範囲が大いに期待される。我々の研究グループでは、光応答性人工核酸を用いた新しいDNA操作手法として、「光ライゲーション法」と「光クロスリンク法」の2種類の手法をこれまでに報告してきた<sup>1)</sup>。このうち、チミンに対して選択的な光架橋能を持つ 4-methylpyranocarbazole nucleoside (MEPK)の開発に成功し、400 nmの可視光を用いて光架橋を実現できることを示した<sup>2)</sup>。可視光を使用することで、UV光を使用する従来技術の課題である光毒性を大幅に低減し、安全かつ効率的な反応を可能にした。また、シトシンを鋳型とした反応系における光ライゲーションを詳細に解析することで、DNA配列に依存して光ライゲーションと光クロスリンクの反応をスイッチングできることを発見した。この成果は、DNA配列を基にした反応制御を可能にする新しい光反応技術の基盤となる。細胞内の核酸情報を正確かつ安全に解析する光技術としての応用が期待されており、遺伝子発現制御やゲノム編集の分野で新たな展望を切り開く可能性がある。

1) Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3227

2) J. Mihara, K. Fujimoto, *Organic & Biomolecular Chem.*, **2021**, 10, 1039

## Development of pH-dependent RNA-binding molecules with light-up property

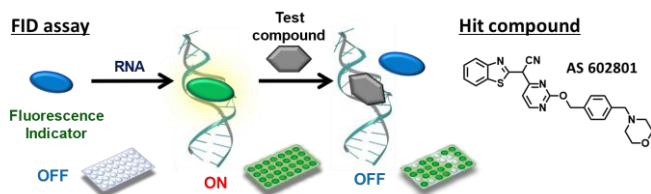
(<sup>1</sup>*Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University,*  
<sup>2</sup>*Graduate School of Science, Tohoku University*) ○Dylan Christian Thomas,<sup>1,2</sup> Kazumitsu Onizuka,<sup>1,2</sup> Ryosuke Nagasawa,<sup>1,2</sup> Kosuke Tsuzuki,<sup>1,2</sup> Fumi Nagatsugi<sup>1,2</sup>

**Keywords:** Small RNA-binding Molecules; MicroRNA; Light-up Property; Fluorescence Titration; pH Dependency

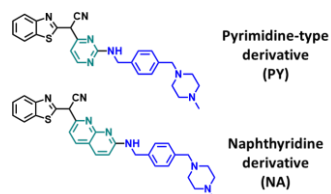
RNA molecules play essential roles for gene information transfer and regulation. RNAs have been implicated in many diseases and are the attractive medicinal targets for gene-related and infectious diseases in modern drug discovery. Thus, RNA-binding small molecules are expected to inhibit or alter the RNA functions and therapeutically modulate various types of cellular processes.

Previously in our group, AS 602801, a commercially available c-Jun N-terminal Kinase (JNK) inhibitor, was found to have an RNA-binding affinity by the screening based on fluorescence indicator displacement (FID) assay (Fig. 1).<sup>1</sup> AS 602801 showed the binding to hsa-mir-191 ( $K_d = 14 \pm 2 \mu\text{M}$ ) and fluorescent light-up property that indicates a fluorescence OFF-ON switch depending on RNA binding. It also showed a pH dependency for its binding affinity towards hsa-mir-191.

In this study, two derivatives from AS 602801 were designed and synthesized in which three main structural changes were done (Fig. 2): 1. Changing the morpholino group in AS 602801 into piperidine group to increase the pKa value of the side chain; 2. the introduction of a naphthyridine group which would increase the stacking area; 3. the N-connection of the side chain to increase the pKa value of the pyrimidine or naphthyridine moiety. The  $K_d$  values of the two derivatives, pyrimidine-type (PY) and naphthyridine-type (NA) were determined by fluorescence titration to investigate their binding property. Results showed that acidic conditions significantly increased the binding affinity of these compounds.



**Figure 1.** Schematic of the fluorescent indicator displacement (FID) assay. The fluorescence signal of the RNA-bound and light-up indicator quenches when a compound binds to a target RNA at the same site.



**Figure 2.** Structure of synthesized compounds, PY and NA.

1) R. Nagasawa, K. Onizuka, K.R. Komatsu, E. Miyashita, H. Murase, K. Ojima, S. Ishikawa, M. Ozawa, H. Saito, F. Nagatsugi, *Commun. Chem.* **2024**, 7, 98.

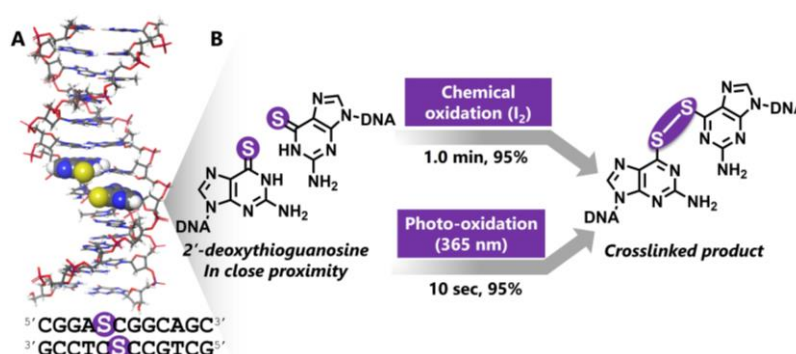
## Interstrand crosslinking of oligonucleotides functionalized with 2'-deoxythioguanosines

(<sup>1</sup>*Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University,* <sup>2</sup>*Graduate School of Science, Tohoku University*) ○Jamila Abbas Osman,<sup>1,2</sup> Kazumitsu Onizuka,<sup>1,2,\*</sup> Yuuhei Yamano,<sup>1</sup> Fumi Nagatsugi<sup>1,2,\*</sup>

**Keywords:** Oligo DNA; Interstrand crosslinking; 2'-deoxythioguanosine; Disulfide linkage; Photo-oxidation

Oligonucleotides (ODNs) bind specifically to their complementary targets in a sequence-selective manner, forming hybridized duplex structure. Rational chemical functionalization of ODNs with reactive moieties enables hybridization-specific reactions by positioning the reactive groups in close proximity, facilitating interstrand crosslinking, creating covalently bonded, thermally stable duplexes.<sup>1</sup> Cross-linked ODNs offer diverse applications, including stabilizing DNA nanostructures in nanotechnology,<sup>2</sup> enhancing miRNA inhibition in therapeutics<sup>3</sup> and studying enzyme activity in biochemistry.<sup>4</sup>

In this study, we introduce a new crosslink design strategy that incorporates two 2'-deoxythioguanosine residues at noncomplementary but strategically proximal positions within oligo-DNA duplex (**Figure 1A**), promoting efficient disulfide crosslinking under chemical oxidation conditions (**Figure 1B**). Additionally, this approach enables a new photo-induced crosslinking reaction using 365 nm UV light, efficiently synthesizing disulfide crosslinked duplex (**Figure 1B**). Overall, our results support the well-designed proximity between the reactive thiocarbonyl groups of 2'-deoxythioguanosine incorporated within our designed duplex, favoring the formation of disulfide crosslinks under oxidative conditions. In this presentation, our design strategy, crosslinking reaction results and characterization of crosslinked product will be reported. Additionally, our new photo-induced disulfide crosslinking reaction and elucidation of its mechanism will be introduced.



**Figure 1. Interstrand crosslinking using 2'-deoxythioguanosine-functionalized oligo DNA duplex.** (A) Molecular modeling represents incorporation of 2'-deoxythioguanosine bases (S) in proximity position. CPK models highlight thioguanine bases. (B) Disulfide crosslinking reaction under various oxidizing conditions.

1) K. Onizuka, Y. Yamano, A. M. Abdelhady, F. Nagatsugi, *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20*, 4699. 2) A. Rajendran, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *J Am Chem Soc*, **2011**, *133*, 14488. 3) A. M. Abdelhady, Y. Hirano, K. Onizuka, H. Okamura, Y. Komatsu, F. Nagatsugi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *48*, 128257. 4) A. Beddows, N. Patel, L. D. Finger, J. M. Attack, D. M. Williams. J. A. Grasby, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 8895.

## 光応答性人工核酸を用いた 200bp 以上の長鎖オリゴ核酸への DNA 二本鎖侵入法開発

(北陸先端科学技術大学院大学・バイオ機能医工学研究領域)

○YANG RUI<sup>1</sup>・HAILILI ZUMILA<sup>1</sup>・藤本 健造<sup>1</sup>

Development of a DNA double-duplex invasion into long oligonucleotides of 200bp or more using photo-responsive artificial nucleic acid (Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology) ○YANG,RUI<sup>1</sup>;HAILILI, ZUMILA<sup>1</sup>; KENZO, Fujimoto<sup>1</sup>

Genome manipulation is crucial for treating genetic disorders and advancing gene editing, with efficient handling of double-stranded DNA (dsDNA) being indispensable. Traditional methods face challenges with long-chain DNA penetration, necessitating improved techniques. Our lab developed an ultrafast cross-linkable nucleoside, 3-cyanovinyl-carbazole(<sup>CNV</sup>K), and established a light-induced method, photo-induced Double-Stranded DNA Insertion (pDDI). This innovative approach targets long-chain oligonucleotides (≥200 bp) with high efficiency. Our findings confirm that pDDI enables precise manipulation of long DNA sequences, overcoming traditional limitations. This method opens new opportunities in gene therapy and genome editing, especially for treating genetic diseases, offering a transformative tool for advancing genetic medicine.

**Keywords :** *Genome manipulation; 3-cyanovinylcarbazole;Photo-induced Double-Stranded DNA Insertion*

ゲノム操作技術は遺伝性疾患の治療や遺伝子編集において重要であり、特に DNA 二本鎖の効率的な操作は進展に不可欠である。しかし、従来の方法では長鎖 DNA に対する侵入効率に課題があり、より効率的な技術が求められている。本研究室では、超高速クロスリンク可能な 3-シアノビニルカルバゾールヌクレオシド(<sup>CNV</sup>K)を開発し<sup>1,2</sup>、これを用いた光誘導型 DNA 二本鎖侵入 (pDDI) 法を報告した<sup>2</sup>。さらに最近、この超高速光クロスリンカーを用いた光誘導型 DNA 二本鎖侵入 (pDDI) 法を報告している<sup>3</sup>。本研究では、ゲノム操作への応用を目指し、<sup>CNV</sup>K を使用した 200bp 以上の長鎖オリゴ核酸に対する DNA 二本鎖侵入法の開発に取り組んだ。長鎖オリゴ核酸においても、pDDI 法の適用を通じて高い効率を発揮し、標的 DNA 配列に対する精密な操作が可能であることが確認された。pDDI 法は遺伝子治療やゲノム編集の新たな可能性を示し、特に遺伝性疾患治療への応用が期待されている。

1. Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3227-3230.

2. S. Nakamura, H. Kawabata, and K. Fujimoto. *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 7616-7619.

3.S. Sethi,H. Zumila,Y. Watanabe,J. Mo,K. Fujimoto.*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2024**,98, 129597

## pH 変化によるアデノシン誘導体の塩基対形成特性に関する研究

(日大院工) ○小野 颯大・金澤 優多・齋藤 義雄

Studies on base pairing properties of various deazaadenine nucleosides (*Graduate School of Engineering, Nihon University*) ○Hayata Ono, Yuta Kanezawa, Yoshio Saito

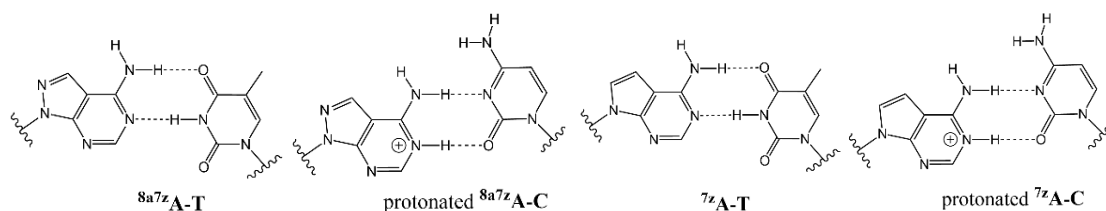
We have reported various environment-sensitive fluorescent (ESF) deazapurine nucleosides that significantly change the fluorescence spectra in response to microenvironmental changes. Introducing these ESF nucleosides into DNA probes, we have identified single nucleotide mutations in target DNA by the change in fluorescence wavelength and intensity. In order to obtain useful information for designing more efficient fluorescent probes, we examined the base pairing ability of the various deazaadenine derivatives we have ever developed, in this study.

**Keywords :** deazaadenine;  $pK_a$

我々の研究室では、環境変化に応じて蛍光発光の波長や強度を大きく変化させる環境感応型蛍光核酸 (ESF ヌクレオシド) の開発に取り組んでいる。特に、デアザアデニン骨格を持つ ESF ヌクレオシドを DNA プローブに導入することで、標的 DNA 二重鎖中の一塩基変異を蛍光波長や強度の変化を用いて識別することに成功している。

これまで、8-アザ 7-デアザアデニン ( $8a7zA$ ) や 7-デアザアデニン ( $7zA$ ) を塩基部位に用いた蛍光ヌクレオシドを開発してきたが、これらの塩基は、DNA 二重鎖中で、チミン塩基のほかにシトシン塩基とも塩基対を形成することがあることが知られている。<sup>1,2)</sup> これはデアザアデニン塩基の N1 位のプロトン化の影響によるもので、酸性条件下では N1 位がプロトン化され、シトシン塩基のカルボニル基と水素結合することで塩基対を形成すると考えられる。一方、塩基性の条件下では N1 位が脱プロトン化するため本来のチミン塩基と塩基対を形成すると考えられる。

本研究では、新たな蛍光プローブの設計を効率化するために、複数のデアザアデニン誘導体について N1 位の  $pK_a$  値の測定を行った。それらデアザアデニン誘導体の DNA 二重鎖中での塩基対識別能を評価することで、種々のデアザアデニン誘導体がどのような条件でどの塩基と安定な塩基対を形成するかを調べ、今後のプローブ作成の際に有益な情報を得ることが出来た。本発表では、それらの詳細についての報告を行う。



**Fig. 1.** Structure of deazaadenine derivatives

- 1) F. Seela, *et al. Nucleic Acids Res.*, **2006**, 34, 5987.
- 2) S. Siraiwa, *et al. Org. Biomol. Chem.*, **2016**, 14, 3934.

## Development of DNA Aptamers that Discriminate the Phosphorylation Intermediate of Protein Tyr Phosphatase (PTP)

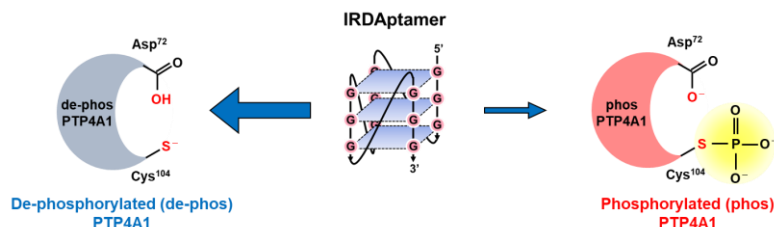
(<sup>1</sup>Faculty of Science, Niigata University, <sup>2</sup>Cedars Sinai Medical Center, USA)

○Yuma Suzuki,<sup>1</sup> Irene Choi,<sup>2</sup> Yuki Hara,<sup>1</sup> Kazuhiro Furukawa,<sup>1</sup> Nuzio Bottini,<sup>2</sup> Yoshiro Chuman<sup>1</sup>

**Keywords:** Protein Tyr phosphatase (PTP); phosphorylation intermediate; DNA aptamer; IRDaptamer

PTP4A1, a member of the protein tyrosine phosphatase (PTP) family, regulates biological signaling by dephosphorylation of substrates. However, PTP4A1 has been known to be involved in various diseases, such as cancer and autoimmune diseases.<sup>1</sup> In addition, it has been reported that PTP4A1 forms two states, de-phosphorylated and phosphorylated, during the dephosphorylation reaction, and that each has a different function *in vivo*.<sup>2</sup> Therefore, analysis of these two states is important for understanding the processes of various diseases, but the molecules that can distinguish them have not yet been developed, and it is urging to develop novel molecules that can be used in the cell. Recently, we have developed Ion-Responsible DNA Aptamer (IRDaptamer) as new emerging modalities.<sup>3</sup> IRDaptamers form a G-quadruplex structure in the presence of metal ions, such as Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, and exhibit high thermal stability and nuclease resistance. In addition, we have shown that IRDaptamers forming the G-quadruplex structure also exhibit plasma membrane permeability. Therefore, they can serve as promising drugs for molecularly targeted therapy in the cells.

In this study, we carried out the screening of binding IRDaptamers targeting de-phosphorylated (de-phos) and phosphorylated (phos) PTP4A1, respectively. After screening, several IRDaptamers were identified as candidates which bind to PTP4A1. ELISA binding analyses revealed that the identified IRDaptamers could significantly recognize PTP4A1 in the de-phosphorylated state, but not in the phosphorylated state. CD spectrum analysis indicated that these aptamers formed the parallel type G-quadruplex structure and had high-responsiveness to K<sup>+</sup>. Furthermore, binding kinetic analysis by Biolayer interferometry (BLItz) system revealed that one of the identified IRDaptamers showed high affinity binding to de-phos PTP4A1. These results suggest that the identified IRDaptamers can discriminate between de-phos and phos PTP4A1 in the cells and they may be used as diagnostic and therapeutic agents for various diseases.



1) N. Bottini, et al., *Nat. Commun.* **2017**, 8(1), 1060. 2) H. Miki, K. Gehring, et al., *EMBO Rep.* **2016**, 17(12), 1890-1900. 3) A. Kaneko, M. Mizunuma, Y. Chuman, et al., *Catalysts* **2020**, 10, 1153.

## 19F を含む可視光クロスリンカーの開発と核酸検出への展開

(北陸先端大) ○野田 達志・藤本 健造

Development of a Visible-Light Cross-Linker Containing  $^{19}\text{F}$  and Its Application to Nucleic Acid Detection (Japan Advanced Institute of Science and Technology) ○Tatsushi Noda・Kenzo Fujimoto

Radioisotope labeling, a typical nucleic acid detection method, has the risk of safety, and in the case of fluorescent labeling, the risk of damage to the observed object by the laser<sup>1)</sup>. In our laboratory, by using oligonucleotides containing cyanovinylcarbazole ( $^{\text{CNV}}\text{K}$ ), a unique photo-crosslinking element, we have the knowledge that photo-crosslinking to pyrimidine bases in complementary nucleic acids can be achieved in a few seconds of light irradiation, significantly changing trifluorothymidine-derived  $^{19}\text{F}$  signals. Since trifluorothymidine is not naturally occurring, it has been impossible to directly detect natural nucleic acids<sup>2)</sup>. Therefore, in this study, we developed 4-trifluoromethylpyranocarbazole ( $^{\text{TFPD}}$ ), which has both photoresponsive ability and  $^{19}\text{F}$  signal. Artificial nucleic acids containing  $^{\text{TFPD}}$  were synthesized, and their optical crosslinking ability and  $^{19}\text{F}$ -NMR nucleic acid detection ability were evaluated. The results showed that  $^{\text{TFPD}}$ -containing nucleic acids were successfully detected in a highly sensitive and sequence-selective manner by  $^{19}\text{F}$ -NMR after photoirradiation at 400 nm, 9000 mW/cm<sup>2</sup>, and 600 s. A chemical shift of 3.8 ppm was observed in the  $^{19}\text{F}$ -NMR measurement of TFPD-containing nucleic acids. In the future, we intend to evaluate the function of  $^{\text{TFPD}}$  as an intracellular nucleic acid imaging tool using actual cells.

**Keywords :**  $^{19}\text{F}$ -NMR; Photo-crosslinking; Nucleic Acid

核酸検出法として代表される放射性同位体標識には安全性、蛍光標識の場合は、レーザーにより観察物にダメージを与える危険性があった<sup>1)</sup>。当研究室では独自の光架橋素子シアノビニルカルバゾール( $^{\text{CNV}}\text{K}$ )を含むオリゴヌクレオチドを用いることで、数秒の光照射で相補的な核酸中のピリミジン塩基に光架橋することができ、トリフルオロチミジン由来の  $^{19}\text{F}$  シグナルを大きく変化する知見がある<sup>2)</sup>。また、トリフルオロチミジンは天然に存在しないため、天然核酸を直接検出することが不可能であった。

そこで、本研究では光応答能と  $^{19}\text{F}$  シグナルを併せ持つ光架橋素子 4-trifluoromethylpyranocarbazole ( $^{\text{TFPD}}$ )を開発した。これを含む人工核酸合成を行い、光クロスリンク能及び $^{19}\text{F}$ -NMRによる核酸検出能を評価した。結果 $^{\text{TFPD}}$ 含有核酸は、400 nm, 9000 mW/cm<sup>2</sup>, 600 s で光照射し、 $^{19}\text{F}$ -NMR で測定すると 3.8 ppm のケミカルシフトが観測され、高感度で配列選択的に核酸を検出することに成功した。

今後、細胞内核酸イメージングツールとしての  $^{\text{TFPD}}$  機能を実際に細胞を用いて評価していきたいと考えている。

1) 田村 隆明, 遺伝子工学基礎 I, 応用物理学会, **2005**, 74,(1), 60-64

2) Shigetaka Nakamura and Kenzo Fujimoto, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 11765-11768

## 低酸素応答性官能基を備えた人工核酸塩基の合成と機能開拓

(青山学院大学理工学部<sup>1</sup>) ○落合 悠帆<sup>1</sup>・西原 達哉<sup>1</sup>・田邊 一仁<sup>1</sup>

Synthesis and function of artificial nucleobases with hypoxia-responsive substituents (<sup>1</sup>*College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University*) ○Yuho Ochiai,<sup>1</sup> Tatsuya Nishihara,<sup>1</sup> Kazuhito Tanabe<sup>1</sup>

The fast and accurate treatment of hypoxic regions in living tissue is critical for medical treatment of solid tumor, because they have been associated closely with the malignant phenotype of cancer cells, resistant to cancer therapies and the high mortality rate of cancer patients. For treatment of tumor hypoxia, a considerable number of studies have been conducted over the past few decades on the development of radiosensitizers and prodrugs for treatment of tumor hypoxia. However, estimation of treatment method for this pathological tissue remains inadequate, and thus, a convenient protocol for their treatment has been required.

In this study, we attempted to develop prodrugs utilizing nitro and azide groups, which are selectively activated in hypoxic cells. We introduce these substituents into the 5'OH group of BrdU, a well-documented radiosensitizer, so that it exhibits selective cytotoxicity against hypoxic tumor cells. We are currently preparing nitrobenzyl-substituted BrdU and are planning to conduct cellular experiments to investigate its function.

**Keywords :** Nitrobenzyl group; 5-Bromo-2'-deoxyuridine ; Hypoxic tumor cells

低酸素環境を形成するがん細胞（低酸素細胞）は、がん悪性化の原因になることに加えて、治療抵抗性を示すため、その治療法の確立は喫緊の課題である。これまでに、低酸素細胞の治療を目的に、放射線増感剤をはじめとする多様な治療薬が開発されてきた。しかし、その多くは低酸素細胞への蓄積能が低く、副作用による障害が大きいことが課題となっていた。本研究では、こうした問題点を踏まえて、放射線増感剤ブロモデオキシウリジン（BrdU）をさらに修飾し、低酸素細胞に選択的に蓄積するよう改良を試みた。BrdUの5'側水酸基に低酸素細胞内で選択的に活性化されるニトロ基やアジド基を導入して、低酸素細胞に選択的に蓄積するよう設計した。これら官能基は、低酸素細胞で選択的に還元される結果、除去されてBrdUが低酸素細胞内に生成する。その後、ゲノムに取り込まれ、放射線照射下で殺細胞効果を示す。他方、有酸素細胞では還元反応が進行しないため、ゲノムへの組み込みは起こり得ず、毒性はしめさない。現在、BrdUへのニトロベンジル基の導入を試みており、その反応挙動や細胞での評価と併せて報告する予定である。

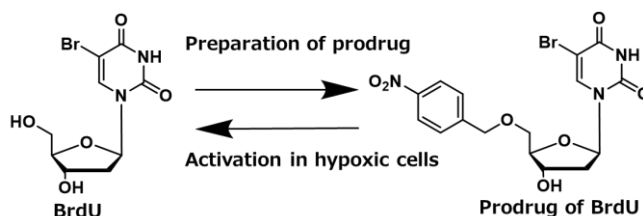


Figure 1. Prodrug of BrdU and its activation in hypoxic cells

## ペプチド核酸とプローブを利用した 5-メチルシトシンの新規検出法の開発

(東京工科大院工<sup>1</sup>・東京工科大院バイオ・情報メディア<sup>2</sup>)  
 須磨岡淳<sup>1</sup>・○大池美琴<sup>1</sup>・吉田亘<sup>2</sup>・荒川貴博<sup>1</sup>

Development of a novel detection method for 5-methylcytosine using peptide nucleic acid and a fluorescent probe (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Tokyo University of Technology, <sup>2</sup>Graduate School of Bionics, Computer and Media Science, Tokyo University of Technology)  
 Jun Sumaoka,<sup>1</sup> ○Mikoto Oike,<sup>1</sup> Wataru Yoshida,<sup>2</sup> Takahiro Arakawa<sup>1</sup>

Abnormal DNA methylation is seen in many diseases, including cancer and Alzheimer's disease. If we could detect 5-methylcytosine (5-<sup>m</sup>C) at specific sites in the genome, it would be possible to detect diseases early and elucidate biological phenomena. pcPNA, in which adenine (A) and thymine (T) of peptide nucleic acid (PNA) are respectively replaced with 2,6-diaminopurine (D) and 2-thiouracil (Us) is known to recognize double-stranded DNA by double-duplex invasion using only Watson-Crick base pairs. Therefore, it is expected that when pcPNA is invaded at two sites near the target sequence of double-stranded DNA (dsDNA), the target portion will become single-stranded without heat treatment (Figure 1). By applying a probe (PO) modified with a fluorescent dye at the 5'-end and a quencher at the 3'-end and a methylation-sensitive restriction enzyme to this single-stranded region, it is possible to detect the presence or absence of methylation of the target cytosine. When dsDNA, pcPNA, PO and restriction enzyme were mixed and fluorescence measurements were performed, changes in fluorescence intensity were observed. In this presentation, we will report the details.

Keywords : Peptide Nucleic Acid, 5-Methylcytosine, Deoxyribonucleic acid, Fluorescent probe

DNA のメチル化異常は癌やアルツハイマー病を始めとした多くの疾病で見られる。ゲノム中の特定部位の 5-メチルシトシン(5-<sup>m</sup>C)を検出することが出来れば、疾病の早期発見や生命現象の解明につながる事が期待される。ペプチド核酸(PNA)のアデニン(A)とチミン(T)をそれぞれ 2,6-ジアミノプリン(D)と 2-チオウラシル(Us)に置き換えた pcPNA は、Watson-Crick 塩基対のみを用いた Double-duplex invasion で二本鎖 DNA を認識することが知られている。従って、二本鎖 DNA(dsDNA)の標的となる配列の近傍の二カ所に pcPNA をインベージョンさせると、熱処理を行うことなく標的部分が一本鎖状態になると予想される(図 1)。この一本鎖領域に、5'-末端に蛍光色素、3'-末端にクエンチャーを修飾したプローブ(PO)とメチル化感受性制限酵素を作用させることで、標的シトシンのメチル化の有無を検出することが可能である。dsDNA、pcPNA、PO 及び制限酵素を混合して蛍光測定を行ったところ、蛍光強度の変化が観測された。本発表ではその詳細について報告する。

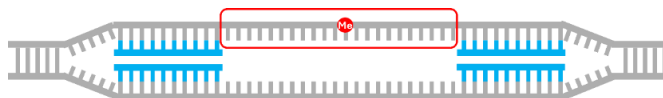


図 1 ゲノム DNA 中の標的部分へのプローブの標的となる一本鎖の誘起

## 酸化損傷 DNA 切断を指向した求核性二級アミン導入オリゴ DNA の合成と評価

(Science Tokyo 生命<sup>1</sup>) ○根本 壮<sup>1</sup>・金森 功吏<sup>1</sup>・湯浅 英哉<sup>1</sup>

Synthesis and Evaluation of Nucleophilic Secondary Amine Incorporated Oligo DNA Aiming at Cleavage of Oxidative Damaged DNA (<sup>1</sup>*School of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo*) ○So Nemoto,<sup>1</sup> Takashi Kanamori<sup>1</sup>, Hideya Yuasa<sup>1</sup>

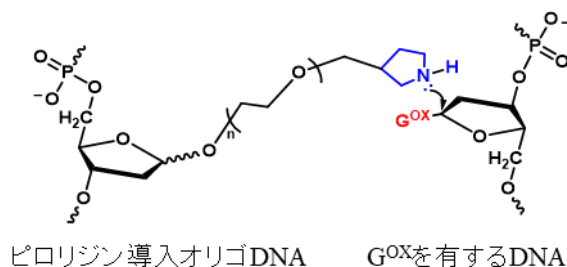
A small photosensitizer (NBP) developed by us was introduced into oligo nucleic acids to regioselectively photo-oxidize guanine residues in target nucleic acids. It is known that piperidine, a nucleophilic secondary amine, causes strand breaks at the oxidized guanine ( $G^{OX}$ ) sites in DNA.<sup>1</sup> Based on this knowledge, we hypothesized that the introduction of NBP and an appropriate secondary amine on oligo nucleic acids may enable strand breakage of the target DNA.

In this study, we aimed to determine whether amines introduced into oligo nucleic acids via linkers can cleave single-stranded DNA at a  $G^{OX}$  site. First, we identified an amine, pyrrolidine, that is more efficient than piperidine in cleaving DNA strands at a  $G^{OX}$  site. Then, we synthesized oligo-DNAs with the amine introduced via a linker and evaluated its effect on the cleavage of a single-stranded oligo-DNA at a  $G^{OX}$  site.

**Keywords :** Photosensitizers; Nucleic Acid Chemistry, Cleavage, Amines, Organic Synthesis

当研究室では光ノックダウン法や光ノックアウト法の開発を志向し、光増感剤とオリゴ核酸複合体の開発を進めている。当研究室で開発した小型光増感剤(NBP)を導入したオリゴ核酸を用いると、標的核酸中のグアニンを一定程度位置選択的に光酸化できる。また、DNA 中の酸化損傷グアニン( $G^{OX}$ )部位は求核性二級アミンであるピペリジンで処理すると鎖切断される<sup>1</sup>。そこで、NBP と二級アミンを同時にオリゴ核酸に導入することで、標的 DNA 鎖を切断できるのではないかと考えた。

まず、 $G^{OX}$  部位の DNA 鎖切断効率が高いアミンを探索した結果、ピペリジンよりも切断効率の高いピロリジンを見出した。つぎに、オリゴ核酸にリンカーを介して導入されたアミンが、 $G^{OX}$  を有する一本鎖 DNA を切断できるか検討した。そこで、リンカーを介してピロリジンを導入したオリゴ DNA を合成し、 $G^{OX}$  を有する一本鎖オリゴ DNA に対する切断効果を評価した。



- 1) Aaron M. Fleming, et al., *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, 28, 1292.

## 標的細胞への DDS を目指した ASO への低分子リガンド導入法の開発

(東京科学大学生命理工学院<sup>1</sup>・昭和大学細胞外マトリックス研究所<sup>2</sup>) ○有江 嶺美<sup>1</sup>・島村 大輝<sup>1</sup>・宮内 彩<sup>2</sup>・村上 英太郎<sup>1</sup>・金山 朱里<sup>2</sup>・清尾 康志<sup>1</sup>・正木 慶昭<sup>1</sup>  
 Conjugation of Small Molecule Ligands to ASO for targeted drug delivery (<sup>1</sup>*Sch. Life Sci. Tech., Science Tokyo*, <sup>2</sup>*Institute for Extracellular Matrix Research, Showa Univ.*) ○Remi Arie,<sup>1</sup> Daiki Shimamura,<sup>1</sup> Aya Miyauchi,<sup>2</sup> Eitaro Murakami,<sup>1</sup> Shuri Kaneyama,<sup>2</sup> Kohji Seio,<sup>1</sup> Yoshiaki Masaki<sup>1</sup>

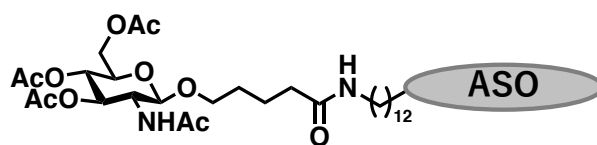
Antisense oligonucleotides (ASOs) carry the risk of off-target delivery to non-specific tissues and cells, potentially causing unintended side effects. Therefore, the development of efficient drug delivery systems (DDS) capable of selectively targeting specific tissues or cells is crucial for the safe and effective application of nucleic acid therapeutics.

This study aims to enhance the selective delivery of ASOs to hepatic stellate cells (HSCs). On the surface of HSCs, the insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R) is uniquely and highly expressed and is known to interact with *N*-acetylglucosamine (GlcNAc). To exploit this interaction, various ligands, including GlcNAc, were conjugated to ASOs, and the type and quantity of ligands introduced were systematically evaluated to assess their impact on the delivery efficiency and properties of the ASOs. This presentation provides a comprehensive analysis of the findings, discussing the potential of ligand-conjugated ASOs for targeted drug delivery.

**Keywords :** *Antisense Oligonucleotide, GlcNAc, DDS*

核酸医薬品の一種であるアンチセンス核酸 (ASO) は、体内に投与すると標的外の組織や細胞にも送達され、副作用を引き起こすリスクがある。そのため、標的組織や細胞に選択的に ASO を送達するためのドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発は、核酸医薬品の実用化に向け重要な課題である。

本研究では、肝星細胞への効率的な ASO 送達を目的として、肝星細胞表面に特異的に高発現する受容体であるインスリン様成長因子 2 受容体 (IGF2R) に着目した。特に、IGF2R と相互作用するリガンドである *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を始めとして、様々なリガンドを ASO に導入することで、ASO を肝星細胞へ選択的に送達することを目指した。そこで、様々なリガンドを導入した ASO の合成を行い、リガンドの種類および導入個数が ASO の送達効率や性質に与える影響について評価した詳細について報告する。



- 1) Bochel, A. J.; Williams, C.; McCoy, A. J.; Hoppe, H.-J.; Winter, A. J.; Nicholls, R. D.; Harlos, K.; Jones, E. Y.; Berger, I.; Hassan, A. B.; Crump, M. P. *Structure* **2020**, 28 (12), 1300-1312.e5.

## 潜在的ウォーヘッドを持つ DNA 型共有結合体の無サイクル選択

(1. 電気通信大学、2. ウィスコンシン大学、3. 日本大学) ○李 朝会<sup>1</sup>、ヤング ジェイ<sup>1,2</sup>、栞原 正靖<sup>3</sup>、瀧 真清<sup>1</sup>

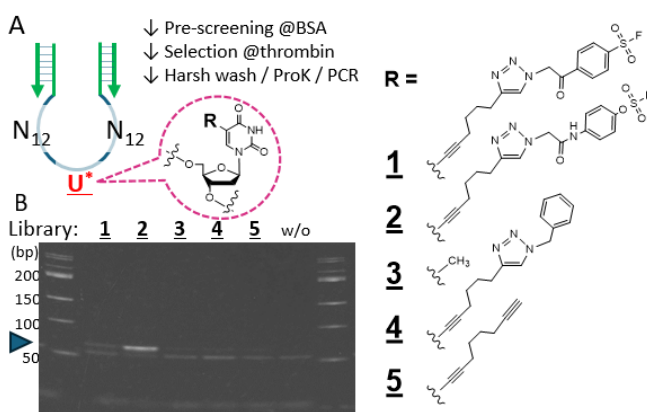
**ARCaDia: single-round screening of a DNA-type targeted covalent binder possessing a latent warhead** (1. Univ. Electro-Communications, 2. Univ. Wisconsin, 3. Nihon Univ.)  
○CHAOHUI LI<sup>1</sup>, Jay Yang<sup>1,2</sup>, Masayasu Kuwahara<sup>3</sup>, Masumi Taki<sup>1</sup>

A covalent binder for a target protein was obtained by a direct single-round screening of a latent-warhead-modified DNA library via affinity/reactivity-based co-selection of aptameric deoxyribonucleic acid (ARCaDia), followed by a top k-mer analysis<sup>1)</sup>. The optimal position of the conjugated warhead on the selected aptamer was simultaneously identified.

Comparison of the N25 libraries (Fig. 1A) endowed with different warheads demonstrated a robust expected 64bp PCR product band for the AFS library (2) and a weak band for the BSF library (1) suggesting the potential presence of a selected aptamer surviving the strong wash (Fig. 1B, lanes 1 and 2). Other control libraries which presumably do not form a covalent conjugation with the thrombin target only gave a negligible PCR product band under the same condition (lanes 3–5). We focused on the robust PCR product resulting from the AFS library screening and further analyzed for potential covalent binders by HTS and the bioinformatics analysis.

**Keywords:** aptameric covalent binders, latent warhead, non-SELEX-type single round screening, affinity/reactivity-based co-selection (ARC), Thrombin binder aptamer (TBA)

SELEX 法を用いることなく、潜在的ウォーヘッド（反応点）を 1 か所のみ導入した DNA ライブラリーから、標的との結合親和性と反応性を兼ね備えたアプタマー型共有結合体を無サイクル選択する手法（ARCaDia 法）を開発した<sup>1)</sup>。選択したアプタマー配列を網羅的に 100 万リード取得して、バイオインフォマティクス手法（top k-mer 解析）を用いて、ウォーヘッドの導入位置情報を含む共有結合体構造を完全に同定した。



**Fig. 1** The DNA library and warheads used for the combinatorial screening. (A) The library comprises tandem N<sub>12</sub> randomized sequences with a single linker (octadynyl-dU) with a terminal alkyne (U\*) inserted at position 13. The flanking primer sequences are denoted in green. The R substitution on the uracil was benzenesulfonyl fluoride (BSF; **1**), fosylate (AFS; **2**), CH<sub>3</sub> with no linker (**3**; natural T), benzyl (**4**), or unconjugated alkyne (**5**). (B) PAGE separation of the PCR products corresponding to the respective starting libraries (**1–5**), without template (w/o), 50bp markers on both edges. The blue arrow points to the expected 64bp PCR-amplified aptamers.

1) M. Taki\*, M. Kuwahara, C. Li, N. Tomoda, N. Miyashita, T. Kan, J. Yang\*, ARCaDia: single-round screening of a DNA-type targeted covalent binder possessing a latent warhead, *Chem. Commun.*, **2024**, 60, 14964 ; back cover article.

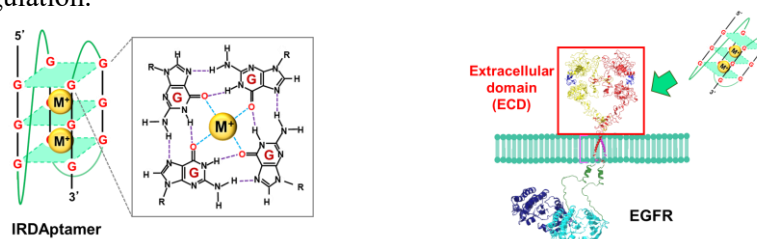
## Development of Anti-cancer Drugs for EGFR Using G-Quadruplex-Based DNA Aptamer: IRDAptamer

(Faculty of Science, Niigata University) ○Yuki Hara, Hidetaka Hagiwara, Toya Kobayashi, Masataka Mizunuma, Kazuhiro Furukawa, and Yoshiro Chuman

**Keywords:** Drug delivery, DNA aptamer, G-quadruplex, IRDAptamer, EGFR

Overexpression and mutation of epidermal growth factor receptor (EGFR), which strongly activates MAPK signaling pathway associated with cell proliferation, leads to tumorigenesis. These dysregulations have been frequently observed in various cancers including non-small cell lung cancer (NSCLC) and glioblastoma (GBM)<sup>1</sup>. In the field of targeted cancer therapy, immunotherapy targeting cell surface receptors is a promising strategy to overcome the lack of specific biological distribution, while one of the EGFR-targeting therapeutic antibody; Cetuximab has been reported to cause anaphylaxis<sup>2</sup>. Recently, RNA/DNA aptamer-based strategy has been attracted because of its specific binding to targets such as antibodies, but with non-immunogenic, small size and ease of modification<sup>3</sup>. Previously, we designed an ion-responsive DNA aptamer (IRDAptamer) with G-quadruplex (G4)-based scaffold and randomized sequences in the flanking loop region<sup>4,5</sup>. G-quadruplex structures are formed based on Hoogsteen pairing in guanine-rich nucleic acid chain with high structural stability and nuclease resistance. Therefore, IRDAptamers targeting EGFR can be considered as promising therapeutic agents.

In this study, we carried out the identification and functional analysis of binding oligonucleotide sequences for EGFR extracellular domain (ECD) screened by using IRDAptamer library. ELISA binding assay and kinetic analysis by biolayer interferometry (BLItz) system revealed that several identified aptamers can specifically bind to EGFR-ECD with high affinity. CD spectrum analysis indicated these sequences formed characteristic hybrid-type G-quadruplex structure in response to biological ionic conditions. In addition, fluorescence analysis showed that these aptamers were effectively taken up into EGFR-overexpression cells via cell surface EGFR. These results suggested that identified EGFR targeting IRDAptamers may be therapeutic agents for targeted drug delivery and functional regulation.



- 1) Thomas R, et al., *Front. Oncol.* **2019**, 800, 9. 2) Chung CH, et al., *N. Engl. J. Med* **2008**, 358, 11.
- 3) Fan R, et al., *Biomed. Pharmacother*, **2023**, 161, 114444. 4) A. Kaneko, Y. Chuman, et al., *Catalysts* **2020**, 10, 1153. 5) Mizunuma M, Y. Chuman, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 14.

double-duplex invasion の高効率化を目指した  $\gamma$ -pcPNA の合成(東京工科大院工<sup>1</sup>) ○岩井 蓮<sup>1</sup>・須磨岡 淳<sup>1</sup>Synthesis of  $\gamma$ -pcPNA for highly efficient double-duplex invasion(<sup>1</sup>Graduate school of Engineering, Tokyo University of Technology)○Ren Iwai<sup>1</sup>, Jun Sumaoka<sup>1</sup>

Pseudo-complementary PNA (pcPNA), in which the adenine (A) base of PNA is replaced with 2,6-diaminopurine (D) and the thymine (T) base is replaced with 2-thiouracil (Us), has been reported to bind to a target region of double-stranded DNA in a manner called "double-duplex invasion"<sup>[1]</sup>. However, in addition to the difficulty in recognizing target sequences containing many GC base pairs, there is a problem that the binding efficiency to the target region is reduced under physiological conditions. To improve these problems, we focused on  $\gamma$ -PNA. It is characterized by randomly folded PNA forming a right-handed helix structure. This is because it has been reported that it forms a more stable double strand with the target DNA<sup>[2]</sup>. Therefore, in this study, we aim to develop a new artificial nucleic acid that can efficiently invade target sequences that are difficult to recognize with normal pcPNA by modifying the  $\gamma$  position of the pcPNA backbone to achieve high binding affinity to DNA. We have already synthesized monomers of  $\gamma$ -pcPNA, and will report on the results of the invasion of double-stranded DNA by the synthesized  $\gamma$ -pcPNA.

ペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid, PNA) の adenine (A) 塩基を 2,6-diaminopurine (D)、thymine (T) 塩基を 2-thiouracil (Us) に置換した pcPNA (pseudo-complementary PNA) は、二本鎖 DNA の標的領域に「double-duplex invasion」と呼ばれる形式で結合することが報告されている<sup>[1]</sup>。しかし、GC 塩基対を多く含む標的配列を認識することが困難であることに加え、生理的条件において標的領域への結合効率が低下する問題がある。これらを改善するために、 $\gamma$ -PNA 着目した。 $\gamma$ -PNA はランダムに折りたたまれた PNA が右巻きのヘリックス構造を形成する特徴がある。標的 DNA とより安定な二重鎖を形成することが報告されているからである<sup>[2]</sup>。よって本研究では、pcPNA 骨格の  $\gamma$  位を修飾することで DNA との高い結合性を実現し、通常の pcPNA では認識困難な標的配列に対して効率的に invasion する新規の人工核酸の開発をする。これまでに、 $\gamma$ -pcPNA の monomer の合成を行っており、発表ではそれらを用いて合成した  $\gamma$ -pcPNA の二本鎖 DNA への invasion 結果についても報告する予定である。

[1] Synthesis of U<sub>s</sub> monomer: J. Lohse, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1999**, *96*, 11804–11808

[2] A. D. AndrasiJ, S. Rapireddy, B. M. Frezza, C. Gayathri, R. R. Gil, D. H. Ly, *Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10258–10267

## 酵素反応を利用した光異性化分子の DNA 位置特異的導入技術の開発

(兵庫県立大院工) ○今井さと・中村光伸・高田忠雄

Enzyme-Catalyzed Methods for Site-Specific Incorporation of Photoisomerizable Molecules into DNA (*Graduate School of Engineering, University of Hyogo*) ○Sato Imai, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada

Photo-controllable antisense oligonucleotides are a technology that allows spatiotemporal control of activity by incorporating photoresponsive molecules. By altering or cleaving molecular structures through light irradiation, the binding of antisense oligonucleotides to target mRNA can be switched on and off. This enables precise regulation of gene expression and offers potential for treatments with reduced side effects and off-target effects. In this study, we aimed to establish a simple method for synthesizing photo-controllable artificial nucleic acids capable of reversible association and dissociation of duplexes. Using the base excision enzyme Uracil DNA glycosylase (UDG), we developed a site-specific introduction method for azobenzene derivatives. An 18-mer DNA containing dU was treated with UDG to convert dU into an abasic site, followed by reductive amination with an amino-functionalized azobenzene in the presence of  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . The reaction proceeded with high efficiency, allowing quantitative replacement of dU with azobenzene. This demonstrated the utility of this approach for the preparation of photoresponsive artificial nucleic acids.

**Keywords :** DNA; Photoisomerization; Azobenzene; Uracil DNA Glycosylase

光制御アンチセンス核酸は、光応答分子を導入して活性を時空間的に制御する技術である。光照射により分子の構造を変化させたり切断することで、アンチセンス核酸の標的 mRNA への結合をオン・オフで切り替える。これにより、遺伝子発現を精密に制御し、副作用やオフターゲット効果を抑えた治療が期待されている。本研究では、二本鎖の会合・解離の光制御可能な人工核酸の簡便な合成法の確立を目指して、塩基除去酵素 Uracil DNA glycosylase (UDG)を用いたアゾベンゼン誘導体の位置特異的導入法の開発を行った。

dU を含む 18-mer DNA を UDG で処理することで、dU を abasic site に変換し、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$  存在下、アミノ基を有するアゾベンゼンと還元のアミノ化による共役反応を行った(Fig.1)。反応は極めて効率よく進行し、定量的に dU をアゾベンゼンに置き換えることが可能であり、光応答性人工核酸の作製法として有用であることが分かった。

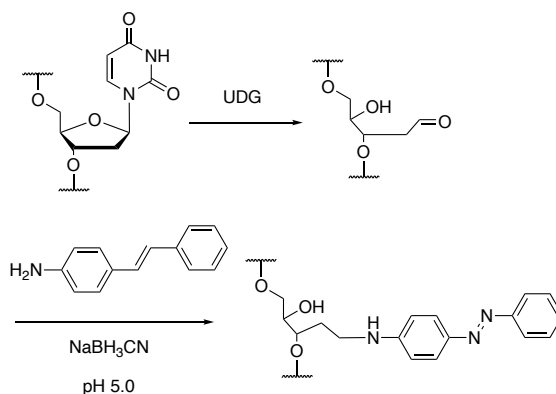


Fig. 1 Site specific incorporation of azobenzene into DNA.

## DNA 骨格を基盤としたマルチピレン集積体の構築と発光特性評価

(兵庫県立大院工) ○宮地祐衣・中村光伸・高田忠雄

Development and Photophysical Characterization of Multi-Pyrene Aggregates Constructed Using the DNA Scaffold (*Graduate School of Engineering, University of Hyogo*) ○Yui Miyaji, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada

We developed luminescent materials by assembling pyrene molecules using the DNA backbone as a scaffold. DNA containing dU residues was enzymatically treated with uracil DNA glycosylase (UDG) to generate highly reactive abasic sites, followed by reductive amination with aminopyrene to covalently introduce pyrene at the dU positions. Furthermore, replacing consecutive dU sequences with pyrene allowed the construction of pyrene clusters within the DNA structure. The luminescent properties of the constructed pyrene clusters were evaluated.

**Keywords :** DNA; Pyrene; Uracil DNA Glycosylase; Excimer; Fluorescence

DNA を基盤とした発光材料は、構造の多様性や自己組織化能を活用することで、高効率な発光や色の調整が可能である。また、生体適合性が高いため、バイオセンサーや医療分野への応用が期待されている。本研究では、ユニークな発光特性を持つピレンを発光分子として採用し、DNA を構造骨格としてピレン分子をらせん状に集積させた発光材料を開発した。具体的には、dU を含む DNA を UDG で酵素処理し、反応性の高い abasic site を生成した。その後、アミノピレンとの還元的アミノ化反応を行い、dU 部位にピレンを共有結合で導入した。HPLC および MALDI-MS を用いて生成物を確認し、高い反応効率で dU をピレンに定量的に変換できることを示した。

アミノピレン (PyN) およびメチルアミノピレン (PyC) を導入した DNA の蛍光測定を行った結果、400 nm 付近にピレンに由来する発光が観測された。さらに、ピレンを二分子連続して導入した DNA の蛍光を測定したところ、エキシマーに由来する長波長の発光が確認された(Fig.1)。このことから、DNA 二重螺旋構造内でピレン分子が積層した会合体を形成し、その結果として発光特性が変化することが明らかになった。

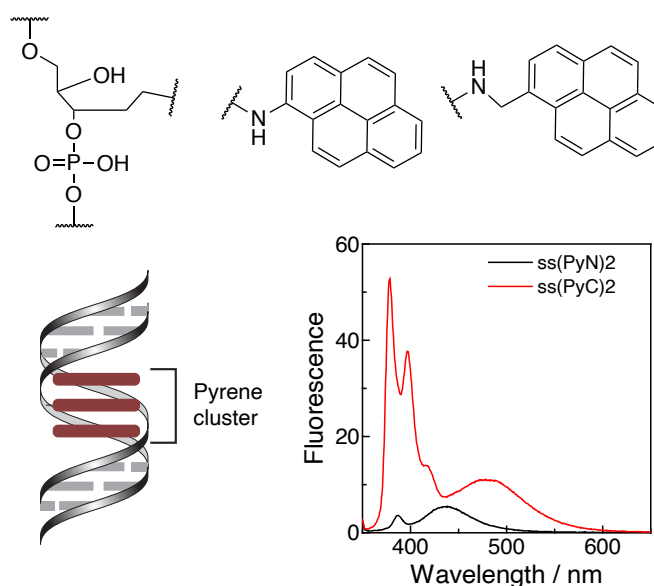


Fig. 1 Pyrene clusters constructed based on DNA structure and fluorescence response of pyrenes.

## $\beta$ -ガラクトシダーゼによって活性化されるプロドラッグ型オリゴヌクレオチドの合成と性質

(東京科学大学 生命理工<sup>1</sup>) 宮地健人<sup>1</sup>・○竹内啓太<sup>1</sup>・清尾康志<sup>1</sup>

Synthesis and properties of prodrug-type oligonucleotides activated by  $\beta$ -galactosidase (<sup>1</sup>*Institute of Science Tokyo, Department of Life Science and Technology*) Kento Miyaji,<sup>1</sup> ○ Keita Takeuchi,<sup>1</sup> Kohji Seio<sup>1</sup>

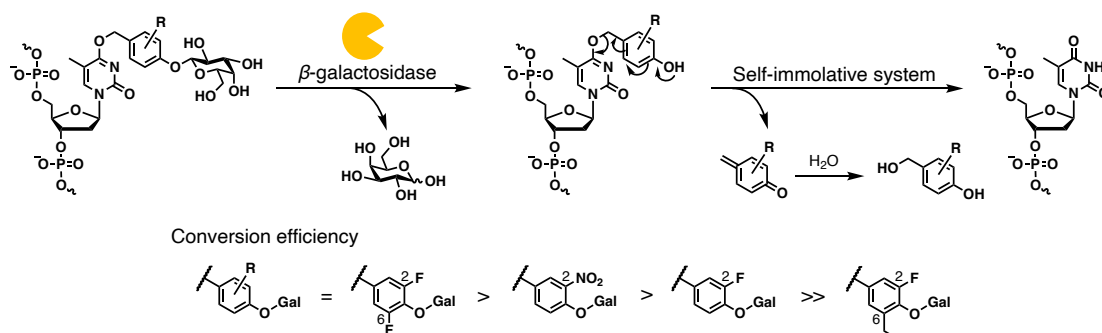
Prodrug technology enables efficient drug delivery to target tissues and target site-selective drug efficacy. We have previously reported  $\beta$ -galactosidase-responsive prodrug-type oligodeoxynucleotides (ODNs) designed to apply this technology to oligonucleotide therapeutics.<sup>1)</sup> In this study, aiming for further modification on the benzene ring of the self-immolative linker, we evaluated the effect of substituent variations on the activation efficiency by  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal).

Prodrug-type ODNs were synthesized by previously established methods.<sup>1)</sup> In  $\beta$ -gal assays, replacing the 2,6-difluorobenzene with 2-fluorobenzene resulted in an approximately 2-fold decrease in activation efficiency. Furthermore, 2-fluoro-6-ethylbenzene, synthesized as a model for further modification, exhibited a significant reduction in activation efficiency. In this poster, we will provide a detailed report and discussion on these results.

**Keywords :** Oligonucleotides; Prodrug;  $\beta$ -galactosidase; Self-immolative linker

プロドラッグ技術は、医薬品の標的組織への効率的な送達や、標的部位選択的な薬効発現を可能にする。我々はこれまでに、この技術の核酸医薬への応用を目指した  $\beta$ -ガラクトシダーゼ応答性プロドラッグ型オリゴデオキシヌクレオチド (ODNs) を報告した<sup>1)</sup>。本研究では、自己犠牲リンカーのベンゼン環へのさらなる修飾導入を目的とし、置換基変換が  $\beta$ -ガラクトシダーゼによる活性化効率に与える影響を評価した。

プロドラッグ型 ODNs はこれまでに確立済みの方法で合成した<sup>1)</sup>。 $\beta$ -ガラクトシダーゼアッセイの結果、2,6-ジフルオロベンゼンを2-フルオロベンゼンに変更した場合、活性化効率が約2倍低下することが確認された。また、さらなる修飾のモデルとして合成した2-フルオロ-6-エチルベンゼンでは、活性化効率が著しく低下した。本発表ではこれらの結果と考察について詳しく報告する。



1) K. Miyaji, Y. Masaki, K. Seio, *Bioconjugate Chem.* **2024**, 35, 1587–1607.

## 新規リン原子導入ピレンの合成とその蛍光特性および DNA への導入

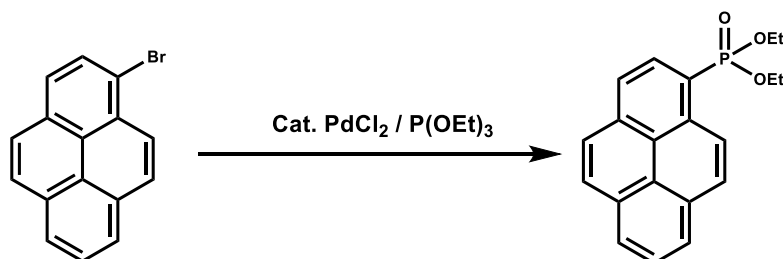
(群馬大学理工学部) 若狭 京・森口 朋尚

(Gunma University) Ukyo Wakasa, Tomohisa Moriguchi

Pyrene has been used as a labeling agent for biomolecules such as nucleic acids. Modification of pyrene with a phosphorus atom is expected to result in a long wavelength shift of absorption and emission wavelengths and improved fluorescence quantum yield. Such a fluorescent substance is one of the properties required for fluorescent probes used to observe biological materials such as DNA. Therefore, we synthesized pyrene derivatives modified with phosphorus atoms and measured their absorption and fluorescence spectra to clarify their spectral properties. Among the compounds modified with phosphorus atoms, 1-pyrenylphosphonic acid showed a specific peak in highly polar solvents. The compounds were also analyzed for excimer emission. We also report the synthesis for the application of DNA fluorescent labeling.

*Keywords ; fluorescence ; pyrene ; nucleic acid*

ピレンは核酸など生体分子の標識化剤として用いられてきた。ピレンへのリン原子の導入は化合物の吸収および発光大波長の長波長化や蛍光量子収率の向上が期待される。このような蛍光物質は、DNA などの生体関係物質の挙動を観測するために用いられる蛍光プローブに求められる性質の 1 つである。そのため、リン原子を導入したピレン誘導体を合成し、その吸収・蛍光スペクトルを測定することで分光学的特性を明らかにした。リン原子の導入したいいくつかの化合物の中で 1-ピリニルホスホン酸は極性の高い溶媒中で特徴的な大きなピークを示し、溶媒の極性に応答することが明らかになった。また、ピレン残基を二つもつ誘導体の合成を行い、エキシマー発光についても分析を行った。そして DNA の蛍光標識化への応用を行うための合成を検討したので併せて報告する。



## π 共役を拡張した 3 脚型キノン-シアニン色素の合成と核酸検出への応用

(和歌山大院シス工) ○坂本 隆

Synthesis of  $\pi$ -extended tripodal quinone-cyanine dye and its application to nucleic acid detection (<sup>1</sup>Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University) ○Takashi Sakamoto

QCy(MeBT)<sub>3</sub><sup>1</sup>, a triplex quinone-cyanine fluorophore with three *N*-methylbenzothiazolium cations (MeBT), binds to duplex (ds) and quadruplex (G4) DNA with comparable affinities, but responds at different fluorescence wavelengths ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/600$  (dsDNA) and  $\lambda_{\text{ex/em}} = 570/700$  (G4 DNA)), allowing color-coded imaging of intracellular duplex/quadruplex DNA. However, its excitation and fluorescence wavelengths are close to the visible light range, making it difficult to image nucleic acids deep *in vivo* due to its low tissue permeability. On the other hand, the tripodal quinone-cyanine fluorophore with *N*-benzylbenzothiazolium cation - QCy(BnBT)<sub>3</sub><sup>2</sup> exhibits a G4 nucleic acid-selective near-infrared fluorescence response ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 570/800$ ), but requires optical excitation in the visible region. However, it requires optical excitation in the visible light region, so further wavelength extension was necessary. In this study, we attempted to develop a tripodal quinone-cyanine fluorophore with an extended  $\pi$ -conjugation system. A tripodal quinone-cyanine fluorophore with three *N*-methylnaphthothiazolium cations (QCy(MeNT)<sub>3</sub>) was designed and synthesized. A red shift of the absorption maximum at 80 nm was observed compared to QCy(MeBT)<sub>3</sub>, suggesting a significant extension of the excitation wavelength. The results of the study of the ability of QCy(MeNT)<sub>3</sub> to detect nucleic acids are discussed. **Keywords**: Tripodal quinone-cyanine dyes;  $\pi$ -extension; Nucleic acids detection; Guanine-quadruplex

3つの *N*-メチルベンゾチアゾリウムカチオン (MeBT) を有する 3 脚型キノン-シアニン蛍光色素である QCy(MeBT)<sub>3</sub><sup>1</sup> は、2 重鎖 (ds) および 4 重鎖 (G4) DNA とそれぞれ同程度の親和性で結合するが、応答する蛍光波長が異なる ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 470/600$  (dsDNA) と  $\lambda_{\text{ex/em}} = 570/700$  (G4 DNA)) ため、細胞内 2 重鎖/4 重鎖 DNA の色分けイメージングが可能である。しかしその励起・蛍光波長がほぼ可視光領域であるため生体組織透過性が低く、生体深部の核酸イメージングが困難であった。一方で、*N*-ベンジルベンゾチアゾリウムカチオンを有する 3 脚型キノン-シアニン蛍光色素 - QCy(BnBT)<sub>3</sub><sup>2</sup> は、G4 核酸選択的な近赤外蛍光応答 ( $\lambda_{\text{ex/em}} = 570/800$ ) を示すが、可視光領域での光励起を必要とすることから、さらなる長波長化が必要であった。本研究では、 $\pi$  共役系を拡張した 3 脚型キノン-シアニン蛍光色素の開発を試み、3つの *N*-メチルナフトチアゾリウムカチオンを持つ 3 脚型キノン-シアニン蛍光色素 (QCy(MeNT)<sub>3</sub>) を設計・合成した。結果、QCy(MeBT)<sub>3</sub> に比べて 80 nm の吸収極大のレッドシフトが観測され、励起波長の大幅な長波長化が示唆された。QCy(MeNT)<sub>3</sub> による核酸検出能力を調べた結果について議論する。

1) T. Sakamoto, Z. Yu, Y. Otani, *Anal. Chem.*, **2022**, 94, 4269–4276; 2) Y. Muraoka, J. Muramoto, Y. Yasuhara, M. Kawatake, T. Sakamoto, *Anal. Chem.*, **2023**, 95, 17162–17165.

## ・ 非ヌクレオシド骨格を導入した GalNAc 修飾デコイ核酸の合成

(群馬大学<sup>1</sup>) ○茂木 祐太<sup>1</sup>・石井 希実<sup>1</sup>・松尾 一郎<sup>1</sup>・森口 朋尚<sup>1</sup>

Synthesis of GalNAc-modified decoy oligonucleotides bearing non-nucleotide backbone  
(<sup>1</sup>Gunma University) ○Yuta Motegi,<sup>1</sup> Nozomi Ishii,<sup>1</sup> Ichiro Matsuo<sup>1</sup> Tomohisa Moriguchi,<sup>1</sup>

In recent years, there have been many studies on oligonucleotide therapeutics that artificially control gene expression that causes diseases and function as medicines, and one of these methods is the decoy method. The decoy method uses decoy nucleic acids, which are double-stranded DNAs with artificially synthesized base sequences that bind to transcription factors, to bind to proteins related to transcription and suppress transcription. Our laboratory has previously developed decoy oligonucleotides targeting HNF4α, a transcription factor that is specifically expressed in hepatocytes. To enable efficient delivery to hepatocytes, we designed modified decoy oligonucleotides with GalNAc modification. In this study, to clarify how the chemical structure of the GalNAc modification site affects the efficiency of introduction into cells, we designed analogs in which the normal nucleoside backbone was changed to a non-nucleoside backbone, diethanolamine, and synthesized the phosphoramidite and GalNAc derivatives, as well as the decoy oligonucleotides.

近年では、疾病の原因となる遺伝子発現を人為的に制御し、医薬品としての機能を発揮する核酸医薬の研究が数多く行われ、その手法の一つにデコイ法がある。デコイ法は、転写因子に結合する塩基配列を人工的に合成した二本鎖 DNA であるデコイ核酸を用いて、転写に関連するタンパク質に結合することで転写を抑制することができる。当研究室では、これまでに肝細胞特異的に発現している転写因子である HNF4α を標的としたデコイ核酸の開発を行ってきた。肝細胞への効率的な送達を可能とするため、GalNAc 修飾を施した修飾デコイ核酸をデザインした。本研究では、GalNAc 修飾部位の化学構造が細胞への導入効率にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、通常のヌクレオシド骨格部分を非ヌクレオシド骨格であるジエタノールアミンに変更した類縁体を設計し、そのホスホロアミダイト体の合成と GalNAc 誘導体の合成、デコイ核酸の合成を行った。



## 2'水酸基にスルホネート型修飾を有する 5-メチルウリジン誘導体を含むオリゴヌクレオチドの合成と性質

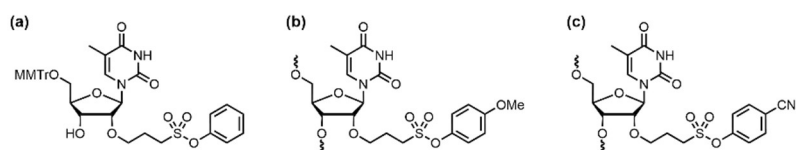
(東京科学大学 生命理工<sup>1</sup>・東京科学大大学院 生命理工<sup>2</sup>) ○大石 健智<sup>1</sup>・瀧川 駿太朗<sup>2</sup>・友利 貴人<sup>2</sup>・村上 英太郎<sup>2</sup>・正木 慶昭<sup>2</sup>・清尾 康志<sup>2</sup>

Synthesis and properties of oligonucleotides incorporating 5-methyluridine derivatives with sulfonate-type modifications on the 2'-hydroxyl group. (<sup>1</sup>*Dept. Life Sci. Tech., Science Tokyo*, <sup>2</sup>*Sch. Life Sci. Tech., Science Tokyo*) ○Taketo Oishi<sup>1</sup>, Shuntaro Takigawa<sup>2</sup>, Takahito Tomori<sup>2</sup>, Eitaro Murakami<sup>2</sup>, Yoshiaki Masaki<sup>2</sup>, Kohji Seio<sup>2</sup>)

Antisense nucleic acids (ASOs), a type of nucleic acid medicine, are used as therapeutic agents that target RNA. By incorporating modified nucleic acids into ASOs to improve nuclease resistance and duplex stability, they gain medicinal properties, such as the suppression of mRNA-to-protein translation and the control of the splicing process from pre-mRNA to mRNA. In the approach to modifying the 2'-hydroxyl group of nucleic acids, attempts to incorporate methoxyethyl group (2'-MOE) have been worked on, contributing to nuclease resistance and duplex stability. To further improve the function, we focused on novel modified nucleic acids with sulfonyls at the 2'-hydroxyl group. In a previous study, 5-methyluridine derivatives having a sulfonyl fluoride structure were synthesized. Furthermore, modified nucleic acid (a) with a sulfonate structure was synthesized using the reactivity of sulfonyl fluoride. In this study, we synthesized two 5-methyluridine derivatives (b, c) having a sulfonate structure at the 2'-hydroxyl group. We report on the evaluation of duplex formation ability by incorporating synthesized modified nucleic acids into oligonucleotides and measuring the duplex melting temperature.

**Keywords :** *Antisense oligonucleotides, Duplex melting temperature, Modified nucleic acid, Sulfonate modification*

核酸医薬の一種のアンチセンス核酸(ASO)は、RNA を標的とした治療薬として用いられる。ASO への修飾核酸の導入により、核酸分解酵素耐性や二重鎖安定性などを向上させることで、mRNA からタンパク質への翻訳の抑制や、pre-mRNA から mRNA へのスプライシング過程の制御など、薬効を獲得している。核酸の 2'水酸基を修飾するアプローチでは、メトキシエチル基(2'-MOE)を導入する試みが取り組まれており、核酸分解酵素耐性や二重鎖安定性に寄与している。さらなる機能向上を目指し、2'水酸基にスルホニルを持つ新規修飾核酸に着目した。先行研究では、スルホニルフルオリド構造を持つ 5-メチルウリジン誘導体、さらにスルホニルフルオリドの反応性を利用し、スルホネート構造を持った修飾核酸(a)が合成された。本研究では、2 種類の 2'水酸基にスルホネート構造を有する 5-メチルウリジン誘導体(b, c)を合成した。合成された修飾核酸をオリゴヌクレオチドに導入し、二重鎖融解温度を測定することによる二重鎖形成能の評価について報告する。



## 核酸を光化学修飾するための光触媒導入型オリゴ DNA プローブの開発

(<sup>1</sup> 東北大多元研, <sup>2</sup> 東北大院理, <sup>3</sup> 東北大学際研) ○山野雄平<sup>1</sup>, 鬼塚和光<sup>1,2</sup>, 佐藤伸一<sup>3</sup>, 永次史<sup>1,2</sup>

Photocatalyst-Introduced Oligo DNA Probe for Photochemical Labeling of Nucleic Acid (<sup>1</sup> IMRAM, Tohoku University, <sup>2</sup> Graduate School of Science, Tohoku University, <sup>3</sup> FRIS, Tohoku University) ○Yuuhei Yamano<sup>1</sup>, Kazumitsu Onizuka<sup>1,2</sup>, Shinichi Sato<sup>3</sup>, Fumi Nagatsugi<sup>1,2</sup>

We developed the photochemical labeling method for nucleic acids based on photocatalytic reaction. We designed photocatalyst-introduced oligo DNA probes (Cat-ODNs). The target sequence that forms duplex with Cat-ODN was photo-irradiated in the presence of the modifier. We expected that the modifier and the nucleobase in the target sequence would be activated based on photo-induced electron transfer, and the following reaction between them would result in labeling. In this presentation, we will report on the efficiency and sequence selectivity of this photochemical labeling reaction using various combinations of photocatalysts and modifiers.

**Keywords :** photoreaction, photochemical labeling, DNA, photocatalyst, chemical labeling

核酸を配列選択的に化学修飾する方法は、高機能な核酸材料や核酸医薬の創製・核酸のラベル化にとって重要である。これに対し我々は、光触媒反応を利用した核酸修飾法の開発に取り組んでいる。具体的には、光触媒を配列末端に導入したオリゴ DNA プロブ (Cat-ODN1,2) を設計した (Fig. 1)<sup>1)</sup>。修飾剤存在下、Cat-ODN と二重鎖形成した標的配列に光照射すると、修飾剤と核酸塩基が光誘起電子移動により酸化活性化、反応することで修飾が達成されると考えた。これまでに、光触媒に Eosin、Ru 錯体、ATTO465 を、修飾剤に AUra-N<sub>3</sub> などのウラゾール系化合物を用いて修飾反応の進行を確認している。最近我々はウラゾール以外の骨格を有する数種の化合物が、同様の光活性化に基づく核酸修飾反応を起こすことを見出した。本発表では、様々な光触媒と修飾剤の組み合わせを用いた際の反応効率及び配列選択性について報告する。

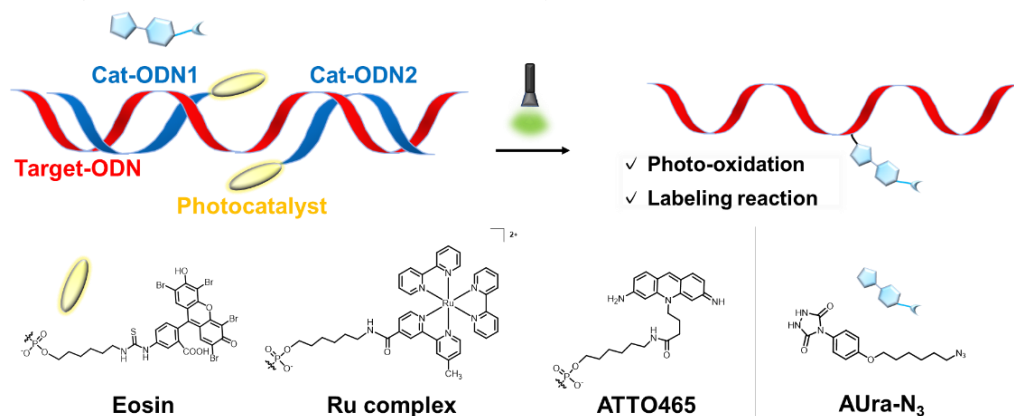


Fig. 1 光触媒反応を利用した核酸の光化学修飾の設計

1) Y. Yamano, K. Onizuka, M. Sasaki, S. Sato, F. Nagatsugi, *Chem. Lett.* **2022**, 51, 1121.

## ニトロベンジル基で修飾した人工核酸の合成と低酸素細胞集積特性

(青学大理工) ○佐藤 瞭・前原 大悟・西原 達哉・田邊 一仁

Synthesis of artificial oligodeoxynucleotides modified with alkylated nitrobenzyl groups and their accumulation in hypoxic cells(College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University)○Ryo Sato, Daigo Maehara, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

Although artificial oligodeoxynucleotides (ODNs) have been actively designed and developed, their low cell membrane permeability and low accumulation characteristics in diseased cells and tissues have been identified as challenges for their practical use.

We have shown that DNA aggregates consisting of hydrophilic DNA and hydrophobic alkyl chains exhibit high cell membrane permeability and resistance to enzymatic degradation. In addition, incorporation of *o*-nitrobenzyl groups into ODNs resulted in accumulation within the hypoxic cells in a selective manner. However, the function of the ODNs was insufficient, and therefore, there is increasing demands for the preparation of ODNs with high performance. In this study, we designed a DNA oligomer ( $N_{diAlkyl}$ -ODN) in which a nitrobenzyl group equipped with a dialkyl group to further improve its function. We successfully prepared  $N_{diAlkyl}$ -ODN by standard phosphoramidite methods, and characterized their function in hypoxic cells.

**Keywords :** Hypoxic cells, Nitrobenzyl groups, Oligodeoxynucleotides

近年、遺伝子レベルで治療可能な核酸医薬品が次世代医薬品として注目されている。しかし、核酸医薬品には、低い細胞膜透過性と病的細胞・組織への集積特性の改善が課題として指摘されている。

我々の研究グループでは、親水性の DNA 鎖と疎水性のアルキル鎖から成る DNA 会合体が高い細胞膜透過性および酵素分解耐性を示すこと、また、アルキル基を備えた *o*-ニトロベンジル基を組み込んだ DNA オリゴマー (N-ODN) は、低酸素細胞に選択的に蓄積することを明らかにしてきた。しかし、現時点でその細胞内蓄積能は十分ではなく、さらなる改良が求められていた。そこで本研究では、人工核酸の機能向上を目指して、ニトロ基のパラ位に加えて、メタ位にもアルキル基を導入したジアルキルニトロベンジル基をチミン塩基上に導入した DNA オリゴマー ( $N_{diAlkyl}$ -ODN) を設計した。 $N_{diAlkyl}$ -ODN の合成は、これまでと同様にホスホロアミダイト法を用いた自動合成により行った。得られた  $N_{diAlkyl}$ -ODN の臨界会合体形成濃度(CAC)を測定したところ、 $7.62 \mu M$  と算出され、従来型の  $N_{Alkyl}$ -ODN(CAC: $17.5 \mu M$ )よりも低濃度で会合体を形成することが分かった。現在、培養細胞を用いて低酸素細胞への蓄積特性を調べている。また、ニトロベンジル基は光照射にも応答し得ることから、光刺激に応答する人工核酸としての活用も試みている。

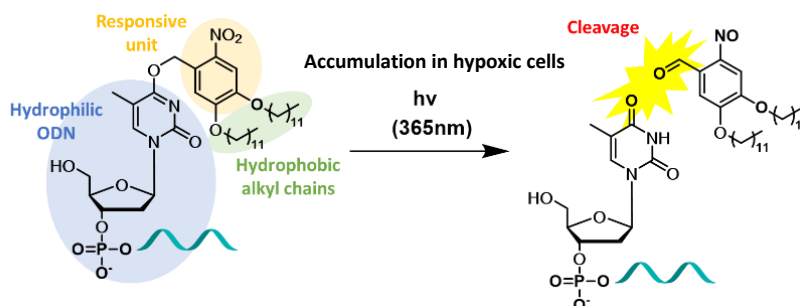


Figure 1. Molecular design of  $N_{diAlkyl}$ -ODN

## ・光増感剤修飾オリゴ核酸の細胞取り込みと光ノックダウン効果の評価

(東京科学大<sup>1)</sup>)○吉田 七唯<sup>1</sup>・金森 功吏<sup>1</sup>・金子 翔大<sup>1</sup>・小倉 俊一郎<sup>1</sup>・湯浅 英哉<sup>1</sup>

Evaluation of the cellular uptake and photoknockdown effects of photosensitizer-conjugated antisense oligonucleotides (School of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo)

○Nanai Yoshida,<sup>1</sup> Takashi Kanamori,<sup>1</sup> Shota Kaneko,<sup>1</sup> Shun-ichiro Ogura,<sup>1</sup> Hideya Yuasa<sup>1</sup>

In recent years, targeted gene knockdown therapies using RNAi technology are being put to practical use. However, long-term systemic exposure to siRNA drugs causes challenges of low tissue selectivity and off-target effects. In order to control the knockdown activity spatiotemporally by photoirradiation, we attached a photosensitizer (PS) to ASO and established a method for photooxidizing guanine (G) in a target RNA. We have employed a tiny PS, nitrobiphenyl (NBP), which exclusively produces  $^1\text{O}_2$ , ( $\Phi_{\Delta}$  0.93),<sup>1)</sup> modified ASOs with it and succeed in the photooxidation of G in target RNAs. In this study, timing in the transfection of NBP-ASO was optimized because there were concerns of ASO degradation by nucleases. An increase of fluorescence intensity was observed after photoirradiation of the transfected fluorescently labeled ASO, suggesting a possibility of photochemical internalization (PCI)<sup>2)</sup>.

**Keywords:** photosensitizer, antisense, photocontrol

近年、RNAi による標的遺伝子のノックダウン治療法が実用化されている。しかし siRNA 医薬が長期的に全身へばく露されることによるオフターゲット効果や組織選択性の低さが課題である。そこで、光照射で時空間的にノックダウン活性を制御するため、光増感剤(PS)をアンチセンス核酸(ASO)に修飾し、標的 RNA のグアニン(G)を 8-oxoG( $^{\circ}\text{G}$ )に光酸化する方法を確立した。これまでに我々は独自に開発した小型 ( $0.5 \times 1.0 \text{ nm}$ ) で良好な  $^1\text{O}_2$  生成収率を示すニトロビフェニル (NBP;  $\Phi_{\Delta}$  0.93)<sup>1)</sup> を導入した ASO を用い、標的 RNA の G の光酸化に成功している。本研究では、ASO のヌクレアーゼによる分解が懸念されたため NBP-ASO のトランスフェクション時間の最適化を行った。また、蛍光標識 ASO のトランスフェクション後の光照射によって蛍光強度が増大したことから光化学的内在化(PCI)<sup>2)</sup>の可能性が示唆された。

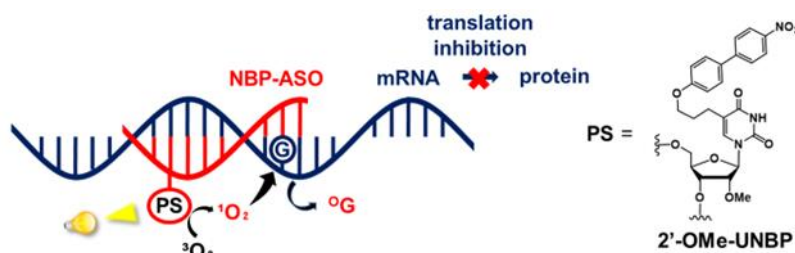


図 1 NBP-ASO を用いた mRNA の光ノックダウン

1) Y. Tsuga, et al. Chem. Asian J. 2019, 14, 2067-2071.

2) Youyong Yuan, et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 11419-1423

## 固相合成を用いた長鎖ヌクレオペプチドの合成

(群大院理工<sup>1</sup>)○松本 衣理<sup>1</sup>・福島 由乃<sup>1</sup>・森口 朋尚<sup>1</sup>

Solid-phase synthesis of long-chain nucleopeptides(*Graduate School of Science and Technology, Gunma University*) ○ Eri Matsumoto,<sup>1</sup> Yukino Fukushima,<sup>1</sup> Tomohisa Moriguchi<sup>1</sup>

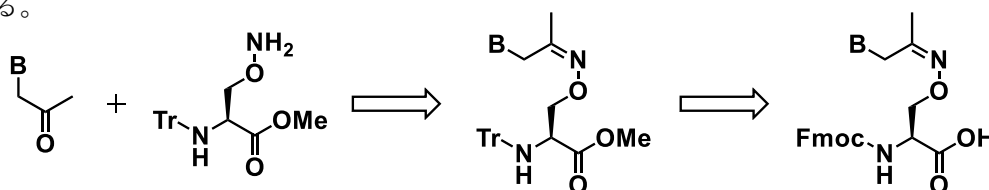
Nucleopeptides are synthetic oligonucleotide analogs in which amino acids having nucleobases as a side chain and natural amino acids are alternately linked. While they can form stable duplexes with complementary DNA and RNA and incorporation of diverse amino acids can improve properties such as water solubility and cell membrane permeability. In this study, we designed nucleopeptides with oxime linkages to address this limitation and investigated their monomer synthesis and oligomerization.

Oxime linkage formation was successfully achieved by condensing a methyl ketone-functionalized nucleobase derivative with an aminooxy-functionalized serine derivative. The monomer was then synthesized by deprotecting the serine carboxyl group and Fmoc-protecting the amino group.

*Keywords : Nucleopeptide*

ヌクレオペプチドは、核酸塩基を側鎖に持つアミノ酸と天然のアミノ酸が交互に連結した人工核酸の類縁体である。核酸相補鎖との安定した二重鎖形成に加え、様々なアミノ酸の導入により水溶性や細胞膜透過性を向上させることが可能である。しかし、従来のアミド結合型ヌクレオペプチドでは、長鎖化に伴う溶解性の低下が課題であった。そこで本研究では、側鎖の構造をアミド結合からオキシム結合に置き換えたヌクレオペプチドを設計し、モノマー合成とオリゴマー化について検討した。

オキシム結合形成は、メチルケトン基を持つ核酸塩基誘導体とアミノオキシ基を持つセリン誘導体との縮合反応により成功した。その後、カルボキシル基を遊離し、アミノ基はFmocにより保護することで自動合成機による合成可能なモノマーを合成した。さらに、合成したモノマーを用いてオリゴマーの合成についても検討したので、併せて報告する。

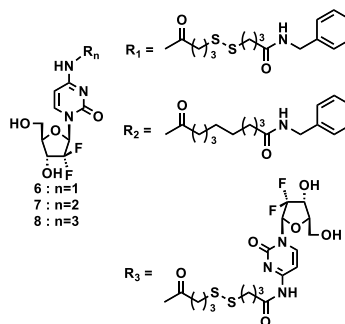
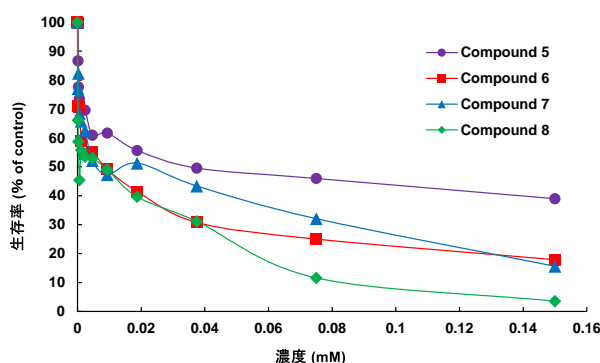


(神奈川大院工<sup>1</sup>・神奈川大化学生命<sup>2</sup>) ○飯塚 健太<sup>1</sup>・見目 達哉<sup>1</sup>・藤原 章司<sup>2</sup>・小野 晶<sup>2</sup>

It is known that nucleoside antileukemia drug araC and gemcitabine, which is used as a treatment for lung and pancreatic cancer, are metabolized by the enzyme cytidine deaminase in the blood plasma into inactive uracil. Therefore, by protecting the amino group at the 4th position of the base, it is possible to prevent inactivation by resisting cytidine deaminase. In this study, we have introduced the disulfide side chain into nucleoside therapeutics, and we are expecting to improve their pharmacological activity. The compounds **6**, **7**, and **8** and Gemcitabine were prepared at the same concentration (0.15 mM-0.15 mM) and then added to the culture medium of HeLa cells. As a result, although no significant improvement in pharmacological activity was observed, it was confirmed that the disulfide side chains used in this study could be removed by reduced glutathione.

ヌクレオシド抗白血病薬 **araC** や、肺癌、膵臓癌の治療薬として使われる **Gemcitabine** は血漿中の酵素であるシチジンデアミナーゼにより、そのほとんどが活性を持たないウラシル体に代謝されることが知られている。そこで、塩基部 4 位アミノ基を保護することでシチジンデアミナーゼに対抗し不活性化を防ぐ。本研究の目的は、ジスルフィド側鎖をヌクレオシド医薬品に導入し、薬理活性の向上を期待している。

合成した化合物 **6, 7, 8** と未修飾の Gemcitabine をそれぞれの濃度を同じ値(0.15  $\mu$ M-0.15 mM)に調製したのち、HeLa 細胞の培養液に添加した。MTT assay 法より、ジスルフィド側鎖を有することによる、大幅な薬理活性の向上は確認できなかったが、本研究で使用したジスルフィド側鎖は、還元型グルタチオンによって脱離することが確認できた。



## 抗 CSV アプタマーを介した腫瘍細胞のシグナル増幅型検出

(熊本大院先端<sup>1</sup>・熊本大院生命<sup>2</sup>・(株)オジックテクノロジーズ<sup>3</sup>) ○津久井 瑞貴<sup>1</sup>・森 萌音<sup>1</sup>・北村 裕介<sup>1</sup>・中島 雄太<sup>1</sup>・岩槻 政晃<sup>2</sup>・熊本 清太郎<sup>3</sup>・安田 敬一郎<sup>3</sup>・勝田 陽介<sup>1</sup>・中西 義孝<sup>1</sup>・井原 敏博<sup>1</sup>

Detection of tumor cells by the amplified signal through anti-CSV aptamer (<sup>1</sup>*Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University*, <sup>2</sup>*Faculty of Life Sciences, Kumamoto University*, <sup>3</sup> *OGIC Technologies Co., Ltd.*) ○Mizuki Tsukui,<sup>1</sup> Mone Mori,<sup>1</sup> Yusuke Kitamura,<sup>1</sup> Yuta Nakashima,<sup>1</sup> Masaaki Iwatsuki,<sup>2</sup> Seitaro Kumamoto,<sup>3</sup> Keiichiro Yasuda,<sup>3</sup> Yousuke Katsuda,<sup>1</sup> Yoshitaka Nakanishi,<sup>1</sup> Toshihiro Ihara<sup>1</sup>

Tumor cells shed from primary and metastatic cancers into blood (circulating tumor cells, CTCs) are considered to be the roots of metastases and are emerging as a novel target for prognostic marker. CTCs undergoing epithelial mesenchymal transition (EMT) highly express CSV (Cell Surface Vimentin) on their cell membranes. In this study, we tried to detect mesenchymal CTCs using anti-CSV aptamer combining with entropy-driven catalysis, EDC.

**Keywords :** Nucleic Acid; DNA aptamers; DNA Circuit; Tumor cells; Liquid Biopsy

原発腫瘍組織から血管中に浸透し、全身を循環する腫瘍細胞 (circulating tumor cell、CTC) は、転移の主因と考えられており、近年、新たな診断マーカーとしても注目を集めている。以前より当研究室では、固形がんの細胞表面に高発現することが知られている上皮細胞接着因子 (EpCAM) に着目し、そのアプタマーと触媒的発光増幅技術 (エントロピー駆動型 DNA サークット、EDC) とを組み合わせた CTC の高感度簡易検出系の構築に取り組んできた。しかし、上皮間葉転換を経て EpCAM の発現量が著しく低下した CTC の存在も報告されている。このような細胞では、細胞膜上に CSV (Cell Surface Vimentin) が高発現しているため、本研究では抗 CSV アプタマーを利用し、間葉系の性質を有する腫瘍細胞の検出を試みた。

Fig. 1 に示す通り、 $1 \times 10^5$  個の T24 (ヒト膀胱癌細胞: CSV 高発現細胞) と MDA-MB-453 (ヒト乳癌細胞: CSV 低発現細胞) に対し、タグ付抗 CSV アプタマーを添加し、洗浄後、マスク/トリガー二本鎖 (タグとの鎖交換によりトリガー鎖を放出する) を添加した。その後、上澄みを回収し、タンデム二本鎖複合体 (蛍光オフ) と燃料 DNA の混合溶液に添加した。T24 では発光増幅がみられ、その発光は目視にて確認可能であった。タグ付きアプタマー未添加の場合、ならびにアプタマー配列をスクランブル化したタグ付きの DNA を添加した場合には発光は観察されなかった。また、MDA-MB-453 からはいずれの場合も発光はみられなかった。以上の結果より、腫瘍細胞に結合した抗 CSV アプタマーを介し、特異的に発光が増幅していることがわかった。

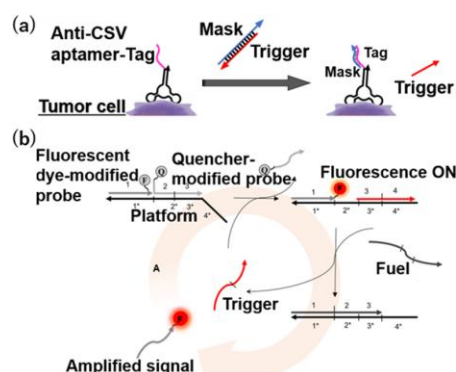


Fig. 1. (a) Anti-CSV aptamer-mediated strand exchange on cancer cells. (b) Signal amplification by entropy-driven catalysis, EDC.

## ブランチ型自己犠牲リンカーで核酸塩基間を架橋したチミジンダイマーの合成と性質

(東京科学大学生命理工<sup>1</sup>) ○羽生 愛深<sup>1</sup>・宮地 健人<sup>1</sup>・清尾 康志<sup>1</sup>

Synthesis and properties of thymidine dimers cross-linked between nucleobases using a branched self-immolative linker between nucleobases separated by several bases in oligonucleotides and sterically controlling its structure. Furthermore, we designed it to be activated in response to  $\beta$ -galactosidase by incorporating galactose at its terminus.  
 ○Narumi Habu,<sup>1</sup> Kento Miyaji,<sup>1</sup> Kohji Seio,<sup>1</sup>

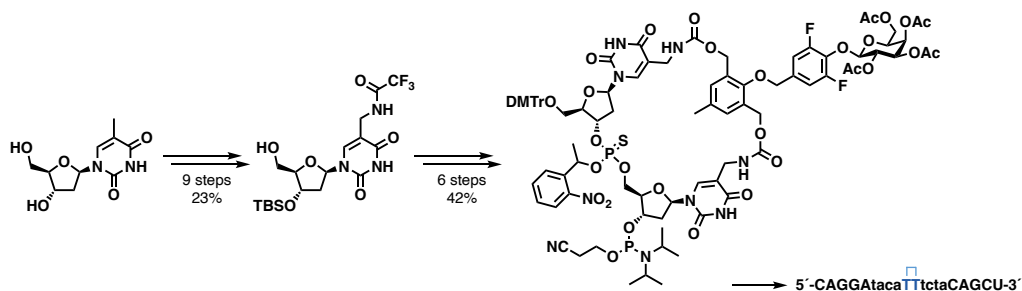
Prodrugs are utilized for selective delivery to target tissues and reducing adverse effects. In this study, we aimed to temporarily inhibit the formation of duplex with target RNA by introducing a branched self-immolative linker between nucleobases separated by several bases in oligonucleotides and sterically controlling its structure. Furthermore, we designed it to be activated in response to  $\beta$ -galactosidase by incorporating galactose at its terminus.

Toward the synthesis of cyclic oligonucleotides, we initially investigated the synthesis of thymidine dimer phosphoramidite with a branched self-immolative linker crosslinking adjacent thymine bases. Subsequently, the thymidine dimer was incorporated into oligonucleotides, and its properties were evaluated. Moreover, we explored a method for introducing the branched self-immolative linker after oligonucleotide synthesis. In this poster, we will present the details of these studies.

**Keywords :** *modified nucleoside, self-immolative linker, thymidine dimer,  $\beta$ -galactosidase, prodrug-type oligonucleotides*

プロドラッグは標的組織への選択的送達や副作用低減を目的として用いられる。本研究では、オリゴヌクレオチド鎖の数塩基離れた核酸塩基間をブランチ型自己犠牲リンカーで架橋し、その構造を立体的に制御することで、一時的に RNA との二重鎖形成を阻害することを目指した。また、このリンカーの末端にガラクトースを導入することで、 $\beta$ -galactosidase に応答して活性化される設計とした。

まず、環状オリゴヌクレオチドの合成を目指し、ブランチ型自己犠牲リンカーを介して隣接するチミン塩基間を架橋したチミジンダイマーホスホロアミダイト体の合成検討を行った。その後、チミジンダイマーをオリゴヌクレオチドに導入し、その性質を評価した。さらに、オリゴヌクレオチド合成後にブランチ型自己犠牲リンカーを導入する手法についても検討した。本発表では、これらの研究成果について詳細に報告する。



## リパーゼを用いた高エナンチオ選択的アセチル化による光学活性エポキシ化ジヒドロゼルンボールの合成と、ドッキングシミュレーションを用いた選択性の解明

(近畿大院農<sup>1</sup>・近畿大農<sup>2</sup>・長浜バイオ<sup>3</sup>・独立研究<sup>4</sup>・姫路獨協大<sup>5</sup>) ○高橋亮大<sup>1</sup>・寺田百合香<sup>1</sup>・川村彩夏<sup>1</sup>・平岩和沙<sup>1</sup>・山本智恵子<sup>1</sup>・辻本早希<sup>2</sup>・平本梨花子<sup>1</sup>・渡部朋子<sup>1</sup>・藤原智香子<sup>2</sup>・河合あかね<sup>2</sup>・柏崎玄伍<sup>1</sup>・河合靖<sup>3</sup>・中村薫<sup>4</sup>・山中理央<sup>5</sup>・山下光明<sup>1</sup>・北山隆<sup>1,2</sup>

Synthesis of optically active epoxidized dihydrozerumbols via lipase-catalyzed highly enantioselective acetylation and elucidation of selectivity through docking simulations (<sup>1</sup>Graduate School of Agriculture, Kindai University, <sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Kindai University, <sup>3</sup>Faculty of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, <sup>4</sup>Independent Researcher, <sup>5</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Himeji Dokkyo University) ○ Ryoto Takahashi,<sup>1</sup> Yurika Terada,<sup>1</sup> Ayaka Kawamura,<sup>1</sup> Kazusa Hiraiwa,<sup>1</sup> Chieko Yamamoto,<sup>1</sup> Saki Tsujimoto,<sup>2</sup> Rikako Hiramoto,<sup>1</sup> Tomoko Watanabe,<sup>1</sup> Chikako Fujiwara,<sup>2</sup> Akane Kawai,<sup>2</sup> Gengo Kashiwazaki,<sup>1</sup> Yasushi Kawai,<sup>3</sup> Kaoru Nakamura,<sup>4</sup> Rio Yamanaka,<sup>5</sup> Mitsuaki Yamasita,<sup>1,2</sup> Takashi Kitayama<sup>1,2</sup>

To develop drug discovery libraries, we utilized diversity-oriented synthesis (NMRDOS) to explore uncharted chemical space. Zerumbone, a highly reactive natural product from *Zingiber zerumbet*, served as the starting material. Reaction under Brønsted acid conditions elucidated detailed pathways leading to aromatic ring formation and enabled the efficient construction of novel scaffolds and natural product derivatives. Using dihydrozerumbol and its epoxide as substrates for lipase-catalyzed optical resolution, we achieved the total synthesis of Buddledone A and Alashanoid B2, determining the absolute configuration of Buddledone A. To elucidate the principles regulating stereoselectivity, we investigated a series of epoxides and identified a strong correlation between substrate configuration and stereoselectivity. This correlation was subsequently analyzed in detail using docking simulations, yielding valuable insights into the underlying molecular factors.

創薬ライブラリー構築を目指し、中程度の分子量をもつ反応多様な天然物を利用した多様性指向型合成 (DOS)<sup>1</sup> による未踏のケミカルスペースへのアクセスを試みた。これまでに、ハナショウガ由来の高反応性天然物ゼルンボンを出発物質とし、Brønsted酸下での処理による芳香環への収束反応経路を解明し、<sup>2</sup> さらにゼルンボン誘導体を基質とし、新規骨格や天然物類縁体を短ステップで構築した。<sup>3</sup> 本研究ではジヒドロゼルンボールとそのエポキシドを用いたリパーゼ触媒による高立体選択的な光学分割に成功し、Buddledone A や Alashanoid B2 の全合成と絶対配置の特定に成功した。立体選択性を制御する原理を解明するために、一連のエポキシドを調査し、基質構成と立体選択性の間に強い相関関係があることを見いだした。その後、この相関関係についてドッキングシミュレーションを用いて詳細に解析し、基礎となる因子に関する結果が得られた。

1. Schreiber, S. L. *Science* **2000**, 287, 1964–1969.
2. G. Kashiwazaki, *et al. Org. Biomol. Chem.* **2021**, 19, 10444–10454.
3. Y. Utaka, G. Kashiwazaki, and T. Kitayama, *et al. J. Org. Chem.*, **2020**, 85, 8371–8386.

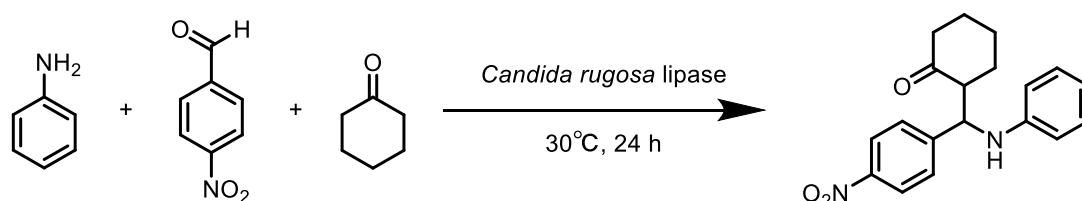
## Lipase-catalyzed Mannich Reaction in Deep Eutectic Solvent-Water Systems

(<sup>1</sup>Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University, <sup>2</sup>School of Science, Osaka Prefecture University) ○Taito Nagamoto,<sup>1</sup> Hiroki Onishi,<sup>2</sup> Hideo Kojima<sup>1,2</sup>

**Keywords:** Lipase; Deep Eutectic Solvent-Water Systems, Mannich Reaction

Recently, as alternatives to organic solvents, deep eutectic solvents (DESs) have been acknowledged as green solvents. DESs are eutectics prepared by mixing a hydrogen bond acceptor (HBA) and a hydrogen bond donor (HBD) and heating until a liquid is formed. Several recent examples of lipase-catalyzed organic reactions in DESs have been reported.<sup>1</sup> Previous research has shown that incorporating water into DESs has created aqueous deep eutectic solvents, offering a potential solution to reduce the viscosity of DESs<sup>2</sup> and improve the reaction rate in lipase-catalyzed Henry reaction.<sup>3</sup> This research investigated the lipase-catalyzed Mannich reaction in the choline chloride-based deep eutectic solvents/water system. In this presentation, we will provide details of the experiments.

A mixture containing aniline (0.11 mmol), *p*-nitrobenzaldehyde (0.1 mmol), cyclohexanone (1.9 mmol), and *Candida rugosa* lipase (CRL) (10 mg) was stirred at 30°C for 24 h (Scheme 1). The yields in the DES (HBA: choline chloride (ChCl); HBD: glycerol or ethylene glycol)/water were higher than in ethanol/water (Table 1).



**Scheme 1**

**Table 1**

Lipase	Solvent	Yield (%)
None	Ethanol/H <sub>2</sub> O (9:1)	30
CRL	Ethanol/H <sub>2</sub> O (9:1)	54
CRL	ChCl/urea/H <sub>2</sub> O (1:2:1)	42
CRL	ChCl/glycerol/H <sub>2</sub> O (1:2:1)	76
CRL	ChCl/ethylene glycol/H <sub>2</sub> O (1:2:1)	57

- 1) J.-N. Tan, Y. Dou, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2020**, *104*, 1481-1496.
- 2) A. S. D. Ferreira *et al.*, *J. Mol. Liq.*, **2021**, *342*, 117463.
- 3) X. Tian *et al.*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2016**, *26*, 80-88.

## 酸化的フォールディングを促進するシクロデキストリン接合型ジセレニド化合物の開発

(東海大理化<sup>1</sup>・東海大先進生命研<sup>2</sup>) ○岩田 悠希<sup>1</sup>・荒井 堅太<sup>1,2</sup>

Development of cyclodextrin-conjugated diselenide compounds as oxidative protein folding promoters (<sup>1</sup>*Department of Chemistry, School of Science, Tokai University*, <sup>2</sup>*Institute of Advanced Biosciences, Tokai University*) ○ Yuki Iwata<sup>1</sup>, Kenta Arai<sup>1,2</sup>

A nascent polypeptide chain needs to fold into the unique three-dimensional structure by accompanying cross-linking intramolecular disulfide (SS) bonds in the endoplasmic reticulum (ER), and thereby exhibits its physiological functions. This oxidative folding process is efficiently promoted by protein disulfide isomerase (PDI), an ER-resident oxidoreductase, which captures structurally immature proteins and introduce SS bonds into the client proteins. Dysfunction of PDI due to oxidative stress leads to protein misfolding and aggregation, eventually causing critical diseases, such as neurodegenerative disorders. Cyclodextrins (CDs) can capture hydrophobic molecules and thus are expected to function as a sensor that recognizes hydrophobic regions of immature proteins. We previously reported that water-soluble cyclic diselenides catalyze oxidative folding through a PDI-like catalytic mechanism.<sup>[1]</sup> In this study, we designed and synthesized a new CD-conjugated catalyst with a cyclic diselenide skeleton as the redox center. The synthesized compounds were applied to oxidative folding of endothelin 1 having two intramolecular SS bonds, and were found to promote not only SS formation but also isomerization of the mispaired SS bonds. Furthermore, the compounds were also found to have the ability to inhibit protein aggregation and to mimic the chaperone-like capability of PDI.

**Keywords :** *Catalyst, Oxidative folding, Selenium, Disulfide, Cyclodextrin*

新生ポリペプチド鎖は、小胞体内において分子内ジスルフィド (SS) 結合の形成と共に、固有の立体構造を構築することで生理機能を発揮する。この酸化的 folding は、小胞体内在酵素である protein disulfide isomerase (PDI) が構造未熟な蛋白質を捕捉し、SS 形成を触媒することで効果的に促進される。酸化ストレスによる PDI の機能低下は、蛋白質の misfolding ならびに凝集、ひいては神経変性疾患をはじめとする様々な疾患を引き起こす。cyclodextrin (CD) は、疎水性分子を包接することができ、構造未成熟な蛋白質が有する疎水性領域を認識するセンサーとして機能するものと期待される。我々は以前、水溶性環状ジセレニド化合物が、PDI と同様の反応機構によって蛋白質の酸化的 folding を触媒することを報告した<sup>[1]</sup>。本研究では、環状ジセレニド骨格を酸化還元中心とした新たな CD 接合型触媒のデザインと合成に取り組んだ。合成した化合物を分子内に 2 つの SS 結合を有する endothelin 1 の酸化的 folding に応用したところ、SS 形成反応だけでなく、掛け違えた SS 結合の異性化も良好に促進することが明らかになった。さらに、これらの化合物は、蛋白質凝集を抑制する能力も有しており、PDI のシャペロン様機能をも模倣することが明らかとなった。

[1] *Chem Asian J.* **2020**, *15*, 2646-2652.

## X線結晶構造解析に基づくヒスチジン脱炭酸酵素の触媒ループの役割

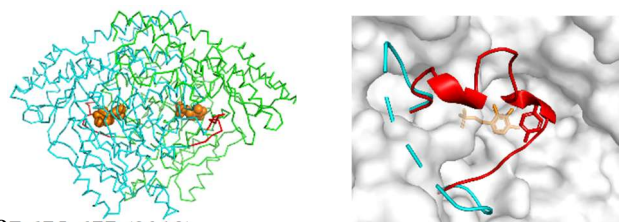
(香川大学<sup>1</sup>・お茶の水女子大学<sup>2</sup>) ○小森 博文<sup>1</sup>・新田 陽子<sup>2</sup>

Role of the catalytic loop of histidine decarboxylase based on X-ray crystal structure (<sup>1</sup>Faculty of Education, Kagawa University, <sup>2</sup>Faculty of Core Research Natural Science Division, Ochanomizu University) ○Hirofumi Komori,<sup>1</sup> Yoko Nitta<sup>2</sup>

We have determined the crystal structures of wild-type histidine decarboxylase, mutants, and inhibitor complexes using X-ray crystallography. Based on its crystal structure, we will discuss the molecular mechanism of histamine synthesis reaction. In particular, we will focus on the role of the catalytic loop region in the decarboxylation reaction, which has been shown to have different structures depending on the conditions, based on previous results.

**Keywords :** Decarboxylase; Histamine; Crystal structure; X-ray structure analysis

ヒスチジン脱炭酸酵素は、必須アミノ酸の一つであるヒスチジンからヒスタミンを生成する酵素であり、哺乳類におけるヒスタミン生成反応は主にこの酵素の働きによるものである。ヒスタミンは多様な生理作用を有し、花粉症や皮膚炎といったアレルギー性疾患において重要な役割を担う生理活性物質である。そのため、ヒスタミンの働きを抑制することを目的に、薬理的なアプローチによる研究が行われている。我々は、これまでにヒスタミン合成の分子機構を解明するために、ヒスチジン脱炭酸酵素と阻害剤ヒスチジンメチルエステル(HME)複合体の X 線結晶構造解析を行い、酵素との特異的な結合様式について明らかにしてきた。また、触媒ループ上の活性に重要な役割を持つと考えられるチロシンをフェニルアラニンに置換した点変異体 Y334F についても HME 複合体と同様の条件で異なる晶系の結晶が得られており、その結晶構造を決定している。さらに、点変異体 Y334F の結晶に、基質ヒスチジンをソーキングすることによって、PLP とヒスチジンの結合した状態（反応中間体）の構造を得ることに成功している。これは脱炭酸の起こる前の反応中間体構造と考えられる。これまでに明らかになった構造を比較すると、触媒ループ領域に大きな違いが見られる。これまでに X 線結晶解析に成功してきた結晶構造と他の脱炭酸酵素の構造を比較することにより、脱炭酸反応における触媒ループ上のチロシン残基の役割について議論する。



- (1) H. Komori *et al.*, *Acta Cryst.* **F287** 675-677 (2012).
- (2) H. Komori *et al.*, *J. Biol. Chem.* **287** 29175-29183 (2012).
- (3) Y.Nitta *et al.*, *Seikagaku*. **87** 321-325 (2015).
- (4) H.Komori & Y.Nitta, *J. Biol.Macromol.* **21**(2) 69-74 (2021).

## 細胞認識部位含有ペプチドによる金ナノロッドの修飾と細胞毒性評価・抗ガン剤の担持能評価

(龍谷大先端理工)○山岡湖ノ波<sup>1</sup>・今井崇人<sup>1</sup>・浅野昌弘<sup>2</sup>・富崎欣也<sup>1</sup>

Modification of gold nanorods with peptides containing cell recognition sites and evaluation of their cytotoxicity and anti-cancer drug carrying capacity (<sup>1</sup>*Department of Materials Chemistry, <sup>2</sup>Ecology and Enviromental Engineering Course, Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University*)○Conoha Yamaoka<sup>1</sup>, Takahito Imai<sup>1</sup>, Masahiro Asano<sup>2</sup>, Kin-ya Tomizaki<sup>1</sup>

Tumor-targeted combination therapies have received increasing attention in recent years. The combination of chemotherapy and photothermal therapy (PTT) is considered to be effective for cancer treatments. The RGDS peptide, which recognizes integrins  $\alpha 5 \beta 1$  overexpressed in cancer cells and induces cellular adhesion, is used to direct the gold nanorods to cancer cells. 11-Mercaptoundecyltetraethylene glycol (MUTEG) is also used to provide hydrophobic space to load anti-cancer drug doxorubicin (Dox) on the surface of gold nanorods. In this study, the cytotoxicity and Dox loading performance of AuNR complexes were examined.

First, gold nanorods were synthesized using the CTAB (hexadecyltrimethylammonium) method. The gold nanorods were surface-modified by adding polyethylene glycol methyl ether thiol and MUTEG, to the resulting gold nanorods and reacted in aqueous solution for 30 minutes. AuNR-PEG-11MUD-peptide (AuNR-P-U-p) was then synthesized by reaction with RGDS peptide in aqueous solution for 24 hours, and its Dox-loading ability was evaluated by fluorescence measurement.

*Keywords: Peptide; Gold nanorod; Doxorubicin*

近年、腫瘍を標的とする併用療法が注目されている。その中でも、化学療法と光熱療法(PTT)の併用は効果的であると考えられる。本研究では、金ナノロッドを薬物送達のキャリアーおよび PTT 材料として利用する。しかし、金ナノロッドには標的指向性、薬物担持能がない。ガン細胞に過剰発現しているインテグリンの  $\alpha 5 \beta 1$  を認識し細胞接着を誘発する RGDS ペプチド及び 11-メルカプトウンデシルテトラエチレングリコール(MUTEG) により金ナノロッドを修飾し、ペプチドと 11MUD の疎水環境に抗ガン剤ドキソルビシン(Dox)を担持させる。今回は AuNR 複合体の細胞毒性と Dox の担持性能を検証した。まず、CTAB(ヘキサデシルトリメチルアンモニウム)法を用いて金ナノロッドの合成を行った。得られた金ナノロッドにポリエチレングリコールメチルエーテルチオール、MUTEG を加え 30 分間水溶液中で反応させ表面修飾した。次いで、RGDS ペプチドと 24 時間水溶液中で反応させることにより AuNR-PEG-11MUD-peptide(AuNR-P-U-p)を合成し、その Dox 担持能は蛍光測定により評価した。

## 金属触媒によるコラーゲンモデルペプチドの選択的水酸化の検討

(関西大化学生命工<sup>1)</sup>) ○大藤 駿<sup>1</sup>・丸谷 晃弘<sup>1</sup>・大洞 康嗣<sup>1</sup>・平野 義明<sup>1</sup>

Metal-catalyzed selective hydroxylation of collagen model peptides. (*Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University*) ○Shun Oto,<sup>1</sup> Akihiro Marutani,<sup>1</sup> Yasushi Obora,<sup>1</sup> Yoshiaki Hirano<sup>1</sup>

Collagen is well known to be formed from a Pro-Hyp-Gly (POG) repeating structure. However, when chemically synthesizing collagen sequences, side chain protection of Hyp and synthesis cost are problems. Therefore, if the Pro residue can be selectively hydroxylated using an iron catalyst after the synthesis of (Pro-Pro-Gly)<sub>n</sub>, this will lead to improved synthetic efficiency. Rogness and co-worker reported that the 5-position of proline is selectively hydroxylated using Fe(S,S-PDP) shown in Fig. 1, 5-hydroxyproline (5-Hyp) in high selectivity and in high yield<sup>1)</sup>. However, it is difficult to hydroxylate 5-hydroxyproline unless the N-terminal protecting group is Ns (nosyl group), and there are no reports of reactions with peptides containing multiple proline moieties.

In this study, we investigated the N- and C-terminal protecting groups and hydroxylation of Boc-Pro-Pro-OPac containing multiple proline residues to obtain basic knowledge for the hydroxylation of Pro-Pro-Gly(PPG).

**Keywords :** Collagen, proline, hydroxylation, metal catalysis.

コラーゲンは Pro-Hyp-Gly(POG)の繰り返し構造から形成されていることが知られている。しかし、コラーゲン配列を化学合成する場合には、Hyp の側鎖保護やコストが問題となる。そこで(Pro-Pro-Gly)<sub>n</sub> の合成後に鉄触媒を用いて Pro 残基を選択的に水酸化できれば、合成効率の向上が期待できる。Rogness らは Fig.1 に示す Fe(S,S-PDP)を用いればプロリンの 5 位が選択的に水酸化され 5-ヒドロキシプロリン(5-Hyp)を高選択的かつ高収率で得られることを報告している<sup>1)</sup>。しかし、N 末端の保護基が Ns(ノシル基)でないと水酸化されにくく、加えてプロリンを複数含んだペプチドへの反応例は報告されていない。本研究では N・C 末端保護基の検討およびプロリン残基を複数含んだ Boc-Pro-Pro-OPac の水酸化を行い、Pro-Pro-Gly(PPG)水酸化のための基礎的知見を得ることを目的とした。

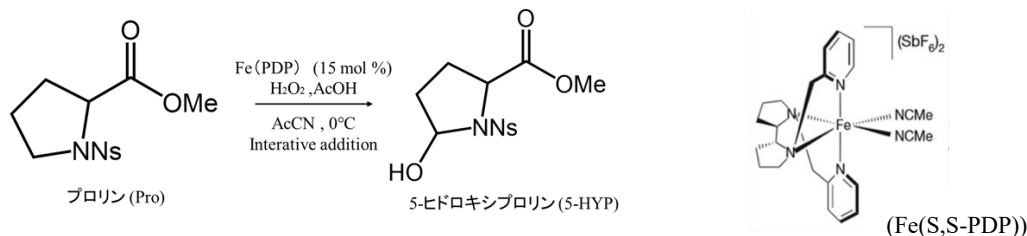


Fig. 1 Scheme of hydroxylation of Pro and structure of Fe(S,S-PDP).

1) D. C. Rogness et. al., *Nature*, **537**, 214-219 (2016).

## *In vitro* selection of VHH antibodies targeting DNA aptamers

(1 Graduate School of engineering, Saitama University, 2 Epsilon Molecular Engineering Inc.)

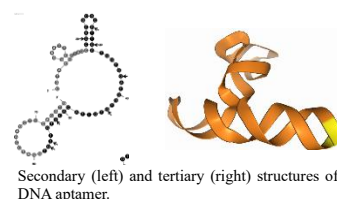
○ Shota Todoroki 1, Yuki Mochizuki 2, Naoto Nemoto 1,2

Keywords: VHH , DNA aptamer , cDNA display , In vitro selection , affinity measurement

DNA-protein interaction is one of the most important intermolecular systems in organisms, such as transcriptional regulation. However, DNA used in living organisms is basically a double helix structure, and there has been no search for proteins that interact with DNA aptamers, which have a unique tertiary structure consisting of single-stranded DNA. In this study, we will use an artificial library of VHH antibody, which is attracting attention as a next-generation antibody as a protein, to investigate the possibility of molecular recognition by the various surface geometries of its CDR3 portion in particular.

The aim of this study was to obtain VHH antibodies that bind specifically to DNA aptamers that capture the antibiotic oxytetracycline (OTC). Small molecules such as OTC are known to be difficult to produce conventional antibodies because of their small molecular size. On the other hand, many DNA aptamers have been obtained against small molecules.

The DNA aptamer used in this study was the one shown on the right, considering its dissociation constant with OTC ( $K_D = 9.61$  nM) and its selectivity (binding to OTC approximately 18.3-fold stronger than tetracycline and 36.6-fold stronger than doxycycline, which are also tetracycline groups).<sup>1)</sup>



Specifically, four rounds of *in vitro* selection with an artificial VHH antibody library targeting OTC-binding DNA aptamers were performed using the cDNA display method. The recovery of DNA encoding the VHH antibody eluted in the final round was measured as 1.31% by quantitative PCR. The same selection was also performed under the conditions of targeting only streptavidin beads and streptavidin beads - DNA aptamer as a negative selection. The respective DNA recovery rates were 0.002% and 0.05%. Based on these results, we believe that we have successfully selected VHH antibodies that bind specifically only to the OTC - DNA aptamer.

DNA sequencing by NGS was then used to identify the DNA sequence encoding VHH, which binds only to the OTC - DNA aptamer.

Amino acid sequence of the CDR region of VHH that binds to the target.

	CDR1	CDR2	CDR3
VHH 1	GSVSSINAMG	AISRSGGSTYYADSVKG	WRFHKWHWLRQHVDY
VHH 2	GFTFDDYAMS	TITSGGRNTYADSVKG-	KGEKHWWRWHDY
VHH 3	GRTFNDYAMG	AINWSGDTYYADSVKG	WHYYNVWSWQRY

In the future, we plan to use the DNA to express VHH that binds only to the OTC - DNA aptamer and measure affinity to the OTC - DNA aptamer.

### References

(1) Man Bock Gu et al. ssDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 (2008) 1254–1261

(龍大院理工<sup>1</sup>・龍大革新的材料・プロセス研究センター<sup>2</sup>・龍大農<sup>3</sup>) ○安 修央<sup>1</sup>・  
中村翔也<sup>1</sup>・藤本 翔也<sup>1</sup>・今井 崇人<sup>1</sup>・山崎 正幸<sup>2,3</sup>・富崎 欣也<sup>1,2</sup>

Synthesis of peptide-modified gold nanorods with intracellular delivery function and their application to photothermal therapy (<sup>1</sup>Department of Materials Chemistry, Ryukoku University, <sup>2</sup>Innovative Materials and Processing Research Center, Ryukoku University, <sup>3</sup>Department of Food Sciences and Human Nutrition, Ryukoku University) ○ Soo-Ang Ahn<sup>1</sup>, Shoya Nakamura<sup>1</sup>, Shoya Fujimoto<sup>1</sup>, Takahito Imai<sup>1</sup>, Masayuki Yamasaki<sup>2,3</sup>, Kin-ya Tomizaki<sup>1,2</sup>

Gold nanorods, known for their ability to absorb near-infrared light and generate heat, hold promise for application in cancer photothermal therapy.<sup>1)</sup> However, their use requires functionalization with intracellular delivery signals. Peptides containing hydrophobic and cationic residues are recognized for their intracellular delivery capabilities<sup>2)</sup>, yet their combination with gold nanorods for photothermal therapy remains largely unexplored. In this study, we synthesized gold nanorods modified with peptides (1) designed for intracellular delivery. We then evaluated the potential of these peptide-modified gold nanorods in photothermal therapy.

Validation experiments revealed that the peptide (1)-modified gold nanorods were successfully internalized by HeLa cells and induced cell death upon irradiation with near-infrared light.

**Keywords :** *Peptide, Gold nanorod, Photo thermal therapy, Cancer treatment*

金ナノロッドは、近赤外光を吸収して熱を発生する能力が知られており、がんの光熱療法への応用が期待されている。<sup>1)</sup> しかしながら、その使用には細胞内送達シグナルによる機能化が必要である。疎水性残基とカチオン性残基を含むペプチドは細胞内送達能力が認められているが<sup>2)</sup>、光熱療法のための金ナノロッドとの組み合わせは、ほとんど未解明である。本研究では、細胞内デリバリー用に設計されたペプチド(1)で修飾した金ナノロッドを合成した。そして、ペプチドで修飾された金ナノロッドの光熱療法における可能性を評価した。

検証実験の結果、ペプチド (1) で修飾された金ナノロッドは HeLa 細胞に内包され、近赤外光照射により細胞死を誘導することが明らかになった。

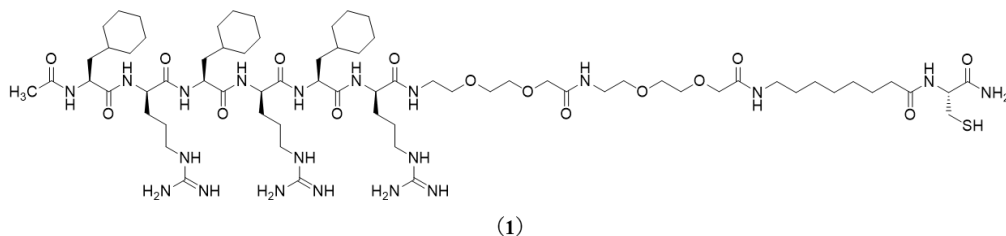


Fig. 1 Amino acid sequence of peptide (1)

- 1) Choi, W.I., Sahu, A., Kim, Y.H., Tae, G. (2012) *Ann. Biomed. Eng.*, **40**, 534-546.
- 2) Horton, K.L., Stewart, K.M., Fonseca, S.B., Guo, Q., Kelley, S.O. (2008) *Chem. Biol.*, **15**, 375-382.

## ポリスチレン系固相酸化還元触媒による酸化的フォールディングの促進

(東海大理<sup>1</sup>・東海大院総合理工<sup>2</sup>・東海大マイクロ・ナノ研<sup>3</sup>・東海大先進生命研<sup>4</sup>)  
○青山ゆうり<sup>1</sup>、西沢優也<sup>1</sup>、横瀬颯人<sup>2,3</sup>、岡村陽介<sup>2,3</sup>、荒井堅太<sup>1,4</sup>

Polystyrene-based solid-phase redox catalysts promoting oxidative protein folding (<sup>1</sup>*School of Science, Tokai University*, <sup>2</sup>*Graduate School of Science and Technology, Tokai University*, <sup>3</sup>*Micro/Nano Technology Center, Tokai University*, <sup>4</sup>*Institute of Advanced Biosciences, Tokai University*) ○Yuri Aoyama,<sup>1</sup> Yuya Nishizawa,<sup>1</sup> Hayato Yokose,<sup>2,3</sup> Yosuke Okamura,<sup>2,3</sup> Kenta Arai<sup>1,4</sup>

Protein disulfide isomerase (PDI), an ER-resident oxidoreductase, catalyzes the formation of disulfide (SS) bonds between cysteine residues in substrate proteins, thereby promoting protein folding. While the industrial application of PDI is expected to dramatically increase the production rate of protein-based formulations and artificial proteins, it is costly and separation of PDI from the substrate proteins is often difficult. We previously reported that water-soluble cyclic diselenides catalyze oxidative folding through a PDI-like catalytic mechanism.<sup>[1]</sup> To facilitate the isolation and reuse of the catalyst, we supported the PDI-like cyclic diselenide on a polystyrene-based resin. The prepared solid-phase catalyst was applied to oxidative folding of endothelin 1 having two intramolecular SS bonds, and was found to promote not only SS formation but also isomerization of the mispaired SS bonds. Interestingly, the capability of the heterogeneous catalyst was higher than that of the homogeneous catalyst, i.e., the water-soluble cyclic diselenide. This may imply that hydrophobic interactions between polystyrene and denatured proteins enhance the oxidative folding kinetics at the solid surface.

**Keywords :** *Selenium, Folding, Chaperone, Hydrophobic interaction, Disulfide*

小胞体内在性の酸化還元酵素である protein disulfide isomerase (PDI)は、基質蛋白質のシステイン残基間のジスルフィド (SS) 結合の形成を触媒することで、蛋白質のフォールディングを促進する。PDI の工業的応用は、蛋白質製剤や人工蛋白質の生産速度を飛躍的に向上させるものと期待される一方で、コストがかかるうえに、PDI の基質蛋白質からの分離はしばしば困難である。我々は以前、水溶性環状ジセレンド化合物が、PDI と同様の反応機構によって蛋白質の酸化的 folding を触媒することを報告した<sup>[1]</sup>。本研究では、触媒の単離と再利用を容易にするため、PDI 様環状ジセレンドをポリスチレン系樹脂上に担持させた。調整した固相担持触媒を分子内に 2 つの SS 結合を有するエンドセリン 1 の酸化的 folding に応用したところ、SS 形成反応だけでなく、掛け違えた SS 結合の異性化も良好に促進することが明らかになった。興味深いことに、この不均一系触媒の能力は、均一系触媒、すなわち水溶性環状ジセレンド触媒のそれよりも高かった。ポリスチレンと変性蛋白質間における疎水性相互作用が、固体表面における酸化的 folding 速度論を強化しているものと考えられる。

[1] *Chem Asian J.* **2020**, *15*, 2646-2652.

## ヒトコラーゲンプロリル 4-ヒドロキシラーゼの触媒ドメインの立体構造変化に関する分子動力学的研究

(兵庫医大医) ○福島 和明・江寄 啓祥

Molecular Dynamics Study on Conformational Change of Human Collagen Prolyl 4-Hydroxylase. (*Faculty of Medicine, Hyogo Medical University*) ○Kazuaki Fukushima, Hiroyoshi Esaki

Collagen is one of the major proteins in the human body and is a chain protein with a repeating structure containing glycine and proline. In collagen, proline residues are hydroxylated to form a stable triple helical structure. Human collagen prolyl 4-hydroxylase (C-P4H) is an enzyme that catalyzes hydroxylation of proline residues in collagen synthesis in the human body. The catalytic domain of human C-P4H is difficult to adopt a constant conformation due to the large proportion of flexible loops. Therefore, X-ray analysis of the catalytic domain of C-P4H has only been reported for a low-activity isoform II.

In this study, we investigated the structural differences in the catalytic domain of the highly active isoform I of human C-P4H with and without collagen peptide substrate by molecular dynamics calculations. The input structure used in the calculations was generated based on the X-ray structure of algal C-P4H, which has a high sequence similarity, and three 500-ns simulations were performed using Gromacs. The calculation results show that in the presence of substrate, the hairpin loop and  $\beta$ II- $\beta$ III loop encapsulate the substrate and anchor it near the catalytic center, whereas in the absence of substrate, the hairpin loop fluctuates significantly, and adopts different conformations. We also report the results compared to simulations based on the structure of human C-P4H predicted by AlphaFold2.

**Keywords :** *Prolyl 4-Hydroxylase; Collagen Synthesis; Molecular Dynamics; Catalytic Domain; Conformational Change*

コラーゲンは人体を構成する主要なタンパク質の一つであり、グリシンとプロリンを含む繰り返し構造をもつ鎖状タンパク質である。コラーゲンではプロリン残基が水酸化されて安定な三重らせん構造を形成している。ヒトコラーゲンプロリル 4-ヒドロキシラーゼ (C-P4H) は、人体におけるコラーゲン合成でプロリン残基の水酸化を触媒する酵素である。ヒト C-P4H の触媒ドメインは、柔軟性の高いループが大きな割合を占めるために一定の立体構造をとりにくい。そのため C-P4H 触媒ドメインの立体構造については、低活性なアイソフォーム II の X 線解析が 1 件報告されているのみである。

本研究では、コラーゲンペプチド基質の有無によるヒト C-P4H の高活性なアイソフォーム I の触媒ドメインの立体構造の違いを分子動力学計算により調べた。計算に用いた入力構造は、配列の類似性が高い藻類 C-P4H の X 線構造を元に作成し、Gromacs を用いて 500 ns のシミュレーションを 3 回行った。計算結果から、基質が存在する場合にはヘアピンループと  $\beta$ II- $\beta$ III ループが基質を包み込み触媒中心付近に固定するが、基質が存在しない場合にはヘアピンループは大きく揺らぎ、多様なコンフォメーションをとることが分かった。AlphaFold2 で予測されたヒト C-P4H の構造をもとにしたシミュレーションと比較した結果も併せて報告する。

*N*-メチルアミノ酸を含むペプチドと核移行シグナルペプチドを鋳型に用いた  
金ナノリボンの合成と光熱変換特性評価  
(龍谷大学先端理工学部<sup>1</sup>)○渡邊琉気<sup>1</sup>, 安修央<sup>1</sup>, 今井崇人<sup>1</sup>, 富崎欣也<sup>1</sup>

Synthesis of gold nanoribbons using *N*-methylamino acid-containing peptides and peptides with a nuclear localization signal as templates and evaluation of their photothermal conversion properties

(Ryukoku University, Department of Materials Chemistry<sup>1</sup>)

○Ryuki Watanabe<sup>1</sup>, Soo-Ang Ahn<sup>1</sup>, Takahito Imai<sup>1</sup>, Kin-ya Tomizaki<sup>1</sup>

The use of gold nanoparticles is promised to be a new treatment method in medical field because of their unique photothermal effect that involves absorption of near-infrared light and conversion of it into heat. Ribbon-shaped gold nanoparticles have been successfully synthesized inside peptide assemblies and delivered them to cells. In this study, peptides containing *N*-methylamino acid and peptides with a nuclear localization signal were used as templates to synthesize gold nanoribbons, control their size, and examine the photothermal properties.

The UV-vis spectra showed that the absorption in visible region (400-800 nm) decreased as the concentration of [MeAla<sup>5</sup>]-Cap-p increased. Morphological observation using transmission electron microscopy (TEM) to measure the length of gold nanoribbons showed that increasing the concentration of [MeAla<sup>5</sup>]-Cap-p resulted in shorter lengths of gold nanoribbons. Furthermore, irradiation of gold nanoribbons with an 808 nm laser at 5 W/cm<sup>2</sup> showed a higher temperature elevation for gold nanoribbons without [MeAla<sup>5</sup>]-Cap-p than for those with it.

**Keywords :** Peptide; Gold nanoparticles

金ナノ結晶は近赤外光を吸収し熱へ変換する特有のフォトサーマル効果の性質をもつことから、医療分野における新たな治療法として期待されている。本研究では、ペプチド集合体内部でリボン状の金ナノ結晶の合成と細胞への送達に成功している。本研究では、Cap-p、*N*-メチルアミノ酸を含むペプチド ([MeAla<sup>5</sup>]-Cap-p) 及び核移行シグナルを有するペプチド (NLS-p) の混合物を鋳型として用いて金ナノリボンを合成し(Fig. 1)、ペプチドの混合比と金ナノリボンのサイズ変化の関係、及びフォトサーマル効果との関係を調べた。

UV-vis スペクトルの結果から、[MeAla<sup>5</sup>]-Cap-p の濃度を上昇させると、可視領域 (400-800 nm) における吸光度が小さくなった。透過型電子顕微鏡 (TEM) による形態観察を行い金ナノリボンの長さを計測したところ、[MeAla<sup>5</sup>]-Cap-p の濃度を上昇させると長さの短い金ナノリボンが生成した。さらに、金ナノリボンに 5 W/cm<sup>2</sup>で 808 nm レーザーを照射すると、[MeAla<sup>5</sup>]-Cap-p を含有している金ナノリボンよりも、含有していない金ナノリボンの方が高い温度上昇を示した。

(a) Cap-p; Ac-AIAKA2NafKIA-NH<sub>2</sub>

(b) NLS-p; Ac-PKKKRKVGGGAIKA2NafKIA-NH<sub>2</sub>

(c) [MeAla<sup>5</sup>]-Cap-p; Ac-AIAK-MeAla-2NafKIA-NH<sub>2</sub>

Fig. 1 Peptide sequence (2Naf = L-2-naphthylalanine)

## ミトコンドリア移行シグナルペプチド誘導体を用いた がん特異的作用性ペプチドの合成と特性評価

○齋田颯心<sup>1</sup>・山崎正幸<sup>2</sup>・富崎欣也<sup>1</sup>

(龍谷大学先端理工学部)

○Soshin Saita, Masayuki Yamasaki, Kin-ya Tomizaki

(<sup>1</sup>Ryukoku University Department of Materials Chemistry, <sup>2</sup>Ryukoku University Department of Food Sciences and Human Nutrition)

Mitochondria are cell organelles involved in ATP production and apoptosis. It is possible to intentionally induce apoptosis in cancer cells by attacking mitochondria of cancer cells to release cytochrome c. In a previous study, cytotoxicity evaluation using MTS-pA, in which a mitochondrial transfer signal (MTS) sequence was attached to the N-terminus of a self-assembling peptide, showed that MTS-pA was predominantly toxic to cancer cells.

Since MTS has two helix sites, in order to determine which helix contributes to cytotoxicity, we designed a peptide lacking the C-terminal helix of the MTS part, 6 amino acid residue, as MTS  $\Delta$  C-pA, and a peptide lacking the N-terminal helix, 11 amino acid residue, as MTS  $\Delta$  N-pA.

The CD spectra of MTS  $\Delta$  C-pA and MTS  $\Delta$  N-pA both showed that MTS  $\Delta$  C-pA formed a random coil structure in PBS, while MTS  $\Delta$  N-pA showed the same tendency as MTS  $\Delta$  C-pA in TFE and SDS-containing PBS. Cytotoxicity assay using CCK-8 showed that both peptides were as toxic as MTS-pA to HeLa cells (cancer cells), MTS  $\Delta$  C-pA was less toxic than MTS-pA to COS-7 cells (normal cells), while MTS  $\Delta$  N-pA showed less viability than MTS-pA and MTS  $\Delta$  C-pA showed higher toxicity compared to MTS  $\Delta$  N-pA in HeLa cell.

Keyword : mitochondria, peptide

ミトコンドリアは ATP の合成やアポトーシスに関与する細胞小器官である。

当研究室ではミトコンドリア移行シグナル(MTS)ペプチド誘導体の設計、合成、特性評価、細胞毒性に着目している。

本研究では、自己集合化ペプチド(Cap-pA)の N 末端に MTS 配列の C 末端ヘリックス欠損及び N 末端ヘリックス欠損配列を結合させた 2 種のミトコンドリア移行シグナルペプチド誘導体(MTS  $\Delta$  C-pA, MTS  $\Delta$  N-pA)を合成し、分光学的測定によってそれらの二次構造および細胞毒性を調べた。CD スペクトル測定の結果 MTS  $\Delta$  C-pA と MTS  $\Delta$  N-pA はともに PBS 中ではランダムコイル構造を形成し、TFE や SDS 含有 PBS 中では MTS-pA と同程度の  $\alpha$ -ヘリックス性を形成していることがわかった。

## 光増感剤と組換え大腸菌細胞との複合触媒系による光水素生産

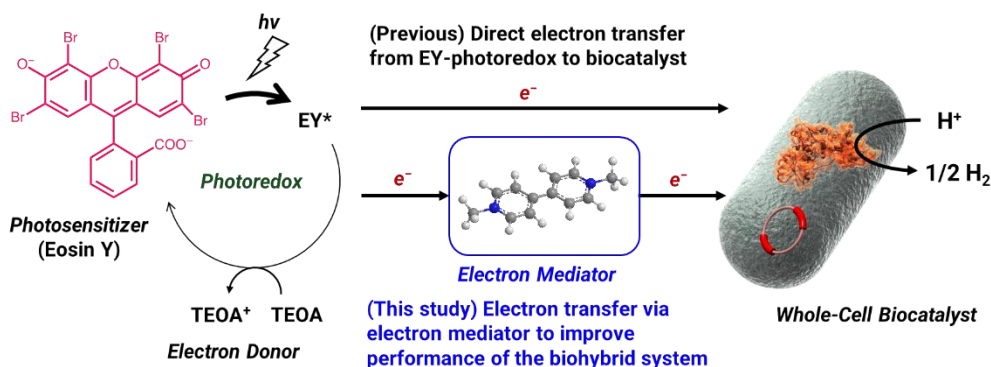
(奈良女大理) ○本田 裕樹・丸山 季穂・鈴木 彩純・藤井 浩

Light-Driven Hydrogen Production by a Combination of a Photosensitizer and a Recombinant *Escherichia coli* Whole Cell (*Faculty of Science, Nara Women's University*) ○Yuki Honda, Kiho Maruyama, Asumi Suzuki, Hiroshi Fujii

A biohybrid system combining an electron donor, triethanolamine; a photosensitizer, eosin Y; and a whole cell biocatalyst of *Escherichia coli* expressing [FeFe]-hydrogenase gene was constructed for development of a clean hydrogen production system<sup>1)</sup>. The apparent quantum yield of hydrogen production in the biohybrid system under visible light irradiation exceeded 20%, which is useful for the future development of biocatalytic hydrogen production systems. In this presentation, we analyzed the electron transfer pathway from the photoredox of EY to the enzyme in the biohybrid system and the control of the redox potential of the electron mediators to achieve both high hydrogen production rate and durability, aiming to expanding knowledge for design of the biohybrid system for solar energy conversion.

**Keywords :** Hydrogen Production; Hydrogenase; Photosensitizer; Eosin Y; Whole-Cell Reaction

太陽光を活用するクリーンな水素生産系の獲得を目指して、高効率な光—化学エネルギー変換が可能な非生体材料と、温和な条件下で貴金属なしで高効率化かつ高選択的な物質変換が可能な生体触媒の両者の特長を組み合わせた複合触媒系の検討を進めている。これまで、電子供与体トリエタノールアミン (TEOA)、光レドックス触媒エオシン Y (EY)、水素生成酵素を大量合成する組換え大腸菌 (Hyd+) を組み合わせた複合触媒系を構築した<sup>1)</sup>。この複合触媒系での水素生産の可視光照射下の見かけの量子収率は 20% を超え、生体触媒を用いる水素生産系の発展に向けて有用である。本研究では、本系の EY の光レドックスから酵素への電子伝達経路の解析とメディエーター電位の制御による高機能化に取り組み、今後の複合触媒系の設計指針の獲得を目指した。



- 1) Y. Honda, Y. Shinohara, H. Fujii, *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10*, 6006–6012.

## グリセロール-3-リン酸を標的とした蛍光バイオセンサーの開発

(東大院理<sup>1</sup>) ○松村 悠聖<sup>1</sup>・Fu Chai<sup>1</sup>・寺井 琢也<sup>1</sup>・Robert E. Campbell<sup>1</sup>

Development of a fluorescent biosensor for glycerol-3-phosphate (<sup>1</sup>*Graduate School of Science, The University of Tokyo*) ○Yuse Matsumura<sup>1</sup>, Fu Chai<sup>1</sup>, Takuya Terai<sup>1</sup>, Robert E. Campbell<sup>1</sup>

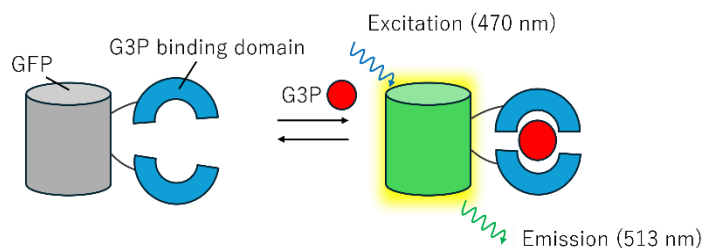
Glycerol-3-phosphate (G3P) is a key metabolite in cells that is involved in various metabolic pathways such as glycolysis, lipid biosynthesis, and the G3P shuttle.<sup>1</sup> G3P plays a central role in energy production in both the cytoplasm and mitochondria. Recent studies indicate that the G3P shuttle serves to alleviate electron transport chain dysfunction,<sup>2</sup> although many aspects of its role remain unclear.

In this study, we aim to develop a genetically encoded fluorescent biosensor for G3P to facilitate further investigation of its roles through cellular imaging. A prototype biosensor was created by fusing green fluorescent protein (GFP) with the G3P-binding protein UgpB.<sup>3</sup> Through the process of directed evolution, we have enhanced the sensor's fluorescence intensity and selectivity for G3P. The latest progress will be presented at the conference.

**Keywords:** *Fluorescent Biosensor, Glycerol-3-phosphate, Metabolites*

細胞内低分子代謝物の1つであるグリセロール-3-リン酸(G3P)は、解糖系や脂質合成、G3P シャトル<sup>1</sup>といった様々な代謝経路に関係しており、細胞質とミトコンドリアのエネルギー生成において中枢を担っている。最近の研究では、G3P シャトルが電子伝達系の機能不全を緩和する機能を持つことも報告されているが<sup>2</sup>、その生物学的役割は未だ明らかになっていない部分も多い。

そこで本研究では、G3P の細胞イメージングを可能とするため、G3P に結合することで蛍光強度が変化する、遺伝的にコードされた蛍光バイオセンサーの開発を進めている。これまでに、緑色蛍光タンパク質(GFP)と G3P 結合タンパク質 UgpB<sup>3</sup>を組み合わせたバイオセンサーの原型を生み出すことに成功しており、その後はタンパク質にランダム変異を導入することで、蛍光強度と、G3P に対する選択性を向上させた。会場では、本研究の最新の成果について報告する。



**Figure.** Schematic illustration of the sensor

- 1) Larson, C. *et al. Yeast* **1998**, *14*, 347–357.
- 2) Liu, S. *et al. Cell Metab.* **2021**, *33*, 1974–1987.
- 3) Wuttge, S. *et al. Mol. Microbiol.* **2012**, *86*, 908–920.

## 無機半導体光アノードと組換え大腸菌全細胞を用いたバイオカソードによる光電気化学的水素生産

(奈良女大院理) 本田 裕樹・○濱川 怜那・結城 里沙・藤井 浩

Photo-Electro-Biochemical Hydrogen Production from Water with Semiconductor Photocatalyst and Whole-Cell Biocatalyst of Recombinant *Escherichia coli* (Faculty of Science, Nara Women's University) Yuki Honda, ○Reina Hamakawa, Risa Yuki, Hiroshi Fujii

A new photoelectrochemical system was constructed for clean hydrogen production by solar water splitting, combining an inorganic photocatalyst-based photoanode with a biocathode system<sup>1)</sup>. The biocathode system consists of a carbon paper electrode (CP), an electron mediator (MV<sup>2+</sup>), and the whole cell of recombinant *Escherichia coli* expressing [FeFe]-hydrogenase genes (Hyd<sup>+</sup>). Carbon materials are not suitable for hydrogen-forming cathode due to their high overpotential for proton reduction; however, the combination of the reduction of an organic electron mediator on the CP electrode and the hydrogen formation with the reduced mediator by the hydrogenase provides a hydrogen-forming cathodic reaction comparable to that of the noble metal electrode. This study demonstrates that Hyd<sup>+</sup> can be employed as a part of the hydrogen-forming biocathode system and that the biocathode system wired with TiO<sub>2</sub> photoanode can be a photoelectrochemical water splitting system without external voltage assistance under natural pH.

**Keywords :** Hydrogen Production; Hydrogenase; Photocatalyst; Water Splitting; Whole-Cell Reaction

太陽光での水の分解によるクリーンな水素生産に向けて、酸化チタン光アノードとバイオカソードを組み合わせた光電気化学的水素生産系を構築した<sup>1)</sup>。ここでのバイオカソードはカーボン紙 (CP)、電子伝達剤 (MV)、[FeFe]-ヒドロゲナーゼを大量生産する組換え大腸菌細胞 (Hyd<sup>+</sup>) で構成される。炭素材料は水素生成の過電圧が大きく通常は水素生成カソードには適さないが、CP 上での有機小分子である MV 還元と、還元された MV と酵素による水素生成を組み合わせることで貴金属電極に匹敵する水素生成カソードが得られる。得られたバイオカソードと酸化チタン光アノードを組み合わせ、犠牲剤の添加や外部電圧の補助なしで光電気化学的な水素生産が確認された。

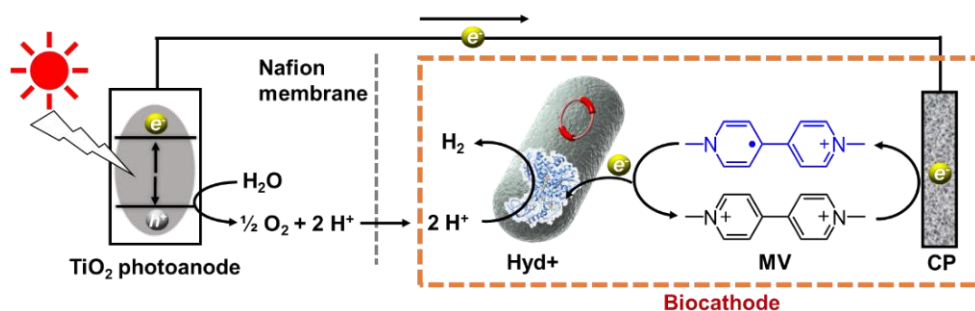


Fig. 1 Hydrogen production by a photo-electro-biochemical system combining TiO<sub>2</sub> photoanode with biocathode.

1) Y. Honda, R. Yuki, R. Hamakawa, H. Fujii, *ChemSusChem* **2024**, 17, e202300958.

## カロテノイド生合成の多様化を指向したヘム依存性酵素によるカルベン転移反応の検討

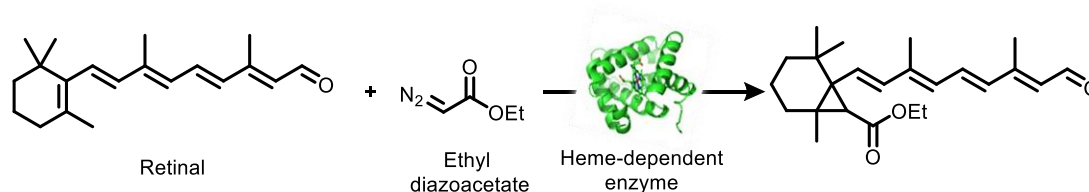
(阪大院工<sup>1</sup>・産総研<sup>2</sup>) ○村上 司<sup>1</sup>・加藤 俊介<sup>1</sup>・古林 真衣子<sup>2</sup>・林 高史<sup>1</sup>

Investigation of Hemoprotein-catalyzed Carbene Transfer Reactions for the Diversification of Carotenoid Biosynthesis (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University, <sup>2</sup>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) ○Tsukasa Murakami,<sup>1</sup> Shunsuke Kato,<sup>1</sup> Maiko Furubayashi,<sup>2</sup> Takashi Hayashi<sup>2</sup>

With recent advance in biotechnology, biomanufacturing using microbial biosynthetic pathways has attracted increasing attention in the production of chemical feedstocks. However, the products of biomanufacturing are still limited to a series of metabolites obtained from natural biosynthetic pathways. To address this issue, we here set out to integrate non-natural chemical transformations into existing biosynthetic pathways to expand natural biosynthetic pathways. In particular, non-natural carbene transfer reactions utilizing heme-dependent enzymes were investigated in this study to diversify biosynthetic pathways for the production of carotenoids. Consequently, bacterial globins from *S. novella* were found to catalyze the derivatization of retinal, an apocarotenoid derived from  $\beta$ -carotene, via the targeted carbene transfer reaction.

**Keywords :** Biocatalysis; Carotenoid; Biosynthesis; Hemoprotein; Carbene transfer reaction

昨今の著しい生物学技術の進歩に伴い、微生物の持つ生合成経路を活用した有用化合物の生産に注目が集まっている<sup>1)</sup>。しかしながら、自然界に存在する経路によって得られる代謝化合物は限定的であるため、生合成経路のさらなる拡張が強く望まれている。上記課題を解決するため、自然界にはない酵素反応を既存の生合成経路と統合すれば、より幅広い有用化合物群の提供が可能であると予想される。そこで本研究では、微生物によって生合成されるカロテノイドを、非天然酵素反応により多様化することをめざし、ヘム依存性酵素によるカルベン転移反応の検討を行った。種々のカロテノイドおよびヘム依存性酵素に対してスクリーニングを施した結果、*S. novella* 由来グロビンが、アポカロテノイドであるレチナールに対するカルベン転移反応を触媒することが明らかとなった（下図参照）。



1) A. Cravens, C. D. Smolke, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2142.

## 出芽酵母に対する低重合度ポリ(ε-L-リシン)の抗真菌作用機構の解析

(滋賀県大工<sup>1</sup>・京大院農<sup>2</sup>) ○竹原 宗範<sup>1</sup>・谷村 雨音<sup>1</sup>・田中 航輝<sup>1</sup>・新本 晶<sup>1</sup>・井上 善晴<sup>2</sup>

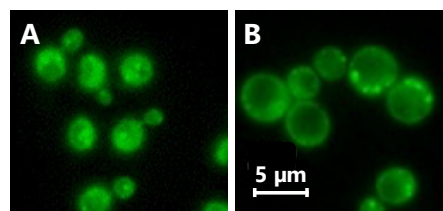
Investigation on Mechanism of Antifungal Activity of Short Chain Length Poly(ε-L-lysine) against *Saccharomyces cerevisiae* (<sup>1</sup>*School of Engineering, The University of Shiga Prefecture*, <sup>2</sup>*Graduate School of Agriculture, Kyoto University*) ○ Munenori Takehara,<sup>1</sup> Amane Tanimura,<sup>1</sup> Koki Tanaka,<sup>1</sup> Akira Aramoto,<sup>1</sup> Yoshiharu Inoue<sup>2</sup>

Poly(ε-L-lysine) (ε-PL), produced by some strains of *Streptomyces* spp., is a cationic polypeptide with a broad antimicrobial spectrum. ε-PL with short chain length (S-ε-PL) shows higher antifungal activity against *Saccharomyces cerevisiae* compared to medium chain length ε-PL (M-ε-PL). In this study, we investigated the mechanism of the antifungal activity of S-ε-PL. Circular dichroism analysis suggested that S-ε-PL, like M-ε-PL, could form a β-sheet type secondary structure. S-ε-PL showed higher antifungal activity in SD medium and M-ε-PL in phosphate buffer. Both ε-PLs exhibited antifungal activity without plasma membrane disruption of the yeast cells. S-ε-PL was shown to have relatively higher cell membrane permeability. Mutant strains deleted in different elements of the cell wall integrity pathway were more resistant to S-ε-PL.

**Keywords:** Poly(ε-L-lysine); Cationic Polypeptide; Antimicrobial Activity; Circular Dichroism; Cell Wall Integrity Pathway

*Streptomyces* 属放線菌が生産するポリ(ε-L-リシン) (ε-PL) は、幅広い抗菌スペクトルを示すカチオン性ポリペプチドである。低重合度 ε-PL (S-ε-PL,  $n = 5-20$ ) は、中重合度体 (M-ε-PL,  $n = 22-36$ ) と比較して、*Saccharomyces cerevisiae* に対して高い抗菌性を示す<sup>1)</sup>。本研究では、S-ε-PL の *Sc. cerevisiae* に対する抗真菌作用機構を解析した。

円二色性スペクトル解析より、いずれの ε-PL も主に β-シート構造からなり (50–65%)、S-ε-PL では β-ターンの占める割合が高くなった (>10%)。SD 培地中では S-ε-PL が、リン酸緩衝液中では M-ε-PL がより高い抗菌性を示した。蛍光色素を用いた観察より、いずれの ε-PL も細胞膜への細孔形成や膜破壊を引起こさないことがわかった。S-ε-PL は細胞膜の透過性がより高いことが示された (Fig. 1)。*Sc. cerevisiae* における細胞壁の完全性の維持に関わる (CWI) 経路を構成する遺伝子の欠損株 (*mpk1Δ*, *rlm1Δ*, *chs3Δ*, *cnc1Δ*, *swi6Δ*) のほうが、S-ε-PL に対してより耐性を示した。



**Fig. 1.** *Sc. cerevisiae* cells exposed to dansyl-labeled S-ε-PL in (A) SD medium and (B) phosphate buffer.

1) High-yield production of short chain length poly(ε-L-lysine) consisting of 5–20 residues by *Streptomyces aureofaciens*, and its antimicrobial activity. M. Takehara, A. Hibino, M. Saimura, H. Hirohara, *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 1299.

## 光応答性高分子による自己集合性ペプチドナノファイバーのバンドル化制御

(東農工大院工<sup>1</sup>・KISTEC<sup>2</sup>) ○秋元 翔太<sup>1</sup>、内田 紀之<sup>1</sup>、村岡 貴博<sup>1,2</sup>

Bundling of self-assembling peptide nanofibers with photoresponsive polymers (<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology, <sup>2</sup>Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology) ○ Shota Akimoto<sup>1</sup>, Noriyuki Uchida<sup>1</sup>, Takahiro Muraoka<sup>1,2</sup>

Fibrous proteins such as collagen achieve tissue-specific mechanical properties by appropriately controlling bundle formation in low-fluidic biological tissues, but it is still difficult to artificially mimic such materials. Recently, we have found that amphiphilic peptides with a jigsaw-shaped hydrophobic part (JigSAP) self-assemble into rigid nanofibers in aqueous solution to form hydrogels<sup>1)</sup>. Upon addition of a highly concentrated azobenzene-containing water-soluble polymer, we found that the JigSAP nanofibers formed bundle. Interestingly, the JigSAP bundles can be reversibly dispersed into nanofibers even in the low fluidic solution. The bundling of JigSAP nanofibers is expected to change various physical properties, such as surface area, and we report on the application of novel stimulus-responsive materials based on meso-scale structural changes.

**Keywords :** Self-assembling Peptide, Photoresponsiveness, Supramolecular fiber, Polyethylene glycol, Azobenzene

コラーゲンなどの繊維状タンパク質は流動性の低い生体組織中で適切にバンドル化を制御することで、組織に応じた力学的特性を実現しているが、このような材料を人工的に模倣するのは未だに困難である。最近我々は、ジグザグの疎水部構造を有する両親媒性ペプチド (JigSAP) が水溶液中で剛直なナノファイバーへと自己集合し、ヒドロゲルを形成することを見出している<sup>1)</sup>。この JigSAP ナノファイバーをアゾベンゼンが導入された高濃度水溶性高分子溶液に添加したところ、JigSAP ナノファイバーがバンドル化することを見出した。また、JigSAP バンドルは分散液の流動性が低いにも関わらず、可視光照射によってナノファイバーへと分散させることができる。JigSAP ナノファイバーのバンドル化によって、表面積など様々な物理的な物性に変化すると期待され、メゾスケールの構造変化を利用した新規の刺激応答性材料の応用について報告する。

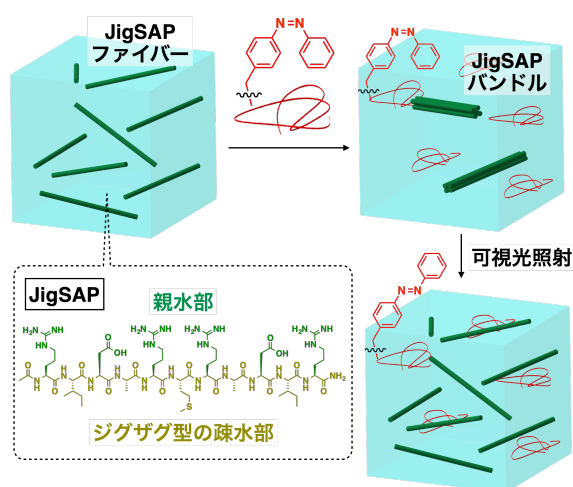


図1 JigSAP ファイバーの可逆的なバンドル化の概略図

1) A. Yaguchi *et al.* *Nat. Commun.* **2021**, 12, 6623.

## 統計解析と分子記述子を用いたペプチド配列とナノポアの会合数との相関の解明

(甲南大<sup>1</sup>・東京農工大<sup>2</sup>・横浜国立大<sup>3</sup>)○小林 もえ<sup>1</sup>・栢森 史浩<sup>1</sup>・寺尾 泰晟<sup>1</sup>・彭 祖癸<sup>2</sup>・川村 出<sup>3</sup>・川野 竜司<sup>2</sup>・臼井 健二<sup>1</sup>

Elucidation of a correlation between peptide sequences and the association numbers of peptide nanopore using statistical analysis and molecular descriptors (<sup>1</sup>*Fuculty of Frontiers of Innovative Research and Technology (FIRST), Konan University*, <sup>2</sup>*Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology*, <sup>3</sup>*Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University*) ○Moe Kobayashi<sup>1</sup>, Fumihito Kayamori<sup>1</sup>, Taisei Terao<sup>1</sup>, Peng Zugui<sup>2</sup>, Izuru Kawamura<sup>3</sup>, Ryuji Kawano<sup>2</sup>, Kenji Usui<sup>1</sup>

In order to apply nanopores to various fields such as medicine and environment, nanopores with various structures and sizes need to be developed. Therefore, we have focused on peptide nanopores and developed  $\beta$ -barrel type nanopores using  $\beta$ -sheet peptides. In this study, we aimed to fabricate nanopores with higher selectivity of a target molecule by synthesizing various peptides. Then we attempted to elucidate a correlation between peptide sequences and the association state of peptide nanopore with statistical analysis and molecular descriptors.

**Keywords :** *Peptide nanopore; Immobilized peptide; Principal component analysis (PCA); Photocleavable linker; Molecular descriptors*

ナノポア (数 nm の細孔) は医療や環境などの様々な分野での応用が期待されており<sup>1)</sup>, 様々な構造やサイズをもつナノポアが必要である。そのため、我々はこれまで、配列改変が容易であるペプチドに着目し、 $\beta$ シートペプチドから成る $\beta$ -バレル型ナノポアを開発してきた<sup>2)</sup>。しかしながら、ペプチド配列が有する化学的特徴と形成する構造の関係は現在のところ不明確で、配列設計が難しいことが現状である。そこで、本研究では、20 種程度のペプチド配列を用意して、統計解析と分子記述子によるペプチド配列とナノポアの会合数との相関の解明を目指す。

まず、光照射のみで簡便にペプチドを脱樹脂できる光開裂リンカー<sup>3)</sup>を導入し、N末端の1残基のみを変更した計23種類のペプチドを合成した。それらペプチドについて円二色性スペクトル測定による二次構造の解析、凝集指示薬であるチオフラビンTを用いた凝集性の評価、SDS-PAGEやゲルろ過クロマトグラフィーを用いた会合数の評価を行った。得られた実測データについて主成分分析と分子記述子を用いることで、配列のもつ化学的特徴と形成する構造の相関の解析<sup>4)</sup>を行った。今後、さらにシミュレーションや実測のデータを増やし、配列と会合数の相関を解明することで、目的のナノポアを形成するペプチド配列の設計が可能となることが期待できる。

1) D. Qiao, *et al.*, *Sci. China.*, **2022**, 65, 2122-2143.; 2) K. Shimizu, *et al.*, *Nat. Nanotech.*, **2022**, 17, 67-75.; 3) K. Usui, *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 8332.; 4) K. Usui, *et al.*, *Mol. Biosyst.*, **2006**, 2, 417-420.

## 遷移金属錯体の高分子効果による抗がん活性の増強と免疫応答を抑制した腫瘍へのデリバリー法の検討

(東京理大理応化<sup>1</sup>・東京理大院理研化学<sup>2</sup>) ○興梠 雅朋<sup>1</sup>・平田 鷹輔<sup>2</sup>・青木 元汰<sup>2</sup>・大塚 英典<sup>1,2</sup>

Enhancement of anticancer activity obtained by polymeric transition metal complexes and investigation of their delivery to tumor that can suppress immune responses (<sup>1</sup>*Dept. of Appl. Chem., Facul. of Sci., Tokyo Univ. of Sci.*, <sup>2</sup>*Dept. of Chem., Grad. Sch. of Sci., Tokyo Univ. of Sci.*) ○Masatomo Kohro<sup>1</sup>, Yosuke Hirata<sup>2</sup>, Genta Aoki<sup>2</sup>, Hidenori Otsuka<sup>1,2</sup>

The metal complex DPA[Cu], which has anticancer properties, was polymerizing to formulate triblock copolymer, PEG(4k)-*b*-pDPA[Cu]-*b*-pPy, to enhance its drug efficacy and tumor targeting. This polymer is reported to intercalate with DNA, form an oxygen-copper complex dinuclear intermediate, produce ROS, and cleave DNA, exhibiting anticancer activity [1]. The dramatically improved redox activity of the polymerized copper complex was confirmed by EtBr exclusion test and DNA cleavage activity. Poly(ethylene glycol) (PEG) is widely used for particle coating to impart biocompatibility and stealth-like properties in vivo for diverse biomedical applications. Previous studies have examined the effect of PEG molecular weight and PEG coating density on the biological fate of various particles; however, there are few studies that detail the fundamental role of PEG molecular architecture in particle engineering and bio-nano interactions. Herein, we engineered PEG-coated particles using a colloidal gold templating method and investigated how the PEG building block architecture impacted the physicochemical properties (e.g., non-specific protein adsorption and dispersion stability) of the PEG-coated particles and subsequently modulated particle-immune cell interactions in human blood.

**Keywords:** Polymer; Copper Complexes; Fenton-Like Reaction

抗癌剤となる金属錯体 DPA[Cu] の高分子化による薬効強化と腫瘍集積を目的として、生体適合性のポリエチレングリコール(PEG)と金属表面に高い結合性を有するピリジン(Py)とのトリブロック共重合体 PEG(4k)-*b*-pDPA[Cu]-*b*-pPy を合成した(Fig.1)。この高分子は DNA に対してインターカレート機構で集積し、酸素と銅錯体複核系の間体を形成して ROS 生成により DNA を切断して抗がん活性を示すことを報告した [1]。EtBr 排除試験や DNA 切断活性試験を行うことで、銅錯体を高分子化した際の効果とその時の吸着及び切断活性メカニズムについて解明する。高分子化することによる酸化還元活性向上と錯体化率を高くすることによる 1 ポリマーあたりの結合定数上昇が確認できた。PEG は多様な生医学的応用のために、生体適合性と生体内でのステルス性を付与するための粒子コーティングに広く用いられている。既往研究では、様々な粒子の生物学的挙動に対する PEG 分子量と PEG コーティング密度の効果が検討されてきた。しかし、粒子工学とバイオ・ナノ相互作用における PEG 分子構造の基本的役割について詳述した研究はほとんどない。ここでは、コロイド金テンプレート法を用いて PEG 粒子を設計し、PEGylation 構造が PEG 粒子の物理化学的特性 (例えば、非特異的タンパク質吸着面や分散安定性) にどのような影響を与え、その後ヒト血液中の粒子-免疫細胞相互作用を調節するかを調べることを目指した。

[References] 1. S. Osawa, H. Otsuka et al. *Macromol. Rapid Commun.* 2021, 42, 2100274.

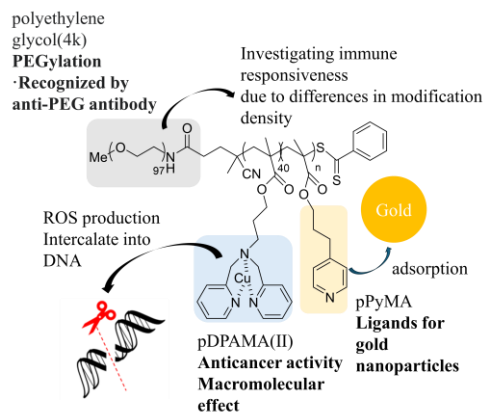


Figure 1. Polymer designed to enhance its drug efficacy and tumor targeting.

## ミトコンドリア移行シグナルペプチドを模倣した屈曲を有する両親媒性ペプチドの合成と特性評価

(龍谷大先端理工<sup>1)</sup>) ○宮崎翔大<sup>1</sup>、富崎欣也<sup>1</sup>

Synthesis and characterization of amphiphilic peptides with flexural structures mimicking mitochondrial transfer signaling peptides. (*Ryukoku University Department of Materials Chemistry*<sup>1)</sup>) ○Shota Miyazaki<sup>1</sup> Kin-ya Tomizaki<sup>1</sup>

Mitochondria is cell organelles involved in ATP synthesis and apoptosis. In our laboratory, we are studying the synthesis, characterization, and cytotoxicity of mitochondrial transfer signaling (MTS) peptides derived from rat aldehyde dehydrogenase. In this study, we hypothesized that a bend structure of MTS is involved in its toxicity, and we investigated the structure and properties of the bend peptides by tandem dimerization of noncytotoxic self-assembling peptides (Cap-p) with a bend linker and spectroscopic measurements. We have previously designed and synthesized a peptide (MTS-p) consisting of a self-assembling peptide (Cap-p) at the C-terminus of substituting some amino acids in the MTS sequence, and investigated their structures and properties by spectroscopic measurements. In the present study, we hypothesized that such a bend structure of MTS is involved in the toxicity and synthesized Cap-p-GP-Cap-p, a tandem dimerization of two non-cytotoxic self-assembling peptides (Cap-p) with a Gly-Pro linker by Fmoc solid phase synthesis, and investigated its structure and properties by spectroscopic measurements. The results showed that the bent peptide formed an  $\alpha$ -helical structure in TFE and in SDS-containing PBS, but not in PBS.

**Keyword:** peptide, chemotherapy

ミトコンドリアは ATP の合成やアポトーシスに関与する細胞小器官である。当研究室ではラットアルデヒドデヒドロゲナーゼ由来のミトコンドリア移行シグナル (MTS) ペプチドの合成、特性評価、細胞毒性について研究をすすめている。これまでに自己集合化ペプチド (Cap-p) の N 末端に、MTS 配列の一部のアミノ酸を置換して結合させたペプチド (MTS-p) を設計および合成し、分光学的測定によってそれらの構造・特性を調べてきた。MTS-p は HeLa 細胞、Cos-7 細胞でそれぞれ 15  $\mu$ M, 19  $\mu$ M の IC<sub>50</sub> を示した。本研究では、MTS の屈曲構造が毒性に関与していると考え、細胞毒性を示さない自己集合化ペプチド (Cap-p) 同士を屈曲性のリンカーでタンデム二量化した Cap-p-GP-Cap-p を Fmoc 固相合成法で合成し、分光学的測定により構造と特性について調べた。CD 測定の結果、屈曲ペプチドは PBS 中における二次構造は解析困難であったが、TFE 中および SDS 含有 PBS 中では  $\alpha$ -ヘリックス構造を形成した。

## SARS-CoV-2 の RBD および受容体 ACE2 を同時に分解する 2 機能抗体酵素の化学的性質と感染抑制作用

(大分大医<sup>1</sup>・大分大院工<sup>2</sup>・鈴鹿医療大薬<sup>3</sup>・九州先端研<sup>4</sup>・大分大研究マネジメント<sup>5</sup>・大分大グローバル感染研<sup>6</sup>) ○八尋隆明<sup>1,6</sup>・関未来<sup>2</sup>・辻田萌<sup>2</sup>・田口博明<sup>3</sup>・宇田泰三<sup>1,4</sup>・一二三恵美<sup>5,6</sup>

Chemical properties and inhibitive effect of bifunctional catalytic antibody capable of simultaneously degrading CoV-2 RBD and receptor ACE2. (<sup>1</sup>*Oita Univ. Med.*, <sup>2</sup>*Grad. Sch. Eng., Oita Univ.*, <sup>3</sup>*Suzuka Univ. Med. Sci.*, <sup>4</sup>*Open Lab., ISIT*, <sup>5</sup>*Inst. Res. Mgmt., Oita Univ.*, <sup>6</sup>*Res. Ctr. GLB./LCL. Inf. Dis., Oita Univ.*) ○Takaaki Yahiro,<sup>1,6</sup> Mirai Seki,<sup>5</sup> Moe Tsujita,<sup>2,5</sup> Hiroaki Taguchi,<sup>3</sup> Taizo Uda,<sup>1,4</sup> Emi Hifumi,<sup>5,6</sup>

By deleting Pro 95 at the CDR-3 of the antibody light chain, we confer antigen-degrading activity to the antibody<sup>1,2,3</sup>. In this study, we employed h11B11 and H4 mAbs for degradation of ACE2 and RBD, respectively. From each antibody light chain, Pro 95 was deleted to confer the degradation activity. The two modified antibody light chains were linked via a linker to synthesize a bifunctional catalytic antibody, which showed the degradation of both RBD and ACE2 peptides (Fig. 1). In the inhibition assay using CoV-2, no increase in viral genome levels was observed in the culture supernatant when treated with the bifunctional catalytic antibody, indicating that viral infection was almost completely suppressed.

**Keywords :** Catalytic antibody; VL; SARS-CoV-2; ACE2;

我々は抗体軽鎖 CDR-3 の 95 番目の Pro を欠失させると、抗体が抗原分解活性を持つ事を見出した<sup>1,2,3</sup>。そこで、この手法により SARS-CoV-2(CoV-2)の感染を抑制する目的で、Cov-2 Receptor Binding Domain (RBD)とその受容体である Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE2)の両者を分解する 2 機能抗体酵素の作製を試みた。RBD の分解には h11B11 モノクローナル抗体、また、ACE2 の分解には H4 モノクローナル抗体を用い、それぞれの軽鎖から Pro95 を欠失させて、抗原に対する分解活性を付与した。次いで、この両者を linker で繋いだ 2 機能抗体酵素を合成した (以下、h11B11/VL Δ-linker-H4/VL Δ と略)。h11B11/VL Δ-linker-H4/VL Δ は、FRET 修飾した RBD peptide 及び ACE2 peptide を分解した(Fig. 1)。SARS-CoV-2(α 株)による感染抑制試験では、2 機能抗体酵素や中和抗体と反応させたウイルスを Vero E6/TRPMSS2 細胞に感染させて培養し、RT-qPCR によりウイルスゲノム量の変化を調べたところ、ゲノムの増加は認められず、ほぼ完全にウイルスの感染を抑制した。

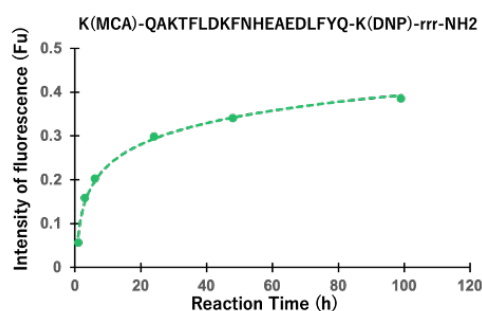


Fig.1 Degradation of ACE2-Peptide

1) Hifumi et al., *Science Advances*, **6**(13), eaay6441(2020) 2) Hifumi et al., *Proc. Jpn Academy, Ser B*, **99**, 155-172(2023). 3) Hifumi et al., *Scientific Reports*, **14**:12184(2024).

## アンジオテンシン I 変換酵素阻害活性を有するトリペプチドの機械学習による予測と検証

(九工大院生命体工<sup>1</sup>・バイタルリソース応用研究所<sup>2</sup>) ○田中瑞穂<sup>1</sup>・畠中登志也<sup>2</sup>・加藤珠樹<sup>1</sup>

Prediction and Validation of Tripeptides with Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity by Machine Learning (<sup>1</sup>*Kyushu Institute of Technology*, <sup>2</sup>*Vital Resources Applied Laboratory*) ○Mizuho Tanaka,<sup>1</sup> Toshiya Hatakenaka,<sup>2</sup> Tamaki Kato<sup>1</sup>

Angiotensin I-converting enzyme (ACEI) is an enzyme associated with increased blood pressure, and various inhibition studies have been conducted to alleviate hypertension. In this study, we focused on tripeptides with ACEI inhibitory activity and used machine learning to identify sequences with high inhibitory potential. As in a previous study<sup>1)</sup>, IC<sub>50</sub> values of known inhibitory peptides were collected from an online database, and docking simulations of these inhibitory peptides with ACEI were performed using MOE to gather interaction data. Following previous studies, PyCaret was employed for machine learning, but efforts were made to improve the prediction accuracy of candidate inhibitory peptides by re-evaluating the relationship between the collected data and IC<sub>50</sub> values and by modifying the prediction method. Several tripeptides predicted to have high ACEI inhibitory activity were selected and synthesized using conventional peptide solid-phase synthesis with the Fmoc strategy. The ACEI enzyme inhibitory activity of these peptides was then measured in vitro.

The results of the inhibitory activity measurements revealed several peptides with high inhibitory activity, comparable to those reported in previous studies. These findings suggest that further refinement of prediction methods utilizing machine learning could enable more accurate screening of peptides with inhibitory activity.

**Keywords :** Hypertension, Angiotensin I-Converting Enzyme, Machine learning, PyCaret

アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE I) は血圧上昇に関連する酵素であり、高血圧の緩和に向けてさまざまな阻害研究が行われている。本研究では、ACE I 阻害能を持つトリペプチドに着目し、機械学習を用いて阻害活性が高い配列を見出すことを試みた。先行研究<sup>1)</sup>と同様、既知の阻害ペプチドの IC<sub>50</sub> をオンラインデータベースから収集し、これら阻害ペプチドと ACE I のドッキングシミュレーションを MOE を用いて行い、相互作用に関するデータを収集した。機械学習についても先行研究と同様 PyCaret を用いたが、収集したデータと IC<sub>50</sub> の関連性を再評価して予測手法を変えることで阻害ペプチド候補の更なる予測精度向上を試みた。新たに ACE I 阻害活性が高いと予測されたトリペプチドを複数選択し、Fmoc 戦略を用いた通常のペプチド固相合成法により合成し ACE I 酵素阻害活性の in vitro 測定を行った。

阻害活性測定の結果、先行研究で見出したものと同レベルの高い阻害活性を有するペプチドを複数発見することができた。これは、機械学習を活用した予測によって、阻害能を持つペプチドのスクリーニングにより高精度な予測が可能になることを示している。

1) Prediction and Validation of Proline-containing Tripeptides with Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Activity Using Machine Learning Models. T. Hatakenaka, Y. Fujimoto, T. Kato, *Letters in Drug Design & Discovery*, **21**(15), 3069-3075, 2024.

## N末端修飾試薬 1H-1,2,3-トリアゾールカルボアルデヒド誘導体を用いたキトサナーゼ固定化レジンの調製と酵素活性評価

(北大院環境科学<sup>1</sup>・北大院地球環境科学<sup>2</sup>・ラ・セレナ大食品工学部) ○相内 優里<sup>1</sup>・小島 摩理子<sup>2</sup>・Ronny Martinez<sup>3</sup>・小野田 晃<sup>1,2</sup>

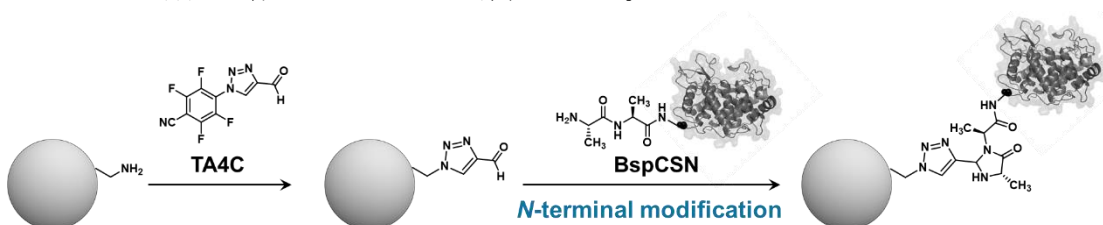
Preparation of Chitosanase-Immobilized Resin Using 1H-1,2,3-Triazolecarbaldehyde Derivatives as N-terminal Modification Reagents and Evaluation of Enzymatic Activity

(<sup>1</sup> Grad. School Env. Sci., Hokkaido Univ., <sup>2</sup>Grad. School Env. Earth Sci., Hokkaido Univ., <sup>3</sup>Department of Food Engineering, Universidad de La Serena) ○Yuri Ainai<sup>1</sup>, Mariko Kojima<sup>2</sup>, Ronny Martinez<sup>3</sup>, Akira Onoda<sup>1,2</sup>

Chitosanase hydrolyzes chitosan to produce chitosan oligosaccharides (COS). COS have attracted attention due to their high biological activity. Enzyme-immobilized materials enhance enzyme stability and other properties. Therefore, the development of chitosanase-immobilized materials is of significant interest. Our group reported that 1H-1,2,3-triazole-4-carbaldehyde (TA4C) derivatives specifically modify the N-terminus of proteins<sup>1)</sup>. In this study, we prepared immobilized resins of chitosanase at the N-terminus using TA4C derivatives and evaluated enzymatic activity.

**Keywords :** Chitosan; Chitosanase; N-Terminus; Immobilization

キトサンを低分子化して得られるキトサンオリゴマー (COS) は高い生物活性を有する。また、キトサンを原料に COS を得るには加水分解酵素のキトサナーゼを用いる方法がある。一般的に酵素固定化材料は、酵素の安定性向上、酵素の回収・再利用が可能になるため、キトサナーゼの固定化材料の開発は興味が持たれる。当研究室では、タンパク質の N 末端を選択的に修飾可能な 1H-1,2,3-トリアゾール-4-カルボアルデヒド (TA4C) 誘導体 を報告している。TA4C 誘導体は、Dimroth 転移反応を経て 1 段階でレジンへ導入することが可能である<sup>1)</sup>。本研究では、キトサナーゼの N 末端を修飾部位とする固定化レジンの調製と酵素活性の評価を実施した。まず *Bacillus sp.* MN 由来キトサナーゼ (BspCSN) を選択し、大腸菌を用いて発現、精製した。アミノ基修飾されたレジン为原料に、その表面のアミノ基に対して TA4C 誘導体を導入後、BspCSN の N 末端と反応させることによって酵素を固定化した。DNS(3,5-ジニトロサリチル酸)法を用いて加水分解反応後の分解物の呈色を行った結果、固定化キトサナーゼが活性を有していることが確認された。



**Figure 1.** N-terminal specific immobilization of chitosanase on resin

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

## 分子動力学シミュレーションによる脂質フリッパーゼ MurJ の機能サイクルにおけるイオンの役割

(東理大院理<sup>1)</sup>) ○村田 景菜<sup>1</sup>, 森 貴治<sup>1</sup>

Role of Ions in the Conformational Cycle of Lipid Flippase MurJ using Molecular Dynamics Simulations(<sup>1</sup>*Graduate School of Science, Tokyo University of Science*) ○Keina Murata<sup>1</sup> and Takaharu Mori<sup>1</sup>

In the synthesis of the cell wall in Gram-negative bacteria, the lipid flippase MurJ plays a crucial role. MurJ is a membrane protein that flips Lipid II, the precursor of peptidoglycan, a major component of the cell wall, from the inner side to the outer side of the inner membrane. MurJ adopts a V-shaped structure composed of 14 transmembrane helices and undergoes transitions between five distinct states during its functional cycle. These transitions are thought to involve not only the binding and release of Lipid II but also the coordination of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions within the transmembrane region of MurJ. However, the correlation between the structural changes of MurJ, ion coordination, and the movement of Lipid II remains poorly understood. To address this, the present study focuses on the structural transition of MurJ from the Inward closed to the Inward open state. Molecular dynamics (MD) simulations were performed in the absence of Lipid II under various conditions, altering the coordination and concentration of ions, to investigate the relationship between the structural changes of MurJ and ion dynamics. The results revealed that the strength of ion coordination to the hydrophobic groove within MurJ varied depending on the type of ion, and Na<sup>+</sup> was stabilized in the presence of Cl<sup>-</sup>. Additionally, it was suggested that triggers for structural transitions may involve factors other than ions.

**Keywords :** *Molecular dynamics simulations, lipid flippase, integral membrane protein*

グラム陰性菌の細胞壁合成において、脂質フリッパーゼ MurJ が重要な役割を果たしている。MurJ は細胞壁の主要成分であるペプチドグリカンの前駆体である Lipid II を細胞内膜の内側から外側へと反転輸送させる膜タンパク質である。MurJ は 14 本の膜貫通ヘリックスで構成された V 字型の構造をしており、機能サイクルにおいて 5 種類の状態間を遷移する。これらの遷移には、Lipid II の結合や解離だけでなく、MurJ 膜貫通領域内での Na<sup>+</sup> や Cl<sup>-</sup> の配位も関係していると考えられているが<sup>1)</sup>、MurJ の構造変化とイオン配位、Lipid II 輸送の相関の詳細は未だによく分かっていない。そこで本研究では、MurJ の Inward closed 状態から Inward open 状態への構造遷移過程に注目し、Lipid II 非存在下においてイオンの配位や濃度を変えた種々の条件下で分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、MurJ の構造変化とイオンのダイナミクスの関係を調べた。計算の結果、イオンの種類により MurJ 内の疎水性溝への配位の強さに差があり、Na<sup>+</sup> は Cl<sup>-</sup> の存在により安定していることがわかった。また、構造遷移のきっかけは、イオン配位以外にもある可能性が示唆された。

1) A. C. Y. Kuk *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, **91**, 705-729 (2022)

## アルコールのリパーゼ触媒ガロイル化

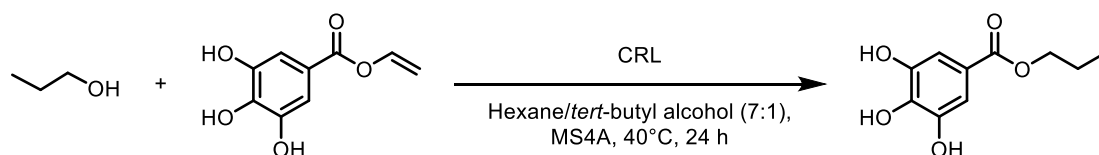
(阪府大理<sup>1</sup>・阪公大院理<sup>2</sup>) ○長谷 千波矢<sup>1</sup>・大西 弘記<sup>1</sup>・大高 廉士郎<sup>2</sup>・小島 秀夫<sup>2</sup>

Lipase-catalyzed Galloylation of Alcohols (<sup>1</sup>*School of Science, Osaka Prefecture University,*  
<sup>2</sup>*Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University*) ○Chihaya Hase,<sup>1</sup> Hiroki Onishi,<sup>1</sup> Renshiro Otaka,<sup>2</sup> Hideo Kojima<sup>2</sup>

Lipases are widely used as biocatalysts for the industrial production of useful substances because of their high activity, selectivity, stability, and easy handling. Although there are many studies on the lipase-catalyzed synthesis of carboxylic acid esters, no studies have been reported on the lipase-catalyzed synthesis of gallic acid esters. Gallic acid esters are useful compounds; having various bioactivities such as antioxidant and body fat-lowering activities. In this study, we investigated the enzymatic synthesis of propyl gallate from 1-propanol and vinyl gallate. For example, we found that propyl gallate was obtained from 1-propanol in 97% yield using *Candida rugosa* lipase in hexane/*tert*-butyl alcohol (7:1). Moreover, when *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) was used, the acetyl-protected vinyl gallate was deprotected to give vinyl gallate in 91% yield.

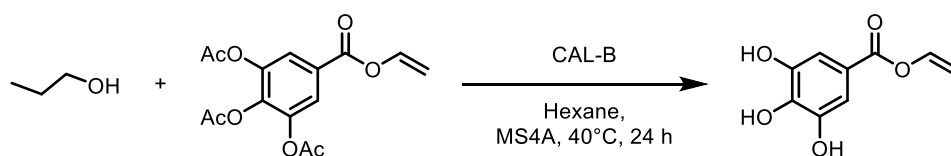
**Keywords :** Lipase; Galloylation; Alcohols

リパーゼは、その高い活性、選択性、安定性、および取り扱いの容易さから、有用物質を工業的に生産するための生体触媒として広く利用されてきた。リパーゼを触媒とするカルボン酸エステル合成に関する研究は多いが、没食子酸エステル合成に関する研究例はない。没食子酸エステルは抗酸化活性や体脂肪低下活性など様々な生理活性を有する有用化合物である。本研究では、リパーゼ触媒を用いて、1-プロパノールと没食子酸ビニルから没食子酸プロピルの酵素合成を検討した。例えば、ヘキサン/*tert*-ブチルアルコール (7:1) 混合溶媒中、*Candida rugosa* リパーゼ (CRL) 存在下、40℃で24時間反応させたところ、没食子酸プロピルが97%の収率で得られた (Scheme 1)。



**Scheme 1**

さらに、*Candida antarctica* リパーゼ B (CAL-B) を用いると、アセチル基で保護された没食子酸ビニルが脱保護されて、91%の収率で没食子酸ビニルが得られることが分かった (Scheme 2)。



**Scheme 2**

## 機械学習によるアンジオテンシン I 変換酵素阻害活性を有するトリペプチドの予測精度向上へのアプローチ

(九工大院生命体<sup>1</sup>・バイタルリソース応用研究所<sup>2</sup>) ○西 祐一<sup>1</sup>・田中 瑞穂<sup>1</sup>・畠中 登志也<sup>2</sup>・加藤 珠樹<sup>1</sup>

Approach to Improving the Prediction Accuracy of Tripeptides with Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity Using Machine Learning (<sup>1</sup>*Graduate School of Life Science and System Engineering, Kyushu Institute of Technology*, <sup>2</sup>*Vital Resources Applied Laboratory, Inc.*) ○Yuichi Nishi,<sup>1</sup> Mizuho Tanaka,<sup>1</sup> Toshiya Hatakenaka,<sup>2</sup> Tamaki Kato<sup>1</sup>

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition is utilized in the treatment of hypertension. Based on this, previous research has focused on the discovery of tripeptides with strong ACE inhibitory activity as a foundation for pharmaceutical design. In this study, highly active tripeptides were predicted using machine learning, based on IC<sub>50</sub> values and docking simulation data, and their activity was experimentally confirmed. Therefore, in this research, we attempted to achieve more accurate predictions by expanding these data with information from other databases. Using the expanded data, an optimal model was constructed by automatically selecting algorithms with PyCaret, an all-in-one machine learning library, similar to the previous study. In this presentation, we will compare the model from the previous research with the model from this study and report on the findings.

**Keywords** : *Hypertension; Angiotensin I-converting Enzyme; Tripeptides; Machine Learning; PyCaret*

アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害は、高血圧の治療に活用されている。これに基づき、先行研究<sup>1)</sup>では、ACE 阻害を活用した医薬品設計の基盤として ACE 阻害活性が強いトリペプチドの探索が行われた。この研究では、IC<sub>50</sub> 値とドッキングシミュレーションデータを基に機械学習を用いて高活性なトリペプチドを予測し、実験的にその活性が確認された。そこで本研究では、これらのデータを他のデータベースの情報で拡張し、より精度の高い予測を試みた。拡張したデータを用いて、先行研究と同様に機械学習のオールインワンライブラリである PyCaret でアルゴリズムを自動的に選定し、最適なモデルを構築した。本発表では先行研究のモデルと本研究のモデルを比較し、その結果について報告する。

- 1) Prediction and Validation of Proline-Containing Tripeptides with Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity Using Machine Learning Models. T. Hatakenaka, Y. Fujimoto, K. Okamoto, T. Kato, *Lett. Drug Des. Discov.* **2024**, 21(15), 3069–3075.

## 疎水性枝部を有する酸化的 folding 触媒デンドリマーの開発

(東海大理化<sup>1</sup>, 東海大先進生命研<sup>2</sup>) ○ 岩本 駿平<sup>1</sup>・戸羽 遥楽<sup>1</sup>・荒井 堅太<sup>1,2</sup>

Development of oxidative-folding-catalyzing dendrimers with hydrophobic branches  
(<sup>1</sup>Department of Chemistry, School of Science, Tokai University, <sup>2</sup>Institute of Advanced Biosciences, Tokai University) ○ Shunpei Iwamoto,<sup>1</sup> Haruka Toba,<sup>1</sup> Kenta Arai<sup>1,2</sup>

Synthesized polypeptide chains need to fold into a unique three-dimensional structure to exhibit their physiological functions. Protein Disulfide Isomerase (PDI), an endoplasmic reticulum-resident oxidoreductase, introduces disulfide (SS) bonds in substrate proteins, effectively promoting protein folding. Furthermore, PDI enhances the kinetics of oxidative folding by incorporating the structurally immature proteins into its own hydrophobic cavity. We previously reported that water-soluble diselenides catalyze oxidative folding through a PDI-like catalytic mechanism.<sup>[1]</sup> In this study, we attempted to develop hydrophobic peptide dendrimers with a diselenide moiety as a redox active center to mimic the catalytic mechanism of PDI. Dendrimer-like compounds were synthesized by conjugating 2–8 residues of phenylalanine or tyrosine, which are representative hydrophobic amino acids, to a diselenide core. The prepared compounds were applied to oxidative folding of oxytocin having two cysteine residues, and were found to effectively catalyze aerial SS formation. Interestingly, compounds with a higher number of hydrophobic amino acids introduced tended to exert better catalytic activity. This may imply that hydrophobic interactions between the hydrophobic amino acids and denatured proteins enhance the oxidative folding kinetics. *Keywords: Redox; Protein folding; Selenium; Disulfide*

合成されたポリペプチド鎖は、folding により固有の三次元構造を獲得することで生理機能を発揮する。小胞体内在性の酸化還元酵素である Protein Disulfide Isomerase (PDI)は、基質蛋白質にジスルフィド(SS)結合を導入し、構造未成熟な蛋白質の folding を効果的に促進する。さらに、PDI は自身の疎水性キャビティーに基質蛋白質を取り込むことで、酸化的 folding の速度論を強化している。我々は以前、水溶性ジセレンド化合物が、PDI と同様の反応機構によって酸化的 folding を触媒することを報告した<sup>[1]</sup>。本研究では、PDI の酸化的 folding 触媒機構を模倣するため、酸化還元活性中心としてジセレンド部位を有する疎水性ペプチドデンドリマーの開発を目指した。ジセレンド中心部に疎水性アミノ酸であるフェニルアラニンあるいはチロシンを 2～8 残基有するデンドリマー様化合物を合成した。調製した化合物を分子内にシステイン残基を 2 つ有するオキシトシンの酸化的 folding に応用したところ、いずれの化合物も空気酸化による SS 形成を良好に触媒した。興味深いことに、疎水性アミノ酸の導入数が多い化合物ほど良い活性を示す傾向が見られた。疎水性アミノ酸と変性蛋白質間における疎水性相互作用が、酸化的 folding 速度論を強化しているものと考えられる。

[1] *Chem Asian J.* **2020**, *15*, 2646-2652.

## オレンジカロテノイドタンパク質の光反応における N 末端ヘリックスの重要性

(京大院理<sup>1</sup>・学習院大理<sup>2</sup>) ○渡嘉敷 直志<sup>1</sup>・大畑 貴聖<sup>1</sup>・床次 俊郎<sup>2</sup>・中曽根祐介<sup>1</sup>・寺嶋 正秀<sup>1</sup>

Importance of N-terminal helix of Orange Carotenoid Protein on the photoreaction

(<sup>1</sup>Graduate School of Science, Kyoto University, <sup>2</sup>Graduate School of Science, Gakushuin University) ○Tadayuki Tokashiki<sup>1</sup>, Takatoshi Ohata<sup>1</sup>, Shunrou Tokonami<sup>2</sup>, Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

Orange Carotenoid Protein (OCP) is a blue-green light sensor protein found in cyanobacteria. It plays a key role in regulating the non-photochemical quenching of photosystems through its photo-cyclic reaction. We had investigated the reaction dynamics of OCP and its interaction with a regulatory protein, primarily using the transient grating method. This study aimed to elucidate the role of the characteristic N-terminal helix in OCP. To achieve this, we conducted reaction measurements on OCP mutants, including those lacking the N-terminal helix and those with point mutations in this region. The results revealed that the protein structure without the N-terminal helix in the dark state resembles that in the light-activated state, indicating its role in stabilizing the dark-adapted conformation. Furthermore, point mutations in this region were found to increase the photo-reaction yield, suggesting that the enhanced mobility of the N-terminal helix promotes the protein's photo-reactivity.

**Keywords :** Orange Carotenoid Protein; Light Sensor Protein; Transient Grating method

オレンジカロテノイドタンパク質 (OCP) は、シアノバクテリアに存在する青緑色光センサータンパク質で、光化学系の非光化学的消光機構において重要な役割を果たしている。我々はこれまで、過渡回折格子法 (TG 法) を用いた反応解析により、OCP が光励起されることで分子内構造が変化し、その後に二量体を形成する過程を明らかにしてきた。本研究では、OCP の光反応機構をさらに詳細に解明するため、光活性化において重要とされる N 末端のヘリックス構造 (N-terminal extension : NTE) に着目した (Fig.1)

<sup>1</sup>。この部位の役割と制御機構を調べるために、NTE を除去した変異体および点変異を加えた変異体を作製し、それらの光反応を TG 法により解析した。

NTE を除去した変異体は、光照射を行わなくても光励起後の野生型 OCP と同様の吸収スペクトルと溶液構造を示し、これは NTE が暗状態の構造を安定化する働きを持つことを示唆する。また、野生型 OCP は暗状態において単量体と二量体の平衡にあるが、NTE 付近に点変異を加えると二量体形成が阻害されることが明らかとなった。この変異体でも、光依存的な二量化は維持されており、その効率が野生型に比べて大幅に向上した。これらの結果は、暗状態で二量体形成が抑制されることで光二量化可能な単量体の割合が増加したこと、さらに変異による NTE の運動性の向上が OCP の光反応性を高めたことを示唆している。また、OCP は暗条件下で自発的に光状態から元の暗状態に戻るが、変異体では光状態の寿命が長くなることも確認された。以上の結果を基に、OCP の光反応における NTE の役割について議論を行う。

1. Mezzetti, A. et al. *J. Phys. Chem. B* **123**, 3259–3266 (2019).

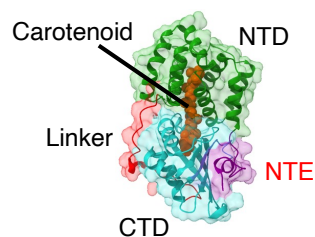


Fig. 1 Structure of OCP (PDB ID: 3MG1)

## ペプチドの線維形成に関する実測データから得られる主成分得点と分子記述子の相関を用いた毒性配列予測

(甲南大学 FIRST <sup>1,3</sup> 神戸大学院医 <sup>2</sup>) ○寺尾泰晟<sup>1</sup>・小林もえ<sup>1</sup>・武川公<sup>2</sup>・梅谷智弘<sup>3</sup>・栢森史浩<sup>1</sup>・臼井健二<sup>1</sup>

**Prediction of cytotoxic peptide sequences using principal component scores and molecular descriptors** (<sup>1</sup>*Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology Konan University*, <sup>2</sup>*Graduate School of Medicine, Kobe University*, <sup>3</sup>*Department of Intelligence and Informatics, Konan University*) ○Taisei Terao<sup>1</sup>, Moe Kobayashi<sup>1</sup>, Akira Takekawa<sup>2</sup>, Tomohiro Umetani<sup>3</sup>, Fumihiro Kayamori<sup>1</sup>, Kenji Usui<sup>1</sup>

Effective peptide designing studies using phage display or artificial intelligence (AI) have been actively studied. However, it is difficult to design sequences with amino acids or functional groups that do not include those in the training data. In this study, we attempted to design sequences by analyzing measured data on the fibril formation of selected short peptides using statistical analysis and molecular descriptors. As a result, we succeeded in designing sequences with an artificial functional group applicable to cell culture substrates.

**Keywords :** *Immobilized peptide,  $\beta$ -Sheet structure, Statistical analysis, Molecular descriptors, Cell adhesion.*

近年機械学習や AI を活用した、ペプチドの特性を予測する研究や、特定の機能（特性）を有するペプチドの配列設計が盛んに研究されている 1)。しかしこれらの手法は、教師データに無いアミノ酸や官能基を有する配列の設計を行うことが難しい 2)。そこで本研究では、短鎖の線維形成ペプチドを題材とし、数十種類の配列の線維形成に関する実測データを統計解析と分子記述子を用いて解析することで、ライブラリ中には含まれない官能基を有する人工の線維形成ペプチド配列を設計し、それらについて細胞毒性の予測を試みた 3)。初めに線維を形成し細胞毒性を有する短鎖ペプチドをコア配列として選定した。コア配列と、コア配列の N 末端に標準アミノ酸を 1 残基ずつ付加した 21 種類の配列を作製した。種々のペプチド配列と線維形成の相関を解析するため、線維形成に関する実測データを得、主成分分析（PCA）を行った。PCA の結果得られた主成分得点と、計算科学分野で使用される分子記述子を比較し、最も相関の高い分子記述子を用いて PC1、PC2 の解釈を行った。次に種々のペプチド配列の細胞毒性や細胞接着など特性の実測データを得、PCA の二次元座標上に示し、線維形成と特性の傾向を得た。以上の主成分得点と分子記述子及び毒性や接着など特性のデータを考慮し、21 種類の配列に含まれない人工の官能基などを付与した、ペプチド配列についてその細胞毒性や細胞接着の予測を試みた。

1) Tran, D. P. *et al.*, *Sci. Rep.*, **11**, 10630 (2021).

2) Batra, R. *et al.*, *Nat. Chem.*, **14**, 1427-1435 (2022).

3) K. Usui *et al.*, *Mol. BioSyst.*, **2**, 417-420(2006).

## マイクロ波照射による細胞内小器官移行性ペプチドのミトコンドリア取り込み効率の向上

(甲南大 FIRST<sup>1</sup>・株式会社ディーエスピーリサーチ<sup>2</sup>・甲南大学 Beyond5G 寄附講座<sup>3</sup>・非電離放射線生体環境総合研究所<sup>4</sup>) ○仮屋 拓斗<sup>1</sup>, 平田 桃<sup>1</sup>, 中西 伸浩<sup>2,3</sup>, 栢森 史浩<sup>1</sup>, 臼井 健二<sup>1,2</sup>

Enhancement of uptake of mitochondria-targeting peptides into mitochondria by microwave irradiation (<sup>1</sup>*Graduate School of Frontiers of Innovative Research and Technology (FIRST), Konan University*, <sup>2</sup>*DSP Research, Inc.*, <sup>3</sup>*Beyond5G Social experiment Academia Project* <sup>4</sup>*Research Institute for Nanobio-environment and Non-Ionizing Radiation (RINNIR)*, ○Takuto Kariya<sup>1</sup>, Momo Hirata<sup>1</sup>, Nobuhiro Nakanishi<sup>2,3,4</sup>, Fumihiko Kayamori<sup>1,4</sup>, Kenji Usui<sup>1,3,4</sup>

Signal peptides are known as peptide sequences to deliver proteins into a specific organelle such as mitochondria. Target substances can be delivered into a specific organelle by conjugating signal peptides with the substances. On the other hand, it has been reported that microwaves enhanced cellular uptake of substances. In this study, we designed mitochondria-targeting peptides and attempted to enhance uptake of the peptides into mitochondria by microwave irradiation. The peptides internalized into mitochondria were observed by confocal laser scanning microscopy. The microscopic images revealed that microwave irradiation enhanced the uptake of the peptides into mitochondria. We could achieve more effective enhancement of the uptake with higher cellular viability by optimization of microwave irradiation conditions and peptide sequences.

**Keywords :** *Mitochondria-targeting peptide; Cellular uptake; Microwave; Drug delivery*

ミトコンドリアなど特定の細胞小器官にタンパク質を送達させるペプチド配列として、シグナルペプチドが知られている<sup>1)</sup>。この配列の付与により、目的の物質を特定の細胞小器官へ送達することが可能である。一方、マイクロ波(MW)は細胞内への物質の取り込み量を増加させることが報告されている<sup>2,3)</sup>。これらの報告では、MW 照射により細胞膜の変形や脱分極が生じ、薬剤の高効率導入や、通常では透過性を持たない物質が細胞内に取り込まれることが示唆されている。本研究ではより効率的なミトコンドリアへの物質の送達を実現するため、ミトコンドリア移行性ペプチドを設計し、MW 照射下でのこれらペプチドのミトコンドリアへの導入を検討した。共焦点顕微鏡観察の結果から、MW の照射によってミトコンドリアへのペプチドの取り込みが促進されることが示唆された。また、ペプチドの配列や MW の照射条件を検討することにより、細胞生存率を維持しつつ、ペプチドの導入を促進することが可能であることが示された。今後、ペプチドの種類や導入時の条件をさらに検討し、ペプチドと MW を利用したミトコンドリアへの物質輸送の最適化を進める。

1) M. Pirisinu *et al.*, *FASEB J.*, **2019**, 33, 7970-7984.

2) T. H. P. Nguyen *et al.*, *Sci. Rep.*, **2017**, 7, 10798.

3) Y. Shamis *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2011**, 77, 3017-3023.

## ペプチド添加による血清アミロイド A のミスフォールディングの抑制

(山口理大<sup>1</sup>) ○長尾 大輝<sup>1</sup>・平松 巧<sup>1</sup>・井手 水紀<sup>1</sup>・佐伯 政俊<sup>1</sup>  
A Novel Peptide for Inhibiting Amyloidogenesis of the Amyloid-Forming Region in SAA  
(<sup>1</sup>*Sanyo-Onoda City University*) ○Daiki Nagao,<sup>1</sup> Takumi Hiramatsu,<sup>1</sup> Mizuki Ide,<sup>1</sup>  
Masatoshi Saiki<sup>1</sup>

The disease secondary amyloidosis is caused by conformational changes in Serum Amyloid A (SAA) protein, leading to amyloid fibrils with abnormal  $\beta$ -sheet structure. In this study, to reveal the inhibitor mechanism underlying amyloidogenesis of SAA protein in detail, a series of SAA synthetic peptides of SAA mutants were analyzed by thioflavin T (ThT)-binding assay and circular dichroism (CD) spectroscopy. We synthesized a peptide designed to inhibit amyloid formation. In the ThT assay, SAA1-25 in the presence of Phe mutant peptides showed weak fluorescence enhancement due to a lack of amyloid-bound ThT. These results suggest that Phe residues 4 and 6 play essential roles in the inhibition of amyloid fibrils. Furthermore, in the CD measurements, SAA1-25 in the presence of Helical peptides corresponding to SAA50-69 spectral patterns with negative bands at 222 nm, which are specific to  $\alpha$ -helical structure. Therefore, it was demonstrated that the addition of  $\alpha$ -helical peptides is effective in maintaining the structure of SAA1-25.

**Keywords :** *Peptide Chemistry, Protein Science*

続発性アミロイドーシスは関節リウマチなどの慢性炎症性疾患に続発して発症する疾患である。この疾患の鍵となるのが血清アミロイド A タンパク質(SAA)である。慢性炎症性疾患の発症に伴って SAA は $\alpha$ ヘリックスを中心とした構造からミスフォールディングによって $\beta$ シート構造へ変化し、異常集合したアミロイドを形成する。このアミロイドが臓器に沈着することで、続発性アミロイドーシスを発症する。SAA のアミロイド形成の抑制法の解明は、病気の分子論的理解において不可欠である。本研究ではミスフォールディングの抑制を目的としたペプチドの設計、調製を行った。

アミロイドの中心であると報告されている SAA1-25 のミスフォールディングを抑制するために、2 種類のペプチドを設計した。1 つ目は、SAA1-25 が形成するアミロイド凝集には Phe 残基の相互作用が関わっているため、それらを遮断するための Phe を変異した $\beta$ シートを設計した( $\beta$ ペプチド)。2 つ目は、SAA1-25 のヘリックス構造を維持するために、ヘリックス性の高い SAA50-69 に相当するペプチド( $\alpha$ ペプチド)を設計した。これらの設計ペプチドを合成し、SAA1-25 と共存させ ThT アッセイを行ったところ、アミロイドの抑制の効果を実証した。また $\alpha$ ペプチドの存在下で円偏光二色性(CD)測定を行ったところ、 $\alpha$ ヘリックス性を維持していたことから、ミスフォールディングの抑制効果を実証した。

## イクオリンの生物発光過程についての理論的研究

(京大院理<sup>1</sup>・和歌山県立医大<sup>2</sup>・京大院薬<sup>3</sup>) ○安東 智大<sup>1</sup>・林 重彦<sup>1</sup>・中津 亨<sup>2</sup>・船橋 俊也<sup>3</sup>

Theoretical Study on the Luminescent Reaction Process of Bioluminescent Protein Aequorin (<sup>1</sup>Graduate School of Science, Kyoto University, <sup>2</sup>Wakayama Medical University, <sup>3</sup>Graduate School of Pharmaceutical Science, Kyoto University) ○Tomohiro Ando<sup>1</sup>, Shigehiko Hayashi<sup>1</sup>, Toru Nakatsu<sup>2</sup>, Toshiya Funahashi<sup>3</sup>

Aequorin is a blue light emitting protein extracted from jellyfish. It has three EF-hands which are a substructure of calmodulin where calcium ions bind. It is experimentally known that the binding of calcium ions to aequorin initiates its structural changes of protein that triggers the chemical reaction of the luminescent substrate molecule, coelenterazine-peroxide.

In this study, we analyzed the correlation between the luminescent reaction of coelenterazine and structural changes of the protein through QM/MM RWFE-SCF method<sup>1)</sup>. This method can simultaneously achieve both highly accurate description of chemical reactions and ample statistical sampling of long-time dynamics of protein structural changes. And we analyzed reactivity of our model by calculating QM/MM free energies using BAR method<sup>2)</sup>. The calculations accurately determine molecular interaction between the substrate molecule and the surrounding amino acid side chains that are important for the reaction and revealed dynamics of protein structural changes associated with calcium ion binding. And we demonstrated the reorganization of the hydrogen bond network near the active site due to water influx.

We will also discuss our effects to explore the proton transfer pathway leading to the luminescent state and to analyze oxygen addition reaction to form peroxide.

**Keywords :** *Molecular Dynamics; QM/MM RWFE-SCF method; Aequorin; Coelenterazine*

イクオリンはオワンクラゲから抽出された青色発光タンパク質である。イクオリンへのカルシウムイオンの結合によるタンパク質構造変化が、発光基質分子であるセレンテラジンの化学反応を誘起することが実験的に知られている。しかし、その発光反応と構造変化の相関のメカニズムは未だ解明されていない。

本研究では、QM/MM RWFE-SCF 法<sup>1)</sup>を用いたイクオリンの反応状態のモデリングにより、発光反応経路の解析を行った。本手法は化学反応の高精度な記述とタンパク質構造変化の長時間ダイナミクス<sup>2)</sup>の統計的記述の両立が可能である。また、BAR 法<sup>2)</sup>を用いた QM/MM 自由エネルギー計算によってモデルの反応性を解析した。これらの手法により、基質分子と、反応に重要な周辺アミノ酸側鎖との分子相互作用が高精度に計算され、カルシウムイオンの結合によるタンパク質構造変化のダイナミクスと活性部位近辺への水分子の流入による水素結合ネットワークの再構築が示された。

当日は、発光前駆体 dioxetanone 生成反応経路の探索や、peroxide 状態を生成する酸素分子付加反応解析の取り組みについても議論する予定である。

1) Kosugi, T. and Hayashi, S., *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8(1), 322.

2) Bennett, C. H., *Journal of Computational Physics.* **1976**, 22(2), 245.

## 異なる冷却条件で調製した $\gamma$ 線照射ゼラチンゲルの力学的物性の違い

(阪公大院理<sup>1</sup>) ○原 正之<sup>1</sup>・森 英樹<sup>1</sup>

Different Mechanical Properties of The Gamma-irradiated Gelatin Gels Using The Different Cooling Processes (<sup>1</sup>*Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University*) ○Masayuki Hara, Hideki Mori.

Gelatin is a material consisting of denatured collagens and can form a thermoplastic hydrogel. Here we have prepared gelatin (Type A) gels with different mechanical properties using a combination of different cooling protocols and  $\gamma$ -irradiation. The Young's modulus (E) values of the  $\gamma$ -irradiated gelatin gels were mostly decreased while the temperature was raised to 40 °C and 60 °C from 20 °C. The values for the slow-cooled gels with concentrated (15–20% (w/v)) gelatin were still significantly higher than the values for the fast-cooled gels. We concluded that the slow-cooled gelatin gels had a higher amount of triple-helical structure, and higher efficiency of covalent crosslinking between gelatin molecules under  $\gamma$ -irradiation, which resulted in a larger number of network points than the fast-cooled gels.

*Keywords : Gelatin; Gamma ray; Cooling process; Crosslink; Young's modulus*

ゼラチンは変性したコラーゲンから成る材料で、熱可塑性のハイドロゲルを生成する。我々は異なる冷却速度条件（速い、遅い）で調製したType Aゼラチンゲルについて、ガンマ線照射を行い、その後20℃から40℃及び60℃に昇温させて、ヤング率（E）測定などの力学的な物性評価を行った。未照射のゲルのヤング率は、冷却速度条件により僅かに異なるだけであったが、ガンマ線照射後のヤング率は、異なる冷却速度条件により明瞭な違いを示した。これは遅くゲル化させた場合には、コラーゲンの変性物であるゼラチンの巻戻りによる3重螺旋構造が多く含まれるので、分子どうしがより近接しており、ガンマ線照射による分子間架橋がより起こり易く架橋点が増えるためであると考えた。

Reference: Different mechanical properties of the gamma-irradiated gelatin gels prepared through the different cooling processes. H. Mori, K. Tominaga, K. Shimogama, M. Hara, *Rad. Phys. Chem.* **2023**, 203, 110604. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2022.110604>

## ダンシル基を持つ蛍光グルコースの合成

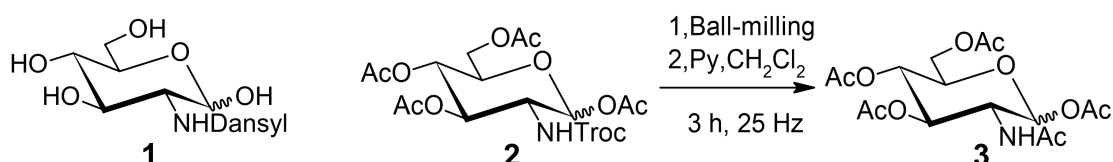
(愛知教大院教<sup>1</sup>・愛知教大<sup>2</sup>)○BADA RONGGUI<sup>1</sup>・鳥居 朔弥<sup>2</sup>・柳田 滯<sup>1</sup>・上野 裕則<sup>2</sup>・中野 博文<sup>2</sup>

Synthesis of fluorescent glucose with dansyl group (<sup>1</sup>Graduate School of Aichi University of Education, <sup>2</sup>Aichi University of Education) ○BaDa RongGui<sup>1</sup>, Sakuya Torii<sup>2</sup>, Mio Yanagida<sup>1</sup>, Hironori Ueno<sup>2</sup>, Hirofumi Nakano<sup>2</sup>

Although glucose is an important energy source for living organisms, its transport and localization within living cells, glucose metabolism, and their mechanisms have not been completely elucidated. In this study, we synthesized glucose analogs labeled with a dansylamino group at the 1- or 2- position. Using glucosamine hydrochloride as a starting material, the 2-position of **2** was protected with a Troc group and acetylated with acetic anhydride to give **2**. A ball mill was used to investigate the novel deprotection of the 2-position of compound **2**. Thereafter, the 2-position was reacted with dansyl chloride, then deprotected the acetyl group to yield compound **1**.

**Keywords** : Fluorescent Glucose; Ball Mill

グルコースは生物にとって重要なエネルギー源でありながらも、生細胞内での輸送と局在化、グルコースの代謝とそれらのメカニズムについて完全には解明されていない。本研究では、1位あるいは2位にダンシルアミノ基で標識されたグルコース類似体を合成した。ダンシルアミノ基は分子サイズが比較的小さく、ストークスシフトが長く環境変化に対する感度が高く、光安定性が良好であり、蛍光の色が環境に依存して青緑、緑、黄色、オレンジなど様々に変化することが知られている。グルコサミン塩酸塩を原料とし、2位を Troc 基で保護し、無水酢酸でアセチル化し **2** を得た。化合物 **2** の2位の新奇な脱保護の検討にボールミルを用いた。その後ダンシルクロリドと2位を反応させ、アセチル基を脱保護し化合物 **1** を得た。



1) Yanagida M, Nakano H, Ueno H. Bioimaging of glucose analogs labeled at the C-1 or C-2 position with a fluorescent dansylamino group. *Microscopy (Oxf)*. **2024**, 73, 47-54.

## DDS キャリアとしての pH 応答型膜融合性マラカイトグリーン含有リポソーム

(奈良高専物質工) ○上垣 菜春・宇田亮子

Fusogenic liposomes containing pH-responsive malachite green as a DDS carrier (*Department of Chemical Engineering, National Inst. of Tech., Nara College*) ○Nanoha Uegaki, Ryoko Uda

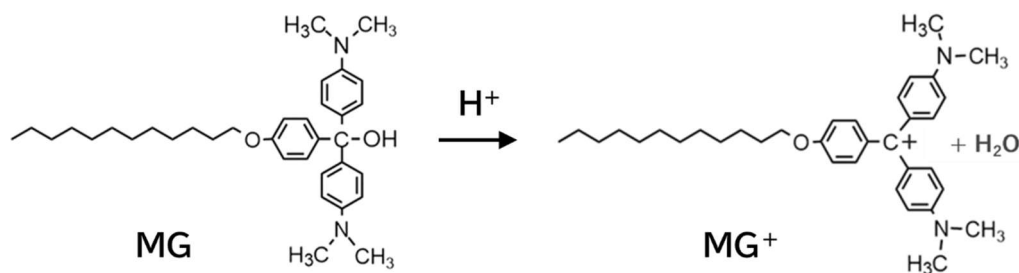
Malachite green carrying a long alkyl chain (MG) is ionized to become an amphiphilic molecule under acidic conditions (Scheme). After liposomes containing MG are endocytosed, MG expected to be  $\text{MG}^+$  in an endosomal acidic environment.  $\text{MG}^+$  disrupts the liposome membrane and induces membrane fusion which leads drug to escaping from endosome.

The purpose of this study is to evaluate MG liposome as a DDS carrier. We prepared MG liposomes encapsulating anticancer drug and investigated the viability of cancer cells treated with MG liposomes encapsulating anticancer drug. The results of cell viability indicate that the drug was delivered efficiently to cytoplasm by using MG liposome.

**Keywords :** fusogenic; liposome; pH; malachite green; drug delivery system

長鎖アルキル基を有するマラカイトグリーン(MG)は、酸性環境下でイオン化し両親媒性分子となる (Scheme)。この分子を含有させたりポソーム(MG リポソーム)はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内の酸性環境下でイオン化して  $\text{MG}^+$  となる。 $\text{MG}^+$  はリポソーム膜を乱しエンドソーム膜との膜融合を誘起させると考えられる。このように MG によって膜融合を誘発させることで、薬物を細胞質へ効率よく放出させる脱エンドサイトーシス経路での薬物送達システムの構築が期待できる。

本研究では、抗がん剤を封入した MG リポソームを調製し、がん細胞へ添加した際の細胞生存率から DDS キャリアとしての評価を行った。MG を含有させたりポソームを用いることで効果的に薬剤が送達されていることが示された。



**Scheme** Ionization of malachite green carrying a long alkyl chain (MG) induced by acidic conditions.

## 小児がんマーカーのバニリルマンデル酸計測用ペーパー分析デバイスの開発

(広島市大院情報) ○貞光 裕貴・後藤 真司・釘宮章光

Development of a Paper-Based Analytical Device for Pediatric Cancer Marker, Vanillylmandelic acid (*Graduate School of Information Sciences, Hiroshima City University*)

○Yuuki Sadamitsu, Shinji Goto, Akimitsu Kugimiya

Among the current pediatric cancers, neuroblastoma has been less studied for treatment than other cancers and does not show early symptoms, so quick and easy detection methods are strongly desired [1]. Currently, HPLC is the main testing method, and although it can accurately measure individual substances, it is costly and requires complicated procedures. Therefore, the VMA spot method, which is a simple and accurate method to measure the total amount of catecholamines including vanillylmandelic acid (VMA), is currently under review as a diagnostic method for neuroblastoma. We have developed a paper device that can measure compounds such as amino acids in a simple manner [2], and in this study, we fabricated a paper device that can measure VMA using paper as the analysis medium and evaluated its response. The diameter of the filter paper used in the paper device and the reaction time were investigated in detail, and stable coloration without unevenness was observed when the diameter of the filter paper was set to 3 mm or 4 mm. In addition, evaluation of the paper device developed in the concentration range of 1~1000 mg/L of VMA showed that VMA concentrations ranging from 10~1000 mg/L could be measured in a reaction time of about 5 minute.

**Keywords :** *Paper Microfluidic Device; Pediatric Cancer; Marker; Vanillylmandelic Acid; Colorimetric Reaction*

現状の小児がんの中で、神経芽腫はその他のがん比べて治療法の研究が進んでおらず初期症状が出ないことから早期発見の手法が強く望まれている[1]。現在は HPLC を用いる検査法が主流であり、個々の物質を正確に計測可能であるがコストが高く複雑な手順が必要とされる。そこでバニリルマンデル酸 (VMA) を含むカテコールアミン類のトータル量として簡便かつ正確に計測可能な VMA スポット法が現在、神経芽腫の診断法として見直されている。我々はこれまでにアミノ酸などの化合物を簡易に計測可能なペーパーデバイスの開発を行っており[2]、本研究では紙を分析媒体に用いる VMA を計測可能なペーパーデバイスを作製し、応答を評価することを目的に研究を行った。ペーパーデバイスに用いるろ紙の直径や反応時間等について詳細に検討を行ったところ、ろ紙の直径を 3 mm または 4 mm に設定したとき色むらのない安定した呈色が見られた。また、VMA を 1~1000 mg/L の濃度域で開発したペーパーデバイスの評価を行ったところ、5 分程度の反応時間で 10~1000 mg/L までの濃度の VMA が計測可能であることを示した。

[1] がん情報サービス <https://ganjoho.jp/public/cancer/neuroblastoma/index.html>

[2] A. Kugimiya, et al., *Scientific Reports*, (2022) 12:3427

## 合成低分子 TLR7 リガンドを用いたナノ粒子アジュバントシステムの開発

(鹿大院理工<sup>1)</sup>) ○堤 萌夏・若尾 雅広・新地 浩之

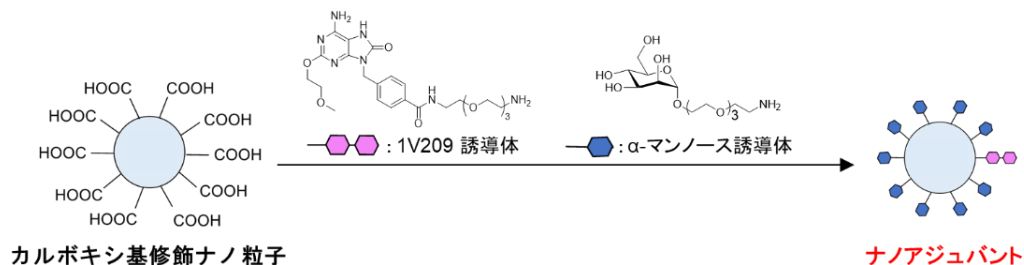
Development of a nanoparticle adjuvant system with a synthetic small molecule TLR7 ligand  
(Graduate School of Engineering, Kagoshima University) ○Moeka Tsutsumi, Masahiro Wakao, Hiroyuki Shinchichi

Synthetic small molecule TLR7 ligands that activate the innate immune system are expected to be adjuvants for vaccines and immunotherapy. However, their use as adjuvants has not been approved due to the risk of inducing severe adverse events. In this study, we investigated the development of a novel adjuvant system using sugar-functionalized nanoparticles to improve the pharmacokinetics and pharmacological potency of a small molecule TLR7 ligand. Carboxylated gold and silica nanoparticles were examined as nanoparticles. Amino groups were introduced into TLR7 ligand (1V209) and mannose via oligoethylene glycol and these were conjugated to nanoparticles by amide coupling. The potency of the resulting nanoparticles was evaluated in mouse bone marrow-derived dendritic cells.

**Keywords :** TLR ligand; Adjuvant; Nanoparticles

自然免疫を活性化する合成低分子 TLR7 リガンドは、その高い免疫賦活作用から、感染症ワクチンやがん免疫療法のアジュバントとしての利用が期待されている。しかし、全身投与すると重篤な副反応を誘発する恐れがあり、アジュバントとして利用されていない。本研究では、低分子 TLR7 リガンドの薬物動態や薬物効果を改善するために、ナノ粒子を活用したアジュバントシステムの開発について検討した。

ナノ粒子成分には、カルボキシル基修飾された金ナノ粒子およびシリカナノ粒子を検討した。これらのナノ粒子表面には、合成低分子 TLR7 リガンドの 1V209<sup>1)</sup>に加え、ナノ粒子の水分散性と免疫細胞選択性を高める糖分子であるマンノースを修飾した<sup>2)</sup>。1V209 の安息香酸部分およびマンノースの 1 位に、オリゴエチレングリコール鎖を介してアミノ基を導入し、ナノ粒子表面のカルボキシ基に縮合して 1V209 およびマンノースを修飾したナノ粒子を得た。得られたナノ粒子は、マウス骨髄由来樹状細胞を用いて免疫賦活活性を評価し、アジュバントとしての有用性を検討した。



1) Chan M., et al., *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20, 1194-1200. 2) Shinchichi, H., Yamaguchi, T., et al., *Bioconjugate Chem.*, **2019**, 30(11), 2811-2821.

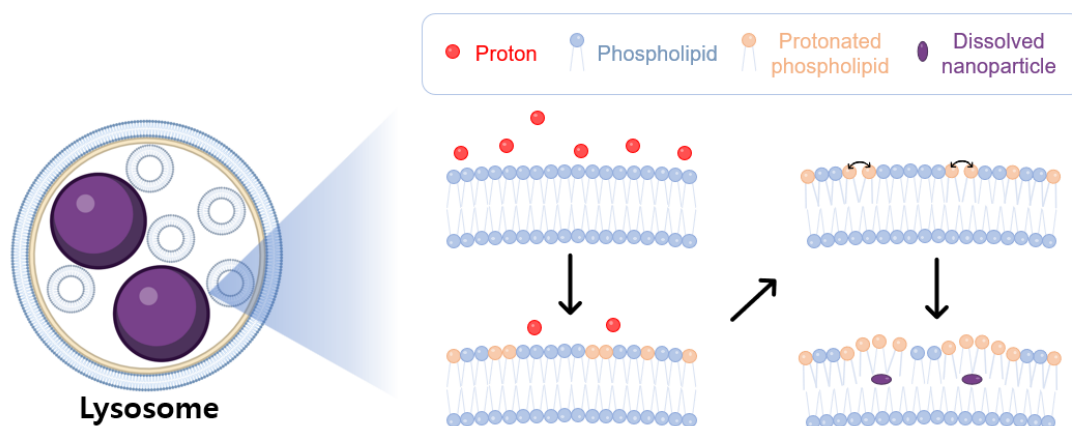
## Unveiling the intracellular dissolution mechanism of carrier-free organic nanoparticle

(<sup>1</sup>Tohoku University, <sup>2</sup>Hokkaido University, <sup>3</sup>Sendai KOSEN, <sup>4</sup>KU Leuven, <sup>5</sup>Kyoto University)

○ Jinwoo Sung<sup>1</sup>, Farsai Taemaitree<sup>2</sup>, Ryuju Suzuki<sup>3</sup>, Yoshitaka Koseki<sup>1</sup>, Hiroshi Uji-i<sup>2,4</sup>, Atsushi Wakamiya<sup>5</sup>, Hitoshi Kasai<sup>1</sup>

**Keywords:** Nanomedicine, Lysosome, Intracellular dynamics, Liposome

The recent surge of interest in carrier-free organic nanoparticles can be attributed to two features: high drug loading capacity (about 80%<sup>1</sup>) compared to currently applied nanocarrier system (drug loading capacity lower than 10%) and applicability of failed highly hydrophobic drug candidates. Given their nanoscale size, there have been many attempts to utilize these nanoparticles as anticancer nanodrugs due to tumor selectivity supported by enhanced permeability and retention effect (EPR effect). However, comprehending the intracellular degradation mechanism of carrier-free organic nanoparticles, which is a crucial aspect of drug design, remains a significant challenge. We previously reported that the initial step of intracellular degradation of organic nanoparticles is dissolution occurs in lysosome<sup>2</sup>, but the mechanism is still unclear. Hereby we demonstrate the dissolution mechanism of organic nanoparticles in lysosomes, utilizing highly emissive organic materials both in solid and solution states<sup>3</sup> as a fluorescence resonance energy transfer (FRET) probe. We designed *in vitro* model mimicking lysosome and conducted quantitative and qualitative analysis utilizing Cryo-TEM, electron energy loss spectroscopy (EELS) and other various fluorescence monitoring tools. *In vivo* imaging was also conducted. Our findings indicate that acidic condition and phospholipid bilayer within lysosomes are two key factors of the dissolution of organic nanoparticles. This new finding removes the barriers of ignorance found in drug discovery and can be applied across various chemistry fields including surface chemistry.



- 1) K. Tanita *et al.*, *Nanoscale*, **2024**, 16, 15256. 2) F. Taemaitree *et al.*, *Nanoscale*, **2020**, 12, 16710.  
3) A. Wakamiya *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4273.

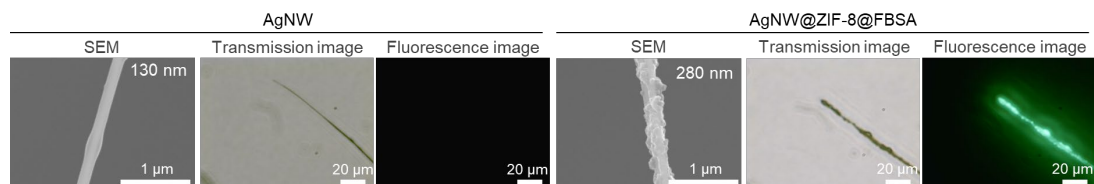
## Integration of metal-organic frameworks with nanoendoscopy for intracellular delivery of unstable biomolecules

(<sup>1</sup>Graduate School of Engineering, Kyoto University, <sup>2</sup>Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, <sup>3</sup>The Hakubi Center, Kyoto University, <sup>4</sup>JST PRESTO) ○ Kai Huang,<sup>1,2</sup> Tomoko Inose,<sup>1,2,3,4</sup> Shuhei Furukawa<sup>1,2</sup>

**Keywords:** Nanowire Single Live-Cell Endoscopy; Metal-Organic Frameworks; Intracellular Protein Delivery; Biomimetic Mineralization

Proteins and other biomacromolecules are known to regulate cellular changes at the molecular level due to their lower immunogenicity, high target specificity and potency, which makes them ideal for intracellular delivery in understanding cellular processes and exploring biomedical applications.<sup>1</sup> However, the intracellular delivery of biomacromolecules sometimes remains challenging due to its susceptibility to enzymatic degradation and instability within cells.<sup>2</sup> Herein, we designed a novel delivery system by integrating a biomimetic mineralization strategy using metal-organic frameworks (MOFs)<sup>3</sup> with nanowire endoscopy technique.<sup>4</sup> This novel system has a great potential to achieve the efficient and stable delivery of unstable biomacromolecules including RNA into a single live cell.

To achieve our objectives, we selected zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8, [Zn(MeIm)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>, where MeIm is 2-methylimidazole), as the MOF model due to its pH-sensitive properties. Previous reports have demonstrated that ZIF-8 can encapsulate biomolecules, such as proteins, and release them inside cells by responding to the intracellular pH environment.<sup>5</sup> We optimized the coating conditions for ZIF-8 to encapsulate fluorescein-labeled bovine serum albumin (FBSA) on a silver nanowire. FBSA was used as a model biomacromolecule. The successful coating of ZIF-8 containing FBSA on the nanowire (AgNW@ZIF-8@FBSA) was confirmed using SEM and fluorescence imaging as shown in Figure. Then we investigated the pH-dependent degradation of ZIF-8 on the nanowire by monitoring changes in fluorescence intensity. A gradual decrease in fluorescence intensity was successfully observed, indicating the degradation of ZIF-8. We will also present experimental results on the intracellular delivery of FBSA using the AgNW@FBSA@ZIF-8 system.



- 1) R. Langer *et al*, *Chem. Rev.* **2018**, 118, 7409.
- 2) D. Tollervey *et al*, *Cell* **2009**, 136(4), 763.
- 3) P. Falcaro *et al*, *Nat. Commun.* **2015**, 6, 7240.
- 4) T. Inose *et al*, *Anal. Chem.* **2021**, 93, 5037.
- 5) P. Falcaro *et al*, *Adv. Mater.* **2019**, 31(27), 1901592.