

2024年9月12日(木)

A会場

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：荘司 長三（名古屋大学）

09:30 ～ 10:30 A会場 (大会議室101)

[10A-01] リガンド指向性化学とクリックケミストリーの連動によるグルタミン酸受容体を基体としたプロテアーゼセンサーの脳内構築

*坂本 清志^{1,2}、白岩 和樹¹、王 萌初¹、野中 洋^{1,2}、浜地 格^{1,2}（1. 京都大学大学院工学研究科、2. JST ERATO）

09:30 ～ 09:50

[10A-02] Tau由来ペプチド融合光応答性タンパク質による微小管集合構造の光制御

*稲葉 央¹、渡 宗英¹、角五 彰²、松浦 和則¹（1. 鳥取大学大学院工学研究科、2. 京都大学大学院理学研究科）

09:50 ～ 10:10

[10A-03] 二置換シクロプロパンの Stereodivergent合成を目的とした微生物ヘム依存性酵素の探索

*加藤 俊介¹、竹内 康基¹、梅田 康平¹、林 高史¹（1. 大阪大学大学院工学研究科）

10:10 ～ 10:30

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：友重 秀介（東北大学）

10:40 ～ 12:00 A会場 (大会議室101)

[10A-04] Neonatal Fc受容体-抗体医薬品相互作用の分子基盤解明

*木吉 真人¹、鈴木 琢雄¹、井上 成彰²、寺尾 陽介²、長門石 曉³、井出 輝彦²、津本 浩平³、石井 明子¹（1. 国立医薬品食品衛生研究所、2. 東ソー株式会社、3. 東京大学大学院工学系研究科）

10:40 ～ 11:00

[10A-05] 生細胞と生体内でのチロシンナーゼ近傍ラベリングの開発

*朱 浩¹、呉 在訓²、松田 侑奈¹、美野 丈晴¹、野中 洋^{1,2}、浜地 格^{1,2}（1. 京都大学、2. JST ERATO）

11:00 ～ 11:20

[10A-06] 酵素反応を用いた部位特異的脂質化抗体の合成とその応用

*高原 茉莉¹、渡邊 和則¹、大槻 高史¹、神谷 典穂²（1. 岡山大学学術研究院ヘルスシステム統合科学学域、2. 九州大学大学院工学府）

11:20 ～ 11:40

[10A-07] かご型金属錯体の孤立空間への閉じ込めによる過渡的なタンパク質-リガンド複合体の構造解析

*中間 貴寛¹、田所 美璃¹、Liu Hongkun¹、矢木 真穂^{2,3}、加藤 晃一^{2,3}、藤田 誠^{1,3,4}（1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 名古屋市立大学大学院薬学系研究科、3. 分子科学研究所、4. 東京大学国際高等研究所）

11:40 ～ 12:00

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：大河内 美奈（東京工業大学）

15:10 ～ 16:30 A会場 (大会議室101)

[10A-08] 直列型ユビク キチン鎖の非酵素的修飾を介した標的タンパク質の分解経路制御

*古畑 隆史¹、吉田 和生¹、宮本 丈太郎¹、藤田 涼香¹、岡本 晃充¹（1. 東京大学大学院工学系研究科）

15:10 ～ 15:30

[10A-09] PQQ依存性脱水素酵素の酸化還元状態と分子内電子移動の解析

*武田 康太¹、五十嵐 圭日子²、中村 暢文³（1. 国立研究開発法人産業技術総合研究所、2. 東京大学農学部、3. 東京農工大学工学部）

15:30 ～ 15:50

[10A-10] *Methylosinus trichosporium* OB3bのランタノイドイオン存在下におけるグリセロールによる増殖阻害機構の解明

*伊藤 栄紘¹、椎名 渉¹、舘入 幹樹¹、蒲池 利章¹（1. 東京工業大学生命理工学院）

15:50 ～ 16:10

[10A-11] 原子間力顕微鏡を用いた細菌固定化タンパク質AtaAの特性解析

*吉本 将悟¹、笹原 純¹、堀 克敏¹（1. 名古屋大学大学院工学研究科）

16:10 ～ 16:30

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：林 剛介（名古屋大学）

16:40 ～ 17:40 A会場 (大会議室101)

[10A-12] 光可逆的蛋白質ラベル化システムの改良による細胞内蛋白質局在の精密制御

*小和田 俊行^{1,2}、佐藤 歳三²、濱口 聡志²、Saifudin Muhammad Wildan²、水上 進^{1,2}（1. 東北大多元研、2. 東北大院生命）

16:40 ～ 17:00

[10A-13] Proteomic and Functional Analysis of

Migrasomes in MDA-MB-231 Cells Under IL-6 Stimulation

*Ananda Bagus Richky Digdaya Putra¹, Shogo Saito¹, Masayoshi Tanaka¹, Mina Okochi¹ (1. Department of Chemical Science and Engineering, School of Material and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology)

17:00 ~ 17:20

[10A-14] 速度論選択的 HDAC2阻害薬の創製とその薬理効果

*伊藤 幸裕^{1,2}、東條 敏史²、黒原 崇^{1,2}、李 穎²、Singh Ritesh²、Narozny Remy¹、Van der Wiel Alexander²、三宅 由花^{1,2}、山下 泰信¹、内田 周作^{3,4}、鈴木 孝禎^{1,2} (1. 大阪大学産業科学研究所、2. 京都府立医科大学大学院医学研究科、3. 京都大学大学院医学研究科 メディカルイノベーションセンター、4. 名古屋市立大学大学院医学研究科)

17:20 ~ 17:40

B会場

一般口頭発表 | 糖・脂質

糖・脂質

座長：プラディプタ アンバラ (東京工業大学)

09:30 ~ 10:30 B会場 (大会議室102)

[10B-01] 巨大ベシクルへのトリアシルグリセロール液滴の導入：リン脂質二重膜の自発曲率の発生

*片岡 知歩¹ (1. 物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター)

09:30 ~ 09:50

[10B-02] 脂質固定化ビーズを用いた脂質特異的結合タンパク質の探索

*森藤 将之¹、秦 康祐²、和泉 自泰²、馬場 健史²、木下 祥尚¹、松森 信明¹ (1. 九州大学大学院理学院、2. 九州大学生体防御医学研究所)

09:50 ~ 10:10

[10B-03] リン脂質膜上における相分離ドメイン制御を基盤とした構造安定リン脂質チューブの設計

*内田 紀之¹、石坂 龍¹、河北 杏樹¹、奥村 正樹²、村岡 貴博^{1,3} (1. 東京農工大学、2. 東北大学際研、3. 神奈川県立産総研)

10:10 ~ 10:30

一般口頭発表 | 核酸関連

核酸関連

座長：神谷 由紀子 (神戸薬科大学)

10:40 ~ 12:00 B会場 (大会議室102)

[10B-04] SARS-CoV-2 RNA 上で形成するグアンニン四重鎖構造を標的とした低分子リカントの創製

*佐々木 捷悟^{1,2}、中嶋 章悟³、野原 玲奈¹、竹内 紀人¹、池袋 一典¹、長澤 和夫¹、渡士 幸一^{3,4}、寺 正行¹

(1. 東京農工大学大学院工学部、2. 奈良女子大学理学部、3. 国立感染症研究所、4. JST未来社会創造事業)

10:40 ~ 11:00

[10B-05] 医薬応用を指向した化学合成に基づく高度化学修飾 mRNAの創出

*木村 康明¹、岩井 宏徒²、本間 正一²、山田 浩貴²、中本 航介¹、稲垣 雅仁¹、橋谷 文貴¹、阿部 奈保子¹、山本 潤一郎²、阿部 洋^{1,3} (1. 名古屋大学大学院理学研究科、2. 協和キリン株式会社、3. 糖鎖生命コア研究所)

11:00 ~ 11:20

[10B-06] 遺伝子発現をホスト-ゲスト相互作用で制御可能な人工核酸の開発

*岡村 秀紀^{1,2}、矢尾 健行^{1,2}、永次 史^{1,2} (1. 東北大学多元物質科学研究所、2. 東北大学大学院理学研究科)

11:20 ~ 11:40

[10B-07] In-cell NMR法によるヒト細胞内における HIV Tat捕捉 RNAアプタマーと標的分子との相互作用の解析

*山置 佑大^{1,2}、Eladl Omar^{1,2}、近藤 敬子¹、永田 崇^{1,2}、片平 正人^{1,2} (1. 京都大学エネルギー理工学研究所、2. 京都大学エネルギー科学研究科)

11:40 ~ 12:00

一般口頭発表 | 核酸関連

核酸関連

座長：愛場 雄一郎 (名古屋大学)

15:10 ~ 16:30 B会場 (大会議室102)

[10B-08] 3脚型キノン-シアニン色素の光増感活性によるガン細胞選択的アポトーシス誘導

*村元 順哉¹、坂本 隆^{1,2} (1. 和歌山大学システム工学研究科、2. 和歌山大学システム工学部)

15:10 ~ 15:30

[10B-09] 非環状型 XNAの化学的鎖伸長反応のメカニズム解析と高効率化

*村山 恵司¹、沖田 ひかり¹、浅沼 浩之¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科)

15:30 ~ 15:50

[10B-10] Ru錯体からの三重項エネルギー移動を利用した部位特異的 DNA光架橋

*樫田 啓¹、東 秀憲¹、五月女 光²、宮坂 博²、浅沼 浩之¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 大阪大学大学

院基礎工学研究科)
15:50 ~ 16:10

[10B-11] 人工リボ スwitchの開発と無細胞合成生物学への応用
*福永 圭佑^{1,6}、石井 裕太²、大谷 俊貴²、寺本 岳大³、中島 ももか³、勝木 陸⁴、クーニー エイリ^{1,5}、角田 佳充³、横林 洋平⁶、松浦 友亮¹ (1. 東工大ELSI、2. 東工大院生命理工、3. 九大院農、4. 電通大院情報理工、5. インペリアル・カレッジ・ロンドン、6. OIST)
16:10 ~ 16:30

一般口頭発表 | ペプチド

ペプチド
座長：森本 淳平（東京大学）
16:40 ~ 17:40 B会場 (大会議室102)

[10B-12] 化学反応の選択性を制御する機能的アミロイド
*澤崎 鷹¹、村井 颯馬¹、山本 快¹、佐々木 大輔¹、相馬 洋平¹ (1. 和歌山県立医科大学薬学部)
16:40 ~ 17:00
[10B-13] コアセルベート形成のための抗体スキャホールド創製と抗体の細胞内送達
*川口 祥正¹、清川 めぐみ¹、二木 史朗¹ (1. 京都大学化学研究所)
17:00 ~ 17:20

[10B-14] 保護基の使用を最少化する逆伸長型ペプチド合成法
*翼 俊文¹、笹本 晃生¹、松本 拓也¹、平野 遼¹、及川 和輝¹、中野 真人²、吉田 勝²、*生長 幸之助^{1,2}、金井 求¹ (1. 東京大学大学院薬学系研究科、2. 産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター)
17:20 ~ 17:40

C会場

一般口頭発表 | DDS

DDS
座長：若林 里衣（九州大学）
09:30 ~ 10:30 C会場 (中会議室202)

[10C-01] クリックケミストリーの温度制御による高分子ミセルのデリバリー
*山田 創太¹、花岡 健二郎¹ (1. 慶應義塾大学大学院薬学研究科)
09:30 ~ 09:50
[10C-02] ナノ粒子ディップコート法による生体膜ハイブリッドの創製
*佐々木 善浩¹、水田 涼介²、右京 慶吾¹、澤田 晋一³、秋吉 一成⁴、金尾 英佑⁵、石濱 泰⁵、横山 達大^{1,6}、原

田 浩之⁶ (1. 京都大学大学院工学研究科、2. スクリプス研究所、3. 千葉大学sSIMVa、4. 京都大学大学院医学研究科、5. 京都大学大学院薬学研究科、6. 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)
09:50 ~ 10:10

[10C-03] 抗体部位特異的修飾技術と組織移行性抗体 AccumBody®を使った標的組織への薬物送達技術
*伊東 祐二¹、吉矢 拓²、香月 康宏³、富塚 一磨⁴ (1. 鹿児島大学大学院理工学研究科理学専攻、2. 株式会社ペプチド研究所、3. 鳥取大学医学部生命化学科、4. 東京薬科大学生命科学部)
10:10 ~ 10:30

一般口頭発表 | DDS

DDS・環境バイオ
座長：寺井 琢也（東京大学）
10:40 ~ 12:00 C会場 (中会議室202)

[10C-04] クリックカブルな二反応性金ナノクラスターの合成と赤色光誘導アンケーシングへの応用
*渡邊 賢司^{1,2}、Mao Qiyue³、Zhang Zhouen²、畑 真知³、山本 康友¹、小寺 政人³、北岸 宏亮³、丹羽 節^{2,4,5}、細谷 孝充^{2,5} (1. 同志社女子大学薬学部、2. 理化学研究所生命機能科学研究センター、3. 同志社大学理工学部、4. 九州大学大学院薬学研究院、5. 東京医科歯科大学生体材料工学研究所)
10:40 ~ 11:00
[10C-05] 抗体の表面修飾による OLE-ZIP 蛋白質カプセルベースの蛋白質医薬品の送達手法の検討
*水野 稔久¹、高橋 孝介¹、西山 泰貴¹ (1. 名古屋工業大学大学院工学研究科)
11:00 ~ 11:20

[10C-06] 抗原タンパク質修飾ペプチド超分子によるワクチン効果の評価
*若林 里衣¹、難波江 友紀¹、樋口 亜也斗¹、神谷 典穂^{1,2}、後藤 雅宏^{1,2} (1. 九州大学大学院工学研究院、2. 九州大学未来化学創造センター)
11:20 ~ 11:40

[10C-07] 土壌細菌内シトクロム P450の基質誤認識に基づく芳香族性化合物の微生物分解
*伊藤 史哉¹、有安 真也¹、唐澤 昌之¹、笠井 千枝¹、愛場 雄一郎¹、荘司 長三¹ (1. 名古屋大学大学院理学研究科)
11:40 ~ 12:00

一般口頭発表 | 分析・計測・センサーデバイス

分析・計測・センサーデバイス

座長：舟橋 久景（広島大学）
15:10 ～ 16:30 C会場 (中会議室202)

[1OC-08] アミノペプチダーゼ活性を可視化する超偏極MRI分子プローブの多様化戦略とがん診断への展開

*齋藤 雄太郎¹、谷田部 浩行¹、子安 憲一²、高草木 洋一³、齋藤 圭太³、山本 和俊²、Krishna Murali C.²、山東 信介¹（1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 米国国立衛生研究所、3. 量子科学技術研究開発機構）

15:10 ～ 15:30

[1OC-09] pH応答性電荷反転型曲率認識ペプチドを利用した細胞外小胞のキャッチ&リリース単離法の開発

*河野 健一¹、葛馬 佑樹¹、吉尾 航一¹、細川 健太¹、大杉 悠斗¹、藤原 敬宏²、横山 文秋³、松崎 勝巳¹（1. 京都大学大学院 薬学研究科、2. 京都大学 WPI-iCeMS、3. 東京大学大学院 理学系研究科）

15:30 ～ 15:50

[1OC-10] 糖鎖高分子インターフェイスを用いた非レクチンのタンパク質検出

*寺田 侑平¹、青木 寛¹（1. 産業技術総合研究所環境創生研究部門）

15:50 ～ 16:10

[1OC-11] 凍結組織切片内生体小分子の迅速イメージング、及び組成解析

*西原 達哉¹、塚目 莉加¹、鈴木 我空¹、菅原 優美佳¹、西田 光輝¹、田邊 一仁¹（1. 青山学院大学理工学部）

16:10 ～ 16:30

一般口頭発表 | メディカルバイオ

メディカルバイオ

座長：蓑島 維文（大阪大学）
16:40 ～ 17:40 C会場 (中会議室202)

[1OC-12] Surface Modification of an Algal Cell with Elongated DNA Strands to Control Loading and Releasing of Cationic Materials

*YINGQI MU¹、Yuseke Yonamine²、Hideyuki Mitomo²、Kuniharu Ijima²（1. Graduate School of Life Science, Hokkaido University, 2. Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University (RIES, Hokkaido Univ.))

16:40 ～ 17:00

[1OC-13] 内在性アクロレインの[4+4]付加環化反応を利用したがん細胞内での無触媒ポリマー合成研究とがん検出への展開

*川口 慎司¹、石渡 明弘²、プラディプタ アンバラ¹、田

中 克典^{1,2}（1. 東京工業大学物質理工学院、2. 理化学研究所開拓研究本部田中生体機能合成化学研究室）

17:00 ～ 17:20

[1OC-14] ルテニウムポリピリジル錯体のトリプルネガティブ乳がんに対する暗所条件下における細胞毒性

*石田 齊¹、原 愛美¹、田中 宏一¹、小柳 恵理²、佐藤 伸一²、平田 佳之³（1. 関西大学 化学生命工学部、2. 東北大学 学際科学フロンティア研究所、3. 大阪医科大学 薬学部）

17:20 ～ 17:40

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：荘司 長三（名古屋大学）

2024年9月12日(木) 09:30 ～ 10:30 A会場 (大会議室101)

[10A-01] リガンド指向性化学とクリックケミストリーの連動によるグルタミン酸受容体を基体としたプロテアーゼセンサーの脳内構築

*坂本 清志^{1,2}、白岩 和樹¹、王 萌初¹、野中 洋^{1,2}、浜地 格^{1,2}（1. 京都大学大学院工学研究科、2. JST ERATO）

09:30 ～ 09:50

[10A-02] Tau由来ペプチド融合光応答性タンパク質による微小管集合構造の光制御

*稲葉 央¹、渡 宗英¹、角五 彰²、松浦 和則¹（1. 鳥取大学大学院工学研究科、2. 京都大学大学院理学研究科）

09:50 ～ 10:10

[10A-03] 二置換シクロプロパンの Stereodivergent 合成を目的とした微生物ヘム依存性酵素の探索

*加藤 俊介¹、竹内 康基¹、梅田 康平¹、林 高史¹（1. 大阪大学大学院工学研究科）

10:10 ～ 10:30

リガンド指向性化学とクリックケミストリーの連動によるグルタミン酸受容体を基体としたプロテアーゼセンサーの脳内構築

○坂本清志^{1,2}・白岩和樹¹・王萌初¹・野中洋^{1,2}・浜地格^{1,2}(¹京大院工、²JST ERATO)

Construction of AMPA receptor based protease sensor by a combination of in-brain LDAI chemistry and IEDDA click reaction (Graduate School of Engineering, Kyoto Univ.¹, JST ERATO²) SAKAMOTO, Seiji^{1,2}; SHIRAIWA, Kazuki¹; WANG, Mengchu¹; NONAKA, Hiroshi^{1,2}; HAMACHI, Itaru^{1,2}

脳内には様々な細胞外プロテアーゼが存在し、細胞外マトリックスやシナプス構成因子の切断を介して、神経突起伸長、シナプス形成、シナプス可塑性などに関与し、高次脳機能を支える重要な役割を果たしている。しかしながら、生きた動物の脳内で、どのプロテアーゼが、どこで、どのようなタイミングで活性化され機能しているかについての詳細は未だ不明な点が多い。本研究では、当研究室で開発した脳内リガンド指向性アシルイミダゾール (in-brain LDAI) 化学と逆電子要請型 Diels-Alder (IEDDA) クリック反応の組み合わせによって、生きたマウス脳内で、AMPA 型グルタミン酸受容体を基体とするプロテアーゼセンサーの構築を試みた (Figure 1) [1,2]。具体的には、LDAI 化学を用いて、生きたマウス脳内のグルタミン酸受容体に、trans-cyclooctene (TCO) 基と Alexa Fluor 555 (Ax555) を特異的に導入した。次の段階では、Alexa Fluor 647 (Ax647) と methylenetetrazine (MeTz) 基を付加した標的プロテアーゼ特異的な基質配列ペプチドを投与し、IEDDA クリック反応を介した迅速かつ選択的なラベル化を行なった。ラベル化された受容体に活性型プロテアーゼが近接した場合、基質ペプチドの切断を介して Ax555/Ax647 蛍光強度のレシオ値もしくは蛍光色素間の FRET 効率が変化するセンサー設計である。今回の報告では、脳内での発現が知られる Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) を標的として、生きたマウス脳内での MMP9 活性のマッピングに成功したのでその詳細について報告する。

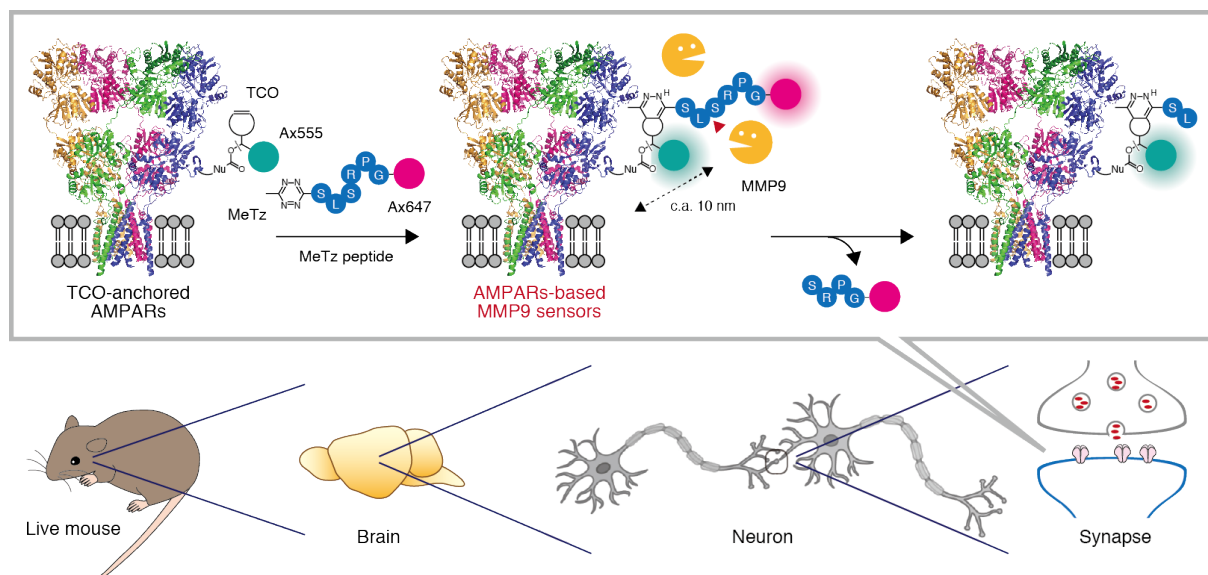


Figure 1. Construction of AMPA receptor based protease sensor by a combination of in-brain LDAI chemistry and IEDDA click reaction.

1. H. Nonaka and I. Hamachi *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **121**, 6:2313887121 (2024).
2. S. Sakamoto, H. Nonaka, I. Hamachi *et al.* doi: biorxiv.org/content/10.1101/2024.05.23.594618v1

Tau 由来ペプチド融合光応答性タンパク質による微小管集合構造の光制御

○稲葉央¹・渡宗英¹・角五彰²・松浦和則¹ (¹鳥取大院工、²京大院理)

Photocontrol of microtubule assembly by Tau-derived peptide-fused photoresponsive protein (Graduate School of Engineering, Tottori University¹, Graduate School of Science, Kyoto University²) INABA, Hiroshi¹; WATARI, Soei¹; KAKUGO, Akira²; MATSUURA, Kazunori¹

細胞骨格の一種である微小管はチューブリンからなるチューブ状のタンパク質集合体であり、アクティブマターの部品として広く用いられている。生体内では、微小管が束になったバンドルや横方向に連なったダブルレット、放射状に集合したアスターなどの複雑な集合構造を形成し、異なる機能を発揮している¹。これらの微小管集合構造を人工的に制御できれば、

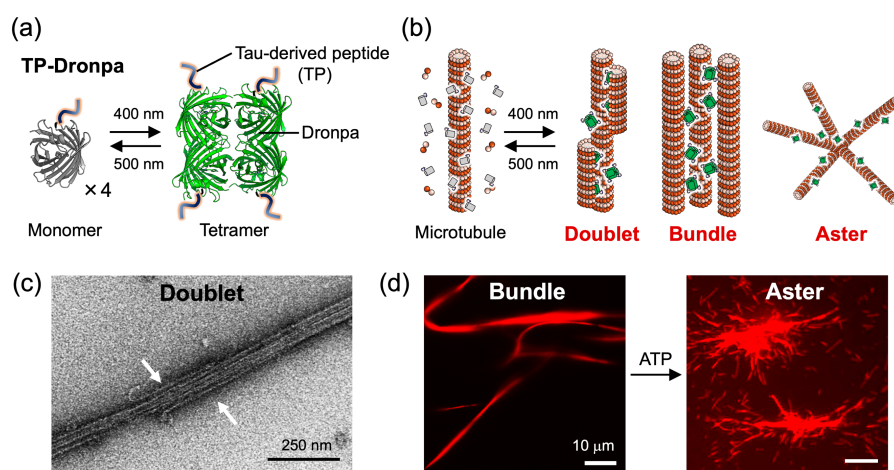


Fig. 1. (a) Tau-derived peptide (TP)-fused Dronpa (TP-Dronpa) and the photoconversion. (b) Photocontrol of microtubule assembly by binding of TP-Dronpa. (c) TEM image of TP-Dronpa-induced doublet microtubules. (d) Formation of TP-Dronpa-associated microtubule bundles and ATP-driven asters observed by fluorescence microscopy.

材料応用への展開が期待できる。天然の微小管集合構造は微小管外部へのタンパク質の結合により形成されていることから、タンパク質の結合を制御することで微小管の集合構造を制御できると考えられる。我々は微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド (TP) を開発し、様々なナノ構造体を微小管に内包することに成功している²。また、TP を四量体蛍光タンパク質 Azami-Green に融合することで、微小管外部への結合によりバンドルやダブルレットなどの微小管集合構造体の形成を報告している³。

本研究では、光刺激によりモノマー/テトラマー構造が切り替わる Dronpa の各サブユニットの C 末端に TP を融合した TP-Dronpa を開発し、微小管集合構造の光制御を試みた (Fig. 1a)。TP-Dronpa がモノマーの場合は微小管の集合構造は形成せず、テトラマーの場合は微小管同士を架橋し集合構造を形成すると期待される (Fig. 1b)。微小管形成後に TP-Dronpa を複合化すると、TP-Dronpa は主に微小管外部に結合することが共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察により明らかとなった。TP-Dronpa 複合化微小管を透過型電子顕微鏡により観察したところ、TP-Dronpa がモノマーの場合は通常のみが観察されたのに対し、テトラマーの場合はバンドル構造やダブルレット構造が観察された (Fig. 1c)。蛍光顕微鏡観察においても同様に、TP-Dronpa がモノマーの場合は分散した微小管が、テトラマーの場合はバンドル化した微小管が確認され、これら微小管の構造は光刺激により制御可能であった。モータータンパク質であるキネシンを固定した基板上で ATP 添加により微小管の運動を誘起すると、バンドル構造は解消されアスター構造へと変化した (Fig. 1d)。さらに、枯渇剤であるメチルセルロース存在下において、TP-Dronpa 複合化微小管への光刺激により微小管の集団運動を誘起することにも成功した。

1) C. Janke, M. M. Magiera, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2020**, 21, 307. 2) H. Inaba, K. Matsuura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2021**, 94, 2100 (Account). 3) H. Inaba¹, Y. Sueki¹, M. Ichikawa¹, A. M. R. Kabir, T. Iwasaki, H. Shigematsu, A. Kakugo, K. Sada, T. Tsukazaki, K. Matsuura, *Sci. Adv.*, **2022**, 8, eabq3817 (¹Equal contribution).

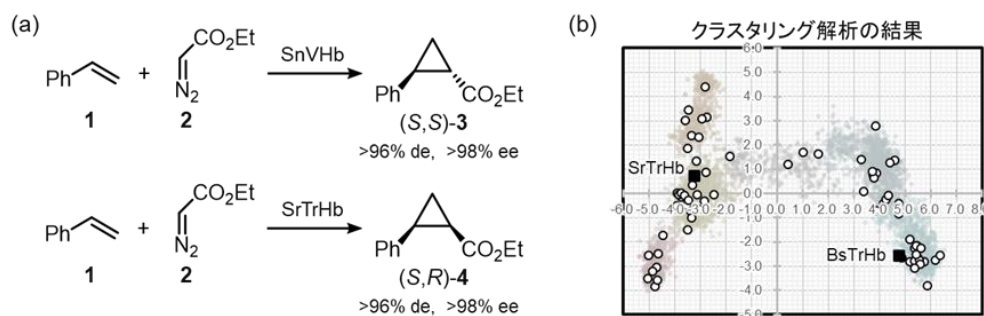
二置換シクロプロパンの Stereodivergent 合成を目的とした微生物 ヘム依存性酵素の探索

○加藤俊介・竹内康基・梅田康平・林高史（阪大院工）

Discovery of Heme-dependent Enzymes for Stereodivergent Synthesis of 1,2-Disubstituted Cyclopropanes
(Graduate School of Engineering, Osaka University) Shunsuke Kato; Koki Takeuchi; Kohei Umeda; Takashi Hayashi

昨今の著しいバイオテクノロジーの発展に伴い、酵素や微生物を用いた物質変換 (Biocatalysis) は、従来の化学合成プロセスを補完・代替する次世代の反応技術として注目を集めている。本研究では、Biocatalysis の有用性を非天然の物質変換反応へと拡張することをめざし、スチレンの非生物学的な立体選択的シクロプロパン化反応を触媒するヘム依存性酵素の探索を実施したので報告する。

アルケンのシクロプロパン化反応を自然界で行う酵素は未だ報告されていないが、進化工学的手法により改変されたシトクロム P450 変異体が、本反応に対し触媒活性を示すことが報告されている¹。本研究では、先行研究の進化工学のアプローチに捉われず、ゲノム探索的アプローチに基づき多種多様なヘム依存性酵素を網羅的に探索することで、高いシクロプロパン化活性を示すヘム依存性酵素を同定することをめざした。まず初めに、我々は、96 種類の微生物ヘム依存性酵素（グロビン、シトクロム P450、ペルオキシダーゼ、カタラーゼ等）から構成される遺伝子ライブラリを調製し、独自のタンパク質精製系を用いた *in vitro* 条件での酵素スクリーニングを実施した²。その結果、目的のシクロプロパン化反応に対して高い触媒活性を示す種々のヘム依存性酵素を同定することに成功した。中でも、グロビンフォールドを有する微生物由来のヘムタンパク質（以降、グロビン）は、他のヘムタンパク質と比較して特に高い触媒活性と立体選択性を示すことが判明した。例えば、硫黄酸化細菌 *Starkeya novella* 由来グロビン (SnVHb) は、非常に高い触媒活性 ($\text{TON} = 9.2 \times 10^4$, $k_{\text{cat}} = 4.9 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, $K_M = 3.4 \text{ mM}$) を示し、目的のシクロプロパン化生成物のうちトランス異性体 (*S,S*)-**3** を立体選択的 (>96% de, >98% ee) に与えた。また、放線菌 *Streptosporangium roseum* 由来のグロビン (SrTrHb) は、シス異性体 (*S,R*)-**4** を立体選択的 (>96% de, >98% ee) に与えることが分かった。シクロプロパン化生成物のうちシス異性体 **4** は、トランス異性体 **3** と比較して熱力学的に生成が不利なジアステレオマーであることから、シス異性体 (*S,R*)-**4** を立体選択的に与える本酵素の触媒活性は注目に値する。さらに、96 種類のヘム依存性酵素のスクリーニングの結果、枯草菌 *Bacillus subtilis* 由来のグロビン (BsTrHb) は、もう一方のトランス異性体 (*R,R*)-**3** に対して僅かな立体選択性 (89% de, 51% ee) を有することが判明した。そこで、BsTrHb の配列相同性検索とクラスタリング解析を実施し、枯草菌近縁種由来のグロビンの探索を行ったところ、(*R,R*)-**3** に対して良好な立体選択性 (91% de, 91% ee) を示す好熱性細菌 *Polycladomyces abyssicola* 由来のグロビン (PcaTrHb) を同定することにも成功した。



1. P. Coelho, *et al.*, *Science*, 339, 307-310 (2013)
2. S. Kato, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 62, e202303764 (2023)

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：友重 秀介（東北大学）

2024年9月12日(木) 10:40 ~ 12:00 A会場 (大会議室101)

[10A-04] Neonatal Fc受容体-抗体医薬品相互作用の分子基盤解明

*木吉 真人¹、鈴木 琢雄¹、井上 成彰²、寺尾 陽介²、長門石 暁³、井出 輝彦²、津本 浩平³、石井 明子¹（1. 国立医薬品食品衛生研究所、2. 東ソー株式会社、3. 東京大学大学院工学系研究科）

10:40 ~ 11:00

[10A-05] 生細胞と生体内でのチロシンナーゼ近傍ラベリングの開発

*朱 浩¹、呉 在訓²、松田 侑奈¹、美野 丈晴¹、野中 洋^{1,2}、浜地 格^{1,2}（1. 京都大学、2. JST ERATO）

11:00 ~ 11:20

[10A-06] 酵素反応を用いた部位特異的脂質化抗体の合成とその応用

*高原 茉莉¹、渡邊 和則¹、大槻 高史¹、神谷 典穂²（1. 岡山大学学術研究院ヘルスシステム統合科学学域、2. 九州大学大学院工学府）

11:20 ~ 11:40

[10A-07] かご型金属錯体の孤立空間への閉じ込めによる過渡的なタンパク質-リガンド複合体の構造解析

*中間 貴寛¹、田所 美璃¹、Liu Hongkun¹、矢木 真穂^{2,3}、加藤 晃一^{2,3}、藤田 誠^{1,3,4}（1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 名古屋市立大学大学院薬学系研究科、3. 分子科学研究所、4. 東京大学国際高等研究所）

11:40 ~ 12:00

Neonatal Fc 受容体-抗体医薬品相互作用の分子基盤解明

○木吉真人¹, 鈴木琢雄¹, 井上成彰², 寺尾陽介², 長門石曉³, 井出輝彦², 津本浩平³, 石井明子¹ (¹ 国立医薬品食品衛生研究所、² 東ソー株式会社、³ 東京大学大学院工学系研究科)

Engineered FcRn-immobilized column chromatography analysis revealed the molecular basis of the antibody-FcRn interaction (National Institute of Health Sciences¹, Tosoh Corporation², Graduate School of Engineering, The Univ. of Tokyo³) KIYOSHI, Masato¹; SUZUKI, Takuo²; INOUE Naruaki²; TERAOKA Yosuke²; SATOH Nagatoishi³; IDE, Teruhiko²; TSUMOTO Kouhei³; ISHII-WATABE Akiko¹.

新生児型 Fc 受容体 (neonatal Fc Receptor, FcRn) は、酸性条件下で抗体の Fc 部分に結合し、中性条件下で解離するため、リソソームにおける分解から抗体を保護する。これにより、FcRn は血管内皮細胞ではリサイクリング、上皮細胞ではトランスサイトーシスによって、抗体の輸送に関与することが知られている。これらの性質から、抗体医薬品の FcRn への親和性は、抗体医薬品の血中半減期、体内動態に関連する重要な品質特性である。抗体-FcRn 親和性には、Fc 部分のメチオニン残基の酸化や、pH など様々な要因が影響を及ぼすが、抗体一分子に対して FcRn 二分子で結合するため表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた親和性解析が困難な部分があることなどから、抗体-FcRn 間相互作用における分子基盤の解明が不十分であった。近年、血中半減期の延長を目的として、Fc 部分にアミノ酸変異を導入した抗体医薬品の開発、承認が相次いでいることから、抗体-FcRn 親和性創出の分子メカニズムの統合的理解は喫緊の課題となっている。

本研究では、リコンビナント FcRn を固定化したアフィニティーカラムを開発し、アフィニティークロマトグラフィーのピーク保持時間から抗体医薬品の FcRn 親和性を相対的に評価する手法を開発した。作製した FcRn カラムを用いて、Fc のメチオニン酸化によってピーク保持時間が変化する事、FcRn 親和性が向上/低下するアミノ酸変異によって、ピーク保持時間が顕著に変化することが明らかになった。さらに、FcRn に結合する部位 (Fc) のアミノ酸配列は同一であっても、抗体医薬品によって FcRn 親和性が異なる点に着目し、FcRn カラムを用いて多数の抗体医薬品の親和性解析を行った。その結果、特に L 鎖の荷電性アミノ酸の数、立体構造中における配置によって親和性が大きく異なることを明らかにした。

本研究によって、このカラムは抗体医薬品の品質特性を解析する手法として有用性が高いことが明らかとなった。また、本研究で得られた、抗体医薬品-FcRn 間相互作用の分子基盤に関する知見は、今後の抗体医薬品の品質評価、および抗体医薬品開発における重要な指針となると考えられる。

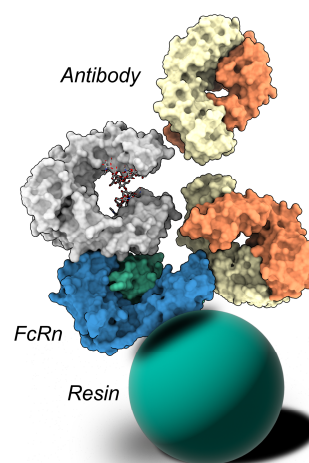


図 1. FcRn カラムの概略図

生細胞と生体内でのチロシンナーゼ近傍ラベリングの開発

○朱浩¹・呉在訓²・松田侑奈¹・美野丈晴¹・野中洋^{1,2}・浜地格^{1,2} (¹京都大学工学研究科、²JST ERATO)

Development of tyrosinase-based proximity labeling in living cells and *in vivo* (Graduate School of Engineering, Kyoto University¹, JST ERATO²) ZHU, Hao¹; OH, Jae Hoon²; MATSUDA, Yuna¹; MINO, Takeharu¹; NONAKA, Hiroshi^{1,2}; HAMACHI, Itaru^{1,2}

Characterizing the protein constituents of a specific organelle and protein neighbors of a protein-of-interest (POI) is essential for understanding the function and state of the organelle and protein networks associated with the POI. Proximity labeling (PL) has emerged as a promising technology for specific and efficient spatial proteomics. PL is defined as spatially limited promiscuous tagging of neighboring biomolecules (e.g., proteins) by an enzyme or photocatalyst. Proteins tagged with an enrichment handle (e.g., biotin) are then isolated and identified by mass spectrometry (MS), which reveals the proteome environment where the catalyst is anchored. PL has enabled characterization of a wide range of subcellular structures and protein networks in various cell types and species. Nevertheless, the enzymes most adopted for PL in biological research still have limitations: APEX requires cytotoxic H₂O₂ for activation and thus is poor in biocompatibility for *in vivo* application, BioID shows insufficient labeling kinetics, and TurboID suffers from high background biotinylation. Therefore, new enzymes are keenly desirable for the more flexible and broader application of PL.

Here, we introduce a bacterial tyrosinase (BmTyr) as a new PL enzyme suitable for H₂O₂-free, fast (≤ 10 min in living cells), and low-background protein tagging that is applicable to living cells and *in vivo*.¹ The *o*-quinone generated by BmTyr can broadly react with amino acids, including Cys, Lys, and His. BmTyr is genetically encodable in mammalian cells and enables subcellular-resolved PL in the nucleus, mitochondrion, and endoplasmic reticulum. Proteomics by H2B-fused BmTyr indeed revealed a major interaction network surrounding H2B. We further designed a strategy of ligand-tethered BmTyr for *in vivo* PL, in which BmTyr was conjugated with a small-molecule ligand that can anchor BmTyr to an endogenous POI. Proteomics after the *in vivo* PL identified the neighboring proteins of a neurotransmitter receptor (Grm1 and Drd2) in its resident synapse in a live mouse brain. Overall, BmTyr is one promising enzyme that can improve and expand the PL-based applications and discoveries.

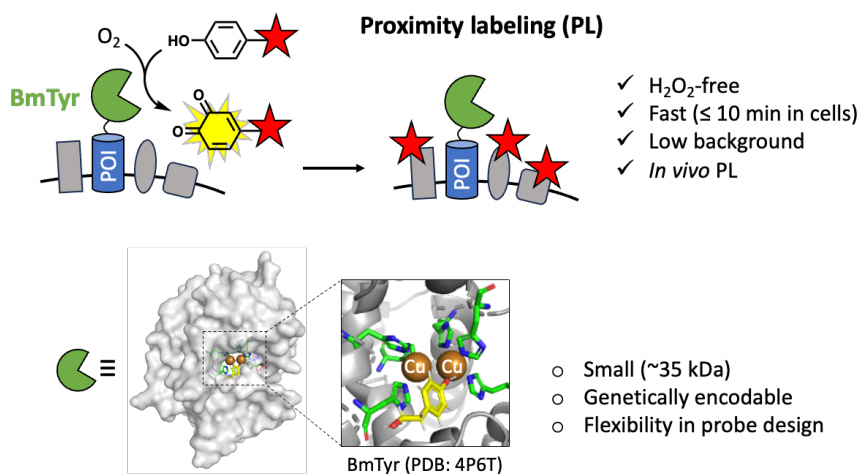


Figure 1 Schematic illustration of BmTyr-based proximity labeling.

1. H. Zhu, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 146, 11, 7515-7523 (2024).

酵素反応を用いた部位特異的脂質化抗体の合成とその応用

○高原茉莉¹・渡邊和則¹・大槻高史¹・神谷典穂² (¹岡山大学院統合科学、²九大院工)

Enzymatic synthesis of site-specifically lipidated antibody. (Grad. Sch. of Interdiscip. Sci. and Eng. in Health Sys., Okayama Univ.¹, Grad. Sch. of Eng., Kyushu Univ.²) TAKAHARA, Mari¹; WATANABE, Kazunori¹; OHTSUKI Takahashi¹; KAMIYA Noriho²

薬物送達においては、薬剤と標的指向部位を組み合わせたがん細胞特異的な抗腫瘍効果の発現が非常に重要である。特に近年、薬剤搭載量の高いリポソームに、標的指向部位となる抗体を係留したイムノリポソームが注目されている。リポソームに抗体を安定に係留するには、抗体への係留部位(脂質)の導入が有効である。抗体は、その高次構造

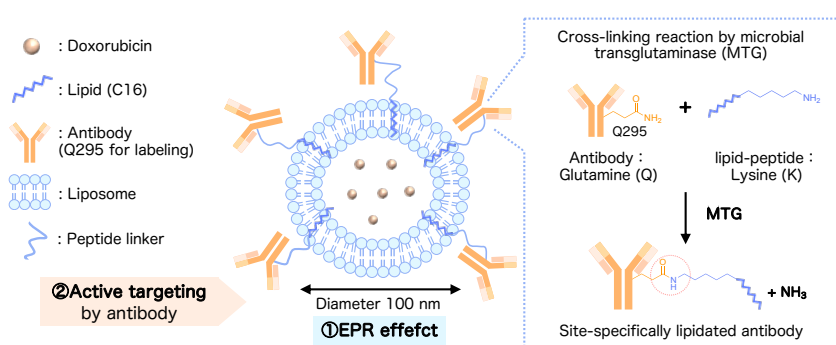


図 1. イムノリポソーム模式図および MTG による抗体への部位特異的な脂質化ペプチドの修飾スキーム。

保持して初めて分子認識能を発揮するため、抗体が変性しない条件で部位特異的に脂質修飾を施す必要がある。しかし、疎水性の高い脂質を、水溶性の抗体が変性しないように狙った部位で修飾するのは未だに困難で、抗体の機能をフル活用できる脂質修飾技術は未だに確立されていない。そこで本研究では、微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) の触媒機能と、その人工基質となる両親媒性脂質化ペプチドを用いて、部位特異的脂質化抗体を創製する (図 1)。

MTG とは特定のグルタミン (Q) とリジン (K) 側鎖間の架橋反応を触媒する酵素で、脱糖鎖後抗体の Q295 を認識可能と報告されている¹。MTG は天然抗体への Q295 特異的小分子修飾において実績があるが、MTG を用いた脂質化抗体合成の報告例はない。ここで、Her2 受容体に結合する trastuzumab をモデル抗体として、MTG を介して修飾可能な脂質化ペプチド基質の分子設計を行った。MTG を介したタンパク質の部位特異的脂質修飾で RHK 配列が MTG に認識されることに着目し²、脂質部位として C16 を導入した両親媒性の C16-linker-RHK (linker: PEG or G3S) を設計した。脂質化ペプチド、脱糖鎖酵素 PNGase、MTG を同時に抗体に添加したところ、PEG リンカーの場合のみ、抗体の重鎖における脂質修飾の達成が示唆された。C16-linker-RHK はいずれのリンカーにおいても β シートを形成することから、PEG リンカーの柔軟性により MTG 反応が可能になったことが示唆された。また、脂質修飾中の溶液にリポソームを添加しても MTG 反応が進行したことから、1 step でイムノリポソーム調製が可能なることも示唆された。

得られた脂質化 Alexa488-trastuzumab 及びイムノリポソームを、Her2 陽性の NCI-N87 細胞もしくは Her2 陰性の Hela 細胞に作用させたとこと、NCI-N87 細胞にのみ蛍光が観察され、脂質化抗体の機能損失を伴わずに Her2 受容体に結合したのを確認した。さらにリポソーム添加濃度に依存して蛍光強度が増加していることから、イムノリポソーム化により Her2 選択性が向上したと考えられる。

1. Dennler et al., *Bioconjug. Chem.* **2014**, 25, 569-578.

2. M. Takahara et al., *Bioconjug. Chem.*, **2021**, 32, 655-660.

かご型金属錯体の孤立空間への閉じ込めによる過渡的なタンパク質
-リガンド複合体の構造解析

○中間 貴寛¹・田所 美璃¹・劉 鴻琨¹・矢木 真穂^{2,3}・加藤 晃一^{2,3}・藤田 誠^{1,3,4}
(¹東大院工・²名市大院薬・³分子研・⁴東大国際高等研)

Structure analysis of transient protein–ligand complexes by confinement in metal coordination cages
(Graduate School of Engineering, The Univ. of Tokyo¹, Graduate School of Pharmaceutical Sciences², Nagoya City Univ., Institute for Molecular Science³, UTIAS, The Univ. of Tokyo⁴) NAKAMA, Takahiro¹; TADOKORO, Miri¹; LIU, Hongkun¹; YAGI-UTSUMI, Maho^{2,3}; KATO, Koichi^{2,3}; FUJITA, Makoto^{1,3,4}

タンパク質とそれに結合するリガンド分子の間にはたらく弱い相互作用は、生体の夾雑環境でシグナル伝達や免疫応答など生命現象の根幹を担う。しかし、その弱い相互作用に基づくタンパク質-リガンド複合体は、*in vitro*の解析環境でほとんどが解離しており、その過渡構造は未解明である(図1a)。

本研究では、かご型の金属錯体内の孤立空間にタンパク質とリガンドを閉じ込めることで、その過渡的な複合体構造を解析する手法を開拓した。我々が開発したかご型錯体は、その一義内部空間にタンパク質を包接し、その構造を詳細に解析することができる^[1,2]。タンパク質にとって狭い錯体のナノ空間にリガンドと共に内包することで近接効果により弱い相互作用を誘起し、錯体内に単離された複合体構造を解析することを目指した(図1b)。

タンパク質とリガンド分子は、配位子(L)との縮合に続くPd(II)イオン(M)との錯形成によりM₁₂L₂₄組成のかご型錯体へ共包接した(図1c)。内径5 nmの錯体内でのタンパク質とリガンドの平均距離は、蛍光共鳴エネルギー(FRET)から4.2 ± 0.6 nmと算出された。この近接により、内包分子の実効濃度が10³以上向上して相互作用が誘起される。実際にリゾチームの酵素活性阻害から、弱い相互作用(解離定数K_d = 27 mM)による単糖の活性部位への結合が錯体内で誘起されたことが示された。

この錯体への閉じ込め効果を活用して、脂質エステル加水分解酵素であるクチナーゼ様酵素(CLE)と脂質(オレイン酸アミド)の過渡的な複合体構造を解析した(図1c)。¹³C, ¹⁵N安定同位体標識CLEを用いたNMR測定において、錯体内で脂質の結合に伴う活性部位近傍の構造変換が観測された。この脂質の特異的な結合は遊離の脂質の混合では観測されないことから、錯体内での相互作用の誘起により過渡構造が解析可能になったことが示された。残基ごとの変化、脂質とのNOE (nuclear Overhauser effect)相関を評価することでCLE-脂質複合体の構造を解析した。このようにかご型錯体への包接は、弱い相互作用に基づく過渡的なタンパク質-リガンド複合体構造の解析手法としての展開が期待される。

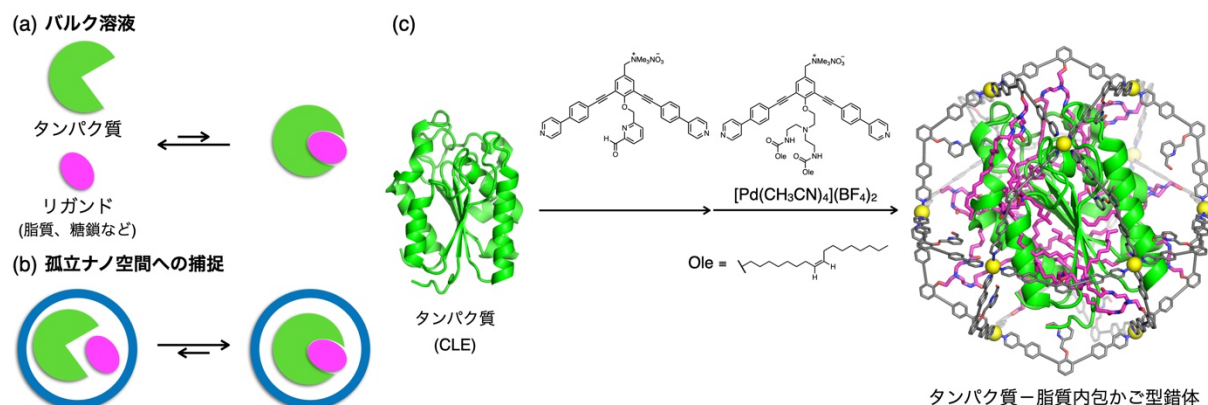


図1 かご型錯体の一義孤立空間への閉じ込めによる過渡的なタンパク質-リガンド間の弱い相互作用の解析
[1] D. Fujita, *et al.*, *Chem* **2021**, 7, 2672. [2] T. Nakama, *et al.*, *Chem. Sci.* **2023**, 14, 2910.

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：大河内 美奈（東京工業大学）

2024年9月12日(木) 15:10 ～ 16:30 A会場 (大会議室101)

[10A-08] 直列型ユビ^Q キチン鎖の非酵素的修飾を介した標的タンパク質の分解経路制御

*古畑 隆史¹、吉田 和生¹、宮本 丈太郎¹、藤田 涼香¹、岡本 晃充¹（1. 東京大学大学院工学系研究科）

15:10 ～ 15:30

[10A-09] PQQ依存性脱水素酵素の酸化還元状態と分子内電子移動の解析

*武田 康太¹、五十嵐 圭日子²、中村 暢文³（1. 国立研究開発法人産業技術総合研究所、2. 東京大学農学部、3. 東京農工大学工学部）

15:30 ～ 15:50

[10A-10] *Methylosinus trichosporium* OB3bのランタノイドイオン存在下におけるグリセロールによる増殖阻害機構の解明

*伊藤 栄紘¹、椎名 渉¹、舘入 幹樹¹、蒲池 利章¹（1. 東京工業大学生命理工学院）

15:50 ～ 16:10

[10A-11] 原子間力顕微鏡を用いた細菌固定化タンパク質 AtaAの特性解析

*吉本 将悟¹、笹原 純¹、堀 克敏¹（1. 名古屋大学大学院工学研究科）

16:10 ～ 16:30

直列型ユビキチン鎖の非酵素的修飾を介した標的タンパク質の分解経路制御

○古畑 隆史・吉田 和生・宮本 丈太郎・藤田 涼香・岡本 晃充（東大院工）

Control of degradative pathways of target proteins mediated by non-enzymatic modification with tandem polyubiquitin chains (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo) FURUHATA, Takafumi; YOSHIDA, Kazuki, MIYAMOTO, Jotaro; FUJITA, Ryoka; OKAMOTO, Akimitsu

タンパク質分解誘導剤は、非酵素的な機能を持つ Undruggable タンパク質の機能阻害を可能とする創薬モダリティとして開拓が進んでいる¹。その代表例である PROTAC は、標的タンパク質と E3 リガーゼの双方に結合能を持つヘテロ二官能性の分子であり、両者を近接させることで、標的タンパク質のユビキチン化とプロテアソームによる分解を促進する。しかし、臨床試験を含めた研究が進むなかで、E3 リガーゼの発現量・局在の変化²や点変異による標的タンパク質との三者複合体（標的タンパク質-分解誘導剤-E3 リガーゼの複合体）の不安定化^{3,4}による薬効の低下や薬剤耐性のリスクが指摘されている。また、プロテアソームは柔軟な非構造領域を持つタンパク質を効率的に分解可能である一方⁵、凝集タンパク質などの柔軟性の低い標的はプロテアソームを介した分解誘導が困難であった。そのため、内在のユビキチン化酵素の活性にかかわらず、タンパク質の性質に応じて適切な経路で分解誘導できる分子技術の開発が、分解誘導剤を適応可能な細胞種、標的タンパク質の拡張に強く求められている。

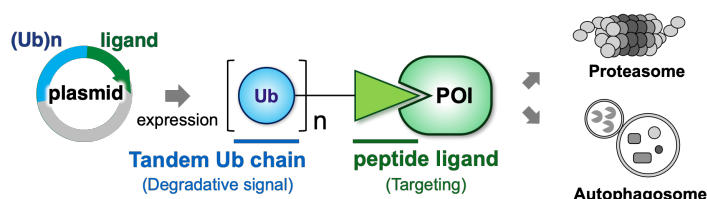


Fig. 1 Ub-PepL を用いた非酵素的ユビキチン化とタンパク質標的分解

以上の背景から、本研究ではユビキチン鎖のユビキチン連結酵素非依存的な修飾法の確立と鎖構造による分解経路の制御を試みた。本目的の実現する分子プラットフォームとして、“(ポリ/マルチ)ユビキチン-ペプチドリガンドキメラ (Ub-PepL キメラ)”を設計した。これは、細胞内での分解を媒介するユビキチン鎖と標的への結合能を有するペプチドリガンドを繋いだ二官能性タンパク質であり、非共有結合的を介して標的タンパク質にユビキチン鎖を非酵素的に修飾できると考えられる。ユビキチン鎖は、構造に応じて二大分解機構である Proteasome 経路と Autophagy 経路のいずれについても目印として機能しうる。⁶また、主鎖で連結した直列型ユビキチン鎖を用いれば、核酸に分解誘導剤の配列をコード可能であるため、核酸としてデリバリーし細胞内で発現させることで持続的な機能が期待できる。そこで、直列型ユビキチン鎖として、リンカーペプチドを介してユビキチンが連結したリンカー鎖 (Lin 鎖) とリンカーを介さず直接連結した直鎖状鎖 (M1 鎖) に着目し、EGFP との融合タンパク質を用いて、それぞれの分解誘導能と分解経路選択性のスクリーニングを行った。その結果、Lin 鎖と M1 鎖それぞれについて、長さに応じた分解誘導能が確認されたほか、両者で Proteasome と Lysosome に対する対照的な依存性が見られた。また、分解誘導能が確認された直列型鎖を用いて Ub-PepL キメラを設計し、細胞内で発現させると、標的タンパク質の発現レベルの低下が確認されたほか、Lin 鎖において分解が Autophagy 経路に依存していることが示唆された。以上の結果は、Ub-PepL キメラは標的タンパク質に対する分解誘導剤として機能するだけでなく、ユビキチン構造によって分解経路をプログラム可能な分子プラットフォームであることを示唆している。

1. K. T. G. Samarasinghe and C. M. Crews, *Cell Chem. Biol.* 28, 934–951 (2021); 2. L. M. Simpson *et al.*, *Cell Chem. Biol.* 29, 1482–1504 (2022); 3. A. Hanzl *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* 19, 323–333 (2022); 4. R. Shirasaki *et al.*, *Cell Rep.* 34, 108532 (2021); 5. D. Berrko *et al.*, *Mol. Cell* 48, 601–611 (2012).; 6. C. Pohl and I. Dikic, *Science*, 366, 818–822 (2019).

PQQ 依存性脱水素酵素の酸化還元状態と分子内電子移動の解析

○武田康太¹・五十嵐圭日子²・中村暢文³(¹産総研化学プロセス、東大院農、²農工大院工)

Redox states and intramolecular electron transfer of a PQQ-dependent dehydrogenase (Chem. Proc. Technol. Res. Inst., AIST¹, Grad. Sch. Agricul. Life Sci., Univ. of Tokyo, Dept. of Biotechnol. Life Sci., Tokyo Univ. Agricul. Technol³.) TAKEDA, Kota¹; IGARASHI, Kiyohiko²; NAKAMURA, Nobuhumi³

酸化還元酵素は生体エネルギー変換システムの重要な役割を担っているが、その反応におけるレドックスサイクルを回す補酵素の働きが極めて重要である。フラビンやキノン系の補酵素は、酸化型、セミキノン型、還元型の三つの酸化還元状態があるため、生体の 2 電子反応と 1 電子反応を仲介することができる。本研究では、NAD や FAD に次ぐ第 3 の補酵素として同定されたピロロキノリンキノン (PQQ) を補酵素とする酵素の酸化還元状態と、ヘムへの電子移動機構を明らかにすることを目的とした。

担子菌 *Coprinosia cinerea* 由来の PQQ 依存性ピラノース脱水素酵素(CcPDH)は、PQQ とヘムを有した植物細胞壁分解に関与する酸化還元酵素である^[1]。PQQ を含む触媒ドメインにシトクロムドメインがリンカーで繋がれた構造をとっており、基質の酸化によって得られた電子は PQQ の酸化還元サイクルを介してヘムへと 1 電子ずつ送られる。その際、弱酸性から弱アルカリ性にかけて分子内(ドメイン間)の電子移動(IET)が増加することが示唆されている^[2]。これまでに、シトクロムドメインを切り離れた触媒ドメインと金ナノ粒子修飾電極との直接電子移動(DET)法を確立した^[3]。そこで今回、DET 法により、酵素内 PQQ の酸化還元電位とプロトン化状態について明らかとした。さらに、ストップ・フロー法を用いて全長酵素の反応速度論解析を行なった。

pH 6.0 の酢酸緩衝液中、基質のない(触媒反応が進行しない)条件下で酵素固定化電極の CV を行ったら、PQQ の酸化型/セミキノン、セミキノン/還元型の酸化還元反応に由来する二対のピーク電流が観測された。ピーク電位の間の電位である -125 mV に酸化還元滴定した試料の電子スピン共鳴分光測定から、セミキノンラジカルのシグナル($g=2.0065$)が得られた。以上から、DET による酵素内 PQQ の酸化還元反応がセミキノン型を介した 2 段階 1 電子反応であることが示された。次に、pH 4.5 から 10.0 の範囲で CV を測定し、得られたピーク電位の値から、酸化型/セミキノン、セミキノン/還元型の酸化還元電位を決定した。ネルンスト式による解析から、各 PQQ のイオン化状態における pK_a 値を算出することができた(Fig. 1)。生理的な条件下では還元型 PQQ は脱プロトン化されており、2 電子 1 プロトンの移動となることが示された。

ストップ・フロー法より、PQQ の還元的半反応とヘムへの 1 電子目の還元速度を解析した。ヘムへ還元速度は、常に PQQ 還元速度以下であり、弱酸性から弱アルカリ性の領域で一定となった。定常状態での IET 速度は増加していることから、セミキノンからヘムへの 2 電子目の還元速度が pH 上昇に対して増加することが考えられる。酸化型/セミキノンの電位とヘムの電位差が中性付近から広がっていた。2 電子目の IET 速度の増加は、熱力学的な駆動力の増大によるものと考察した。

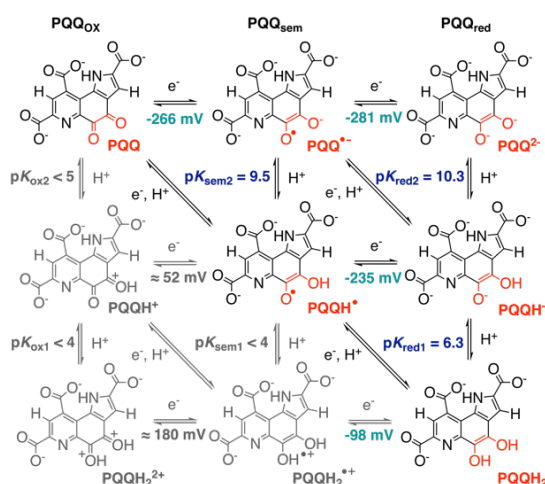


Fig. 1. Schematic of PQQ electron, proton, and proton-coupled electron transfer in the enzyme with obtained values of pK_a and redox potential.

- [1] K. Takeda, et al., *PLoS One*, 10, e0115722 (2015), [2] K. Takeda, et al., *BBRC*, 477, 369-373, (2016), [3] K. Takeda, et al., *Electrochim. Acta*, 359, 136982 (2020).

Methylosinus trichosporium OB3b のランタノイドイオン存在下におけるグリセロールによる増殖阻害機構の解明

○伊藤 栄紘・椎名 渉・舘入 幹樹・蒲池 利章（東工大生命理工）

Mechanism of glycerol-induced growth inhibition in *Methylosinus trichosporium* OB3b cultured with lanthanide ion (Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) ITO, Hidehiro; SHIINA, Wataru; TATEIRI, Motoki; KAMACHI, Toshiaki

メタンを単一の炭素源として生育することができるメタン酸化細菌において、メタンはメタノール、ホルムアルデヒド、ギ酸、二酸化炭素へと生体内の酵素によって酸化され、同化経路や異化経路に利用される。これらの中のメタノール酸化酵素であるメタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)には、MxaFI と XoxF の 2 種類が存在し、培地中のランタノイドイオンの存在下では MxaFI の発現が抑制され、XoxF の発現が優位になる。メタン酸化細菌のメタン代謝は広く研究されているが、多炭素化合物、特にグリセロールの代謝はあまり知られていない。メタン酸化細菌においてグリセロールは、凍結保護剤やメタンとの共基質としての利用が報告されている一方で、ある種のメタン酸化細菌に対して増殖阻害を引き起こすことが知られている¹。以前の研究において、メタン酸化細菌の一種である *Methylosinus trichosporium* OB3b (OB3b 株)をランタノイドの一種であるセリウムイオン存在下で培養することで、グリセロール毒性が強くなることを明らかにしている²。

本研究では、OB3b 株におけるセリウムイオンとグリセロールの共存下での増殖阻害のメカニズム解明を目指した。セリウムイオン共存下での培養中にグリセロールを添加した OB3b 株では、非添加時と比べて菌体増殖が著しく低下した(Figure 1A)。これらの菌体の蛍光スペクトルを測定した結果、グリセロールを添加した菌体では、280 nm で励起したトリプトファン由来の蛍光が減少し(Figure 1B)、330 nm で励起した蛍光が増加した(Figure 1C)。この蛍光分析の結果は、グリセロール存在下で培養した OB3b 株菌体内で、活性カルボニル種生成により誘導される Maillard 反応が進行していることを示唆した。グリセロール毒性における XoxF1 およびアルデヒドの関連を明らかにするために、MDH 阻害剤であるシクロプロパノール(CP)処理した OB3b 菌体を用いて、Maillard 反応物由来の 330 nm で励起した蛍光スペクトルのグリセロール応答を調べた(Figure 2)。蛍光測定の結果、CP 処理した菌体は未処理の菌体で見られた蛍光強度の増大は起こらなかった。これらの結果から、OB3b 株におけるグリセロール毒性がランタノイド依存性 MDH である XoxF1 のグリセロール酸化に起因することを明らかにした。さらに、OB3b 株より精製した XoxF1 のメタノールおよびグリセロール酸化活性を評価した。

1) S. Hoefman, K. Van Hoorde, N. Boon, P. Vandamme, P. De Vos and K. Heylen, *PLOS ONE*, **2012**, 7 (4), e34196.
2) W. Shiina, H. Ito and T. Kamachi, *Appl. Environ. Microbiol.* **2023**, 89 (1), e01413-22.

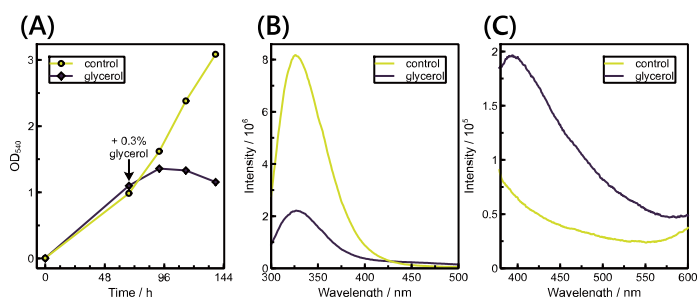


Figure 1 Growth inhibition of *Methylosinus trichosporium* OB3b with glycerol. (A) Growth curves of OB3b strain incubated with (purple) or without (yellow) glycerol. Glycerol was supplemented at the time indicated by the arrow. Fluorescence spectra of tryptophan ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) (B) and some fluorophores ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$) (C) were measured from the suspensions of OB3b cells (OD_{540} of 0.4) collected 3 days after glycerol supplementation.

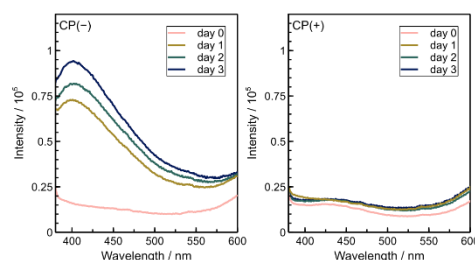


Figure 2 Time course of fluorescence spectra derived from *Methylosinus trichosporium* OB3b incubated with glycerol ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$). Fluorescence spectra were measured from the suspensions of OB3b cells (OD_{540} of 0.2) treated with (right) and without (left) cyclopropanol.

原子間力顕微鏡を用いた細菌固定化タンパク質 AtaA の特性解析

○吉本将悟・笹原 純・堀 克敏（名大院工）

Characterization of bacterial adhesive protein AtaA using atomic force microscopy (Graduate School of Engineering, Nagoya University) Yoshimoto, Shogo; SASAHARA, Jun, HORI, Katsutoshi

微生物付着はバイオフィーム形成の第一段階である。医療や衛生分野においては感染やコンタミネーションの原因となる厄介なものである一方、排水処理やバイオプロセスにおいては反応効率の向上や分離プロセスの簡便化などを可能とする有益なものである。

トルエン分解性細菌として単離されたアシネトバクター属細菌 Tol 5 は、プラスチックからガラス、金属など様々な材料表面に対して高い付着性を示す¹。このユニークな付着性は、Tol 5 が細胞表層に持つ 3630 アミノ酸残基のポリペプチド鎖がホモ三量体を形成した長さ 250 nm のファイバー状タンパク質 AtaA によるものである（図 1）。*ataA* 遺伝子を他の細菌で発現させることで付着性を付与し担体に固定化できるため、新しい全細胞触媒固定化方法として期待されている²。最近、Tol 5 細胞は材料表面との短時間の接触で他の細菌より 1 桁以上強い付着力を発揮することが原子間力顕微鏡（AFM）を用いた解析により分かってきた³。しかし分子レベルでの付着力及びその特性の理解は不十分であった。本研究では、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて AtaA の付着を 1 分子レベルで解析し、AtaA を介した Tol 5 の強固な付着現象を理解することを目的とした。

AtaA 1 分子の付着力を明らかにするために、アラビノース濃度で *ataA* 遺伝子の発現量を制御可能な Tol 5 由来の変異株を用いて、細胞表層に AtaA をわずかに提示した細胞を調製した。この細胞をガラスボトムディッシュに固定化し、微細な探針を持つプローブをリン酸緩衝液中で 1 秒間押しつけ、1 $\mu\text{m/s}$ で引き離す際に AtaA-プローブ間に働く力を AFM で測定した。AtaA の発現量が少ないほど弱い付着力を示し、AtaA をごくわずかに発現させた細胞で AtaA 1 分子の付着現象を捉えることに成功した。AtaA は数百 nm の長距離にわたり、ドメインがアンフォールディングしていることを示すのこぎり歯状のフォースカーブを示した。このアンフォールディングにより、剥離する方向に働く力およびエネルギーを散逸させていると考えられる。さらに、AtaA がプローブに付着した状態を維持しながらプローブを複数回上下させたところ同様のフォースカーブを繰り返し示したことから、AtaA は力がかからなくなるとリフォールドすることが明らかになった。これは、AtaA に力がかかり高次構造が壊れながら剥離した後、力がかからなくなると自発的に立体構造を再生し、繰り返し脱着が可能であることを示唆している。これらの結果は、AtaA を介した強固な付着には表面との直接的な相互作用だけでなく、ファイバーの強靱性が重要であることを示している。

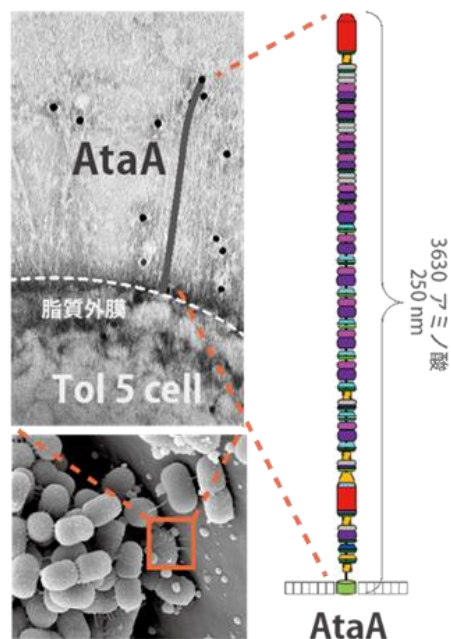


図 1. 高付着性細菌 Tol5 の有する細菌固定化タンパク質 AtaA.

- (1) M. Ishikawa, H. Nakatani, K. Hori, *PLOS ONE*, 7: e48830 (2012)
- (2) K. Hori, S. Yoshimoto et al., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 133(3): 195-207 (2022)
- (3) S. Ishii, S. Yoshimoto et al., *Journal of Colloid and Interface Science*, 606: 628-634 (2022)

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：林 剛介（名古屋大学）

2024年9月12日(木) 16:40 ～ 17:40 A会場 (大会議室101)

[10A-12] 光可逆的蛋白質ラベル化システムの改良による細胞内蛋白質局在の精密制御

*小和田 俊行^{1,2}、佐藤 歳三²、濱口 聡志²、Saifudin Muhammad Wildan²、水上 進^{1,2}（1. 東北大多元研、2. 東北大院生命）

16:40 ～ 17:00

[10A-13] Proteomic and Functional Analysis of Migrasomes in MDA-MB-231 Cells Under IL-6 Stimulation

*Ananda Bagus Richky Digdaya Putra¹, Shogo Saito¹, Masayoshi Tanaka¹, Mina Okochi¹（1. Department of Chemical Science and Engineering, School of Material and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology）

17:00 ～ 17:20

[10A-14] 速度論選択的 HDAC2阻害薬の創製とその薬理効果

*伊藤 幸裕^{1,2}、東條 敏史²、黒原 崇^{1,2}、李 穎²、Singh Ritesh²、Narozny Remy¹、Van der Wiel Alexander²、三宅 由花^{1,2}、山下 泰信¹、内田 周作^{3,4}、鈴木 孝禎^{1,2}（1. 大阪大学産業科学研究所、2. 京都府立医科大学大学院医学研究科、3. 京都大学大学院医学研究科 メディカルイノベーションセンター、4. 名古屋市立大学大学院医学研究科）

17:20 ～ 17:40

光可逆的蛋白質ラベル化システムの改良による

細胞内蛋白質局在の精密制御

○小和田俊行^{1,2}・佐藤歳三²・濱口聡志²・Muhammad Wildan Saifudin²・水上 進^{1,2} (1東北大多元研、²東北大院生命)

Precise control of subcellular protein localization by improved photoreversible protein labeling system
(IMRAM, Tohoku Univ.¹, Graduate School of Life Sciences, Tohoku Univ.²) KOWADA, Toshiyuki^{1,2}; SATO, Toshizo²; HAMAGUCHI, Satoshi²; SAIFUDIN, Muhammad Wildan², MIZUKAMI, Shin^{1,2}

多くの細胞内蛋白質は特定の細胞内局所において機能発現する。したがって、標的蛋白質の細胞内局在を人為的に操作する手法は、細胞内シグナル伝達の制御に有効であると考えられる。特に、時空間分解能に優れた光を利用した蛋白質局在制御法は、複雑な細胞内シグナルネットワークの制御と理解に有効である。現在、光感受性蛋白質を用いた光遺伝学的手法が広く利用されている。ほとんどの場合において青色光照射により二量体化が誘起されるフラビン蛋白質が用いられているため、二量体の維持には連続的な青色光照射が必要であり、光毒性の懸念がある。また、光照射停止後に進行する二量体の解消には数秒から数分を要する。したがって、秒スケールの制御を必要とするシグナル伝達の制御には、高速かつ光可逆的制御が可能な蛋白質二量化法が求められる。

我々はこれまでに、光可逆的蛋白質ラベル化システムの確立を目指し、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) のフォトクロミック阻害剤を開発してきた (図 1a)^{1,2}。さらに最近、eDHFR のフォトクロミック阻害剤 azoMTX の誘導体と HaloTag リガンドを組み合わせたフォトクロミック蛋白質二量化剤 pcDH を開発し、生細胞内での高速 ($t_{1/2, on} = 0.78$ s, $t_{1/2, off} < 0.3$ s) かつ光可逆的な蛋白質二量化と、マイトファジー誘導の光制御を達成している (図 1b)³。しかし、我々が開発したフォトクロミック蛋白質二量化法には、緑色光照射により二量化解消を誘導した後も eDHFR と pcDH-HaloTag の複合体が残存するバックグラウンド結合が存在することがわかった。

バックグラウンド結合の解消を目指し、(1) フォトクロミックリガンドの光異性化率の向上、ならびに (2) eDHFR に対する結合親和性の低減を狙い、アゾピラゾール構造を有するフォトクロミックリガンドを導入した蛋白質二量化剤 pcDH2b を開発した。紫色光と緑色光を照射した際の Z 体および E 体の存在比率はそれぞれ 93% と 97% であり、pcDH よりも高く、ほとんどが片方の異性体へと変換されることがわかった。しかし、eDHFR に対する親和性は pcDH と同程度であり、生細胞内での eDHFR と HaloTag の二量化実験の結果からもバックグラウンド結合が解消されていないことがわかった。そこで、さらなる結合親和性の低減を目指し、eDHFR 変異体を作製したところ、バックグラウンド結合が無視できるレベルまで低減する変異体を見出すことができた。

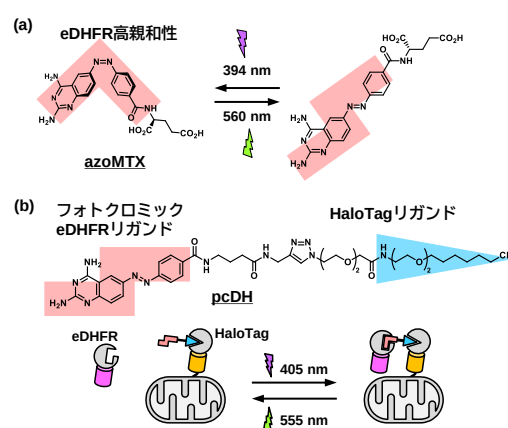


図 1. (a) フォトクロミック eDHFR 阻害剤, azoMTX. (b) フォトクロミック蛋白質二量化剤 pcDH と蛋白質ヘテロ二量化の光制御の概念図。

References

- (1) T. Mashita, T. Kowada, H. Takahashi, T. Matsui, S. Mizukami, *ChemBioChem*, 20, 1382 (2019).; (2) H. S. Sarkar, T. Mashita, T. Kowada, S. Hamaguchi, T. Sato, K. Kasahara, N. Matubayashi, T. Matsui, S. Mizukami, *ACS Chem. Biol.*, 18, 340 (2023).; (3) T. Mashita, T. Kowada, H. Yamamoto, S. Hamaguchi, T. Sato, T. Matsui, S. Mizukami, *Nat. Chem. Biol.* DOI: 10.1038/s41589-024-01654-w (2024).

IL-6 刺激下での MDA-MB-231 細胞におけるミグラソームのプロテオームおよび機能解析 ○Ananda Bagus Richky Digdaya Putra・齊藤 彰吾・田中 祐圭・大河内 美奈 (東京工業大学 物質理工学院)

Proteomic and Functional Analysis of Migrasomes in MDA-MB-231 Cells Under IL-6 Stimulation

(Department of Chemical Science and Engineering, School of Material and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology) PUTRA, Ananda Bagus Richky Digdaya; SAITO, Shogo; TANAKA, Masayoshi; OKOCHI, Mina

Migrasomes are newly identified extracellular vesicles released from migrating cells, playing critical roles in intercellular communication¹. These organelles-like extracellular vesicles, act as packets of information that can be delivered to spatially defined locations to signal surrounding cells. When cell migration occurs, migrasomes are released in the retraction fiber, and they can be taken up by the surrounding cells, or they will undergo a process called migracytosis, a process of rupturing and releasing the content of migrasomes to the environment. Interleukin-6 (IL-6) is crucial in cancer cell growth and progression². IL-6 amplifier is a phenomenon of excessive secretion of IL-6 by immune cells and non-immune cells. IL-6 amplifier starts when the immune cells receive massive inflammatory signals. A multifunctional-cytokines tumor necrosis factor α (TNF- α) has been reported to induce the formation of migrasomes in human coronary injury³.

Furthermore, the peptide interface increased migrasomes formation and retained the migrasomes on the peptide substrates after cell detachment⁴. The effects of migrasomes during IL-6 amplifier on cell migration could be detected by seeding the cells in the migrasomes-covered surface. This method showed that cells that interacted with IL-6 amplifier-induced migrasomes expressed higher levels of IL-6 than the non-induced cells.

However, the impact of cytokine stimulation, particularly IL-6 stimulation that led to the IL-6 amplifier condition, on the proteomic profile of migrasomes in cancer cells remains underexplored. This study aims to investigate the proteomic changes in migrasomes derived from MDA-MB-231 cells, a triple negative cancer cell line, under IL-6 amplifier and to elucidate their potential roles in cancer progression and cellular communication. MDA-MB-231 cells were cultured under standard conditions, starvation conditions, and subjected to IL-6 stimulation. Migrasomes were isolated using differential centrifugation. Gene expression was analyzed via quantitative PCR, and proteomic profiling was conducted using mass spectrometry. Bioinformatics analyses, including the KEGG pathway and GO enrichment, were performed to identify significant pathways and biological processes. IL-6 stimulation significantly upregulated the expression of IL-6 genes in both cells and migrasomes ($p < 0.05$). Proteomic analysis identified 1,339 proteins commonly expressed across conditions, with unique proteins observed in response to specific treatments. IL-6 stimulation induces significant proteomic changes in migrasomes, enhancing their metabolic and immune regulatory activities.

1. Ma, L. *et al. Cell Res.* **25**, 1, 24-38 (2015)
2. Murakami, Y. *et al. Sci. Rep.* **7**, 1, 44042 (2017)
3. Maciej G. *et al. Front. Cell Development. Biol.* **9**, 668032 (2021).
4. Saito, S. *et al. Mater. Sci. Eng. C*, **131**, 112495 (2021)

速度論選択的 HDAC2 阻害薬の創製とその薬理効果

○伊藤幸裕^{1,2}・東條敏史²・黒原崇^{1,2}・李穎²・Ritesh Singh²・Remy Narozny¹・Alexander van der Wiel²・三宅由花^{1,2}・山下泰信¹・内田周作^{3,4}・鈴木孝禎^{1,2} (1 阪大産研、2 京都府立医大産研、3 京大 MIC、4 名古屋市立大産研)

Identification of a Kinetically HDAC2-selective Inhibitor and its Pharmacological Effects (¹SANKEN, Osaka University, ²Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, ³Medinal Innovation Center, Kyoto University, ⁴Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences) ITOH Yukihiro^{1,2}; TOJO Toshifumi²; KUROHARA Takashi^{1,2}; LI Ying²; SINGH Ritesh²; NAROZNY Remy¹; Van der WIEL Alexander²; MIYAKE Miyake^{1,2}; YAMASHITA Yasunobu¹; UCHIDA Shusaku^{3,4}; SUZUKI Takayoshi^{1,2}

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) には 11 種類のアイソザイムが存在するが、その一つである HDAC2 は、アルツハイマー病やうつ病の標的分子として期待されている。そのため、副作用の少ない神経精神疾患治療薬として HDAC2 選択的阻害薬の創製が望まれている。しかし、HDAC2 は他の HDAC アイソザイムの一つである HDAC1 との相溶性および配列類似性が高く、従来型の HDAC2 選択的阻害薬の創製は困難である。このような背景の下、我々は速度論的選択性という概念に活路を見出そうと考えた。速度論的選択性とは、阻害薬の各標的に対する解離速度定数 (k_{off}) もしくはその逆数である滞留時間 (τ) の差に着目した概念である。ある標的に対して k_{off} が小さい (τ が大きい) 場合、その標的に伴う薬理作用の持続性は、 k_{off} が大きい (τ が小さい) 標的に比べて、長いことが期待される^[1]。その結果として、前者の標的に伴う薬理作用が選択的に現れることが期待される (Fig. 1)。そこで、本研究では、速度論的に HDAC2 高選択性を示す阻害薬の創製を試みた。

我々が保有する HDAC 阻害薬ライブラリーのスクリーニングを行ったところ、HDAC1/2 阻害薬 KPZ560^[2]が、3.6 倍程度の速度論的 HDAC2 選択性を示すことがわかった (k_{off} (HDAC1) = 0.0086 min⁻¹, k_{off} (HDAC2) = 0.0024 min⁻¹, k_{off} (HDAC1) / k_{off} (HDAC2) = 3.6)。そこで、KPZ560 類縁体を多数合成し、より高選択性を示す化合物の創製を目指した。その結果、23 倍程度の速度論選択性を示す HDAC2 阻害薬を見出した (k_{off} (HDAC1) = 0.0069 min⁻¹, k_{off} (HDAC2) = 0.0003 min⁻¹, k_{off} (HDAC1) / k_{off} (HDAC2) = 23)。見出した化合物は、動物試験において、体重減少や異常行動といった副作用を示すことなく、記憶力の改善作用や抗うつ様作用を示した。

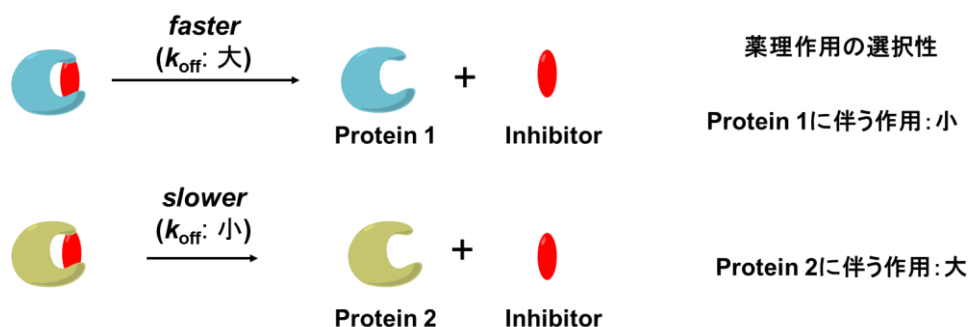


Fig 1. 速度論的選択性: 解離速度定数 (k_{off}) が大きい標的に比べて小さい標的に伴う薬理作用が選択的に現れる。

References

- [1] Copeland, R. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, 15, 87.
- [2] Itoh, Y., et. al. *J. Med. Chem.* **2023**, 66, 15171–15188.

一般口頭発表 | 糖・脂質

糖・脂質

座長：プラディプタ アンバラ（東京工業大学）

2024年9月12日(木) 09:30 ～ 10:30 B会場 (大会議室102)

[1OB-01] 巨大ベシクルへのトリアシルグリセロール液滴の導入：リン脂質二重膜の自発曲率の発生

*片岡 知歩¹（1. 物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター）

09:30 ～ 09:50

[1OB-02] 脂質固定化ビーズを用いた脂質特異的結合タンパク質の探索

*森藤 将之¹、秦 康祐²、和泉 自泰²、馬場 健史²、木下 祥尚¹、松森 信明¹（1. 九州大学大学院理学府、2. 九州大学生体防御医学研究所）

09:50 ～ 10:10

[1OB-03] リン脂質膜上における相分離ドメイン制御を基盤とした構造安定リン脂質チューブの設計

*内田 紀之¹、石坂 龍¹、河北 杏樹¹、奥村 正樹²、村岡 貴博^{1,3}（1. 東京農工大学、2. 東北大学際研、3. 神奈川県立産総研）

10:10 ～ 10:30

巨大ベシクルへのトリアシルグリセロール液滴の導入：

リン脂質二重膜の自発曲率の発生

○片岡 知歩（物材機構 高分子・バイオ材料研究センター）

Incorporation of triacylglycerol droplets in giant unilamellar vesicles: Induction of spontaneous curvature of phospholipid bilayers (Res. Cent. Macromol. Biomater., NIMS) KATAOKA, Chiho

脂肪滴は、エネルギー生成や脂質代謝に関わる細胞小器官である。その構造はトリアシルグリセロール (TAG) 等の油滴であり、界面は、リン脂質単分子膜とタンパク質で覆われている。脂肪滴は小胞体のリン脂質二重膜から次のように発生する。小胞体膜内で TAG が合成され、TAG 濃度が臨界値を超えると、凝集して油滴になる。油滴は、小胞体膜の二つの単分子膜の間に挟まれており、成長後、膜から切り離されて脂肪滴となる。このように脂肪滴形成過程では、油滴を挟んだリン脂質二重膜の構造が生じる。この膜構造の性質を調べるため、本研究では、巨大ベシクル (GUV) の膜に TAG 液滴を導入した。そして、油滴により膜に自発曲率が生じることを明らかにした [1]。小胞体膜は様々な膜曲率から構成されるので、膜曲率と油滴との相関を明らかにすることは重要である。

GUV を TAG エマルジョンと混合すると、膜中に埋め込まれた油滴 (図 1A,B) と、GUV の外側 (図 1C) あるいは内側 (図 1D) に突出した球状の油滴が観察された。ほとんどの試料において、GUV 外側に突出した球状油滴 (図 1C) が約 50% 以上を占め、GUV 内側に突出した球状油滴 (図 1D) はほとんど存在しなかった。すなわち、膜の内外で、球状油滴の数密度は非対称であった。

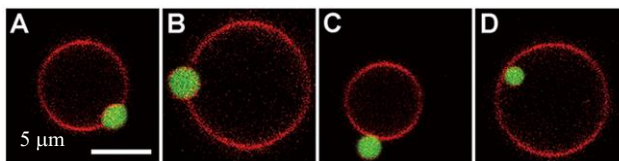


図 1 TAG 液滴 (緑) を取り込んだ GUV 膜 (赤)

GUV 以外に、高い頻度で別のベシクルも観察された (図 2A)。このベシクルは、二枚の二重膜から成る球と、一枚の二重膜から成る球がつながった構造を持つ (図 2B)。ここで個々のベシクルに対して、二つの膜領域が作る角度 θ (図 2B)、二枚の二重膜から成る領域の表面積 S_d 、一枚の二重膜から成る領域の表面積 S_s を決定した。その結果、必ず $S_d/S_s \geq 1$ となることが分かった (図 2C)。

$S_d/S_s \geq 1$ は、膜自発曲率の発生で説明することができた。平らな二重膜に球状の油滴が結合すると、油滴/膜結合領域の単分子膜に大きな曲率が生じる (図 3A)。この曲率を解消するため、二重膜は油滴から離れるように曲がると考えられる (図 3B)。この効果を二重膜の自発曲率 C_0 で表し、エネルギー計算を行ったところ、実験結果 $S_d/S_s \geq 1$ を説明することができた。従って、球状油滴の数密度の非対称性により、二重膜に自発曲率が発生した、と結論付けた。

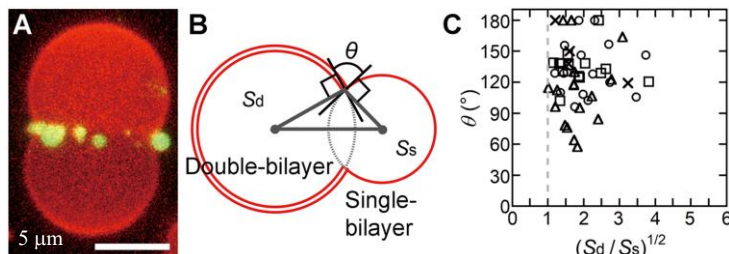


図 2 二枚の二重膜と一枚の二重膜からなるベシクル (A) 蛍光像 (B) 構造の模式図 (C) 角度 θ と面積比 S_d/S_s

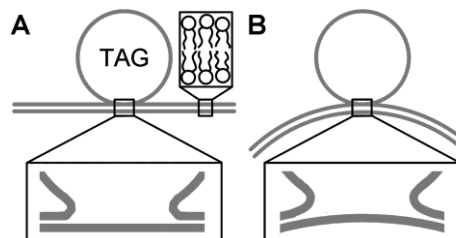


図 3 自発曲率の発生

参考文献 [1] C. Kataoka-Hamai, *Biophys. J.*, accepted (DOI: 10.1016/j.bpj.2024.05.030).

謝辞 本研究は JSPS 科研費 22K05179 の助成を受けたものです。

脂質固定化ビーズを用いた脂質特異的結合タンパク質の探索

○森藤将之¹・秦康祐²・和泉自泰²・馬場健史²・木下祥尚¹・松森信明¹ (¹ 九大
院理, ² 九大生医研)

Identification of Lipid-Specific Proteins with High-Density Lipid-Immobilized Beads (Graduate School of
Science, Kyushu Univ. ¹ Medical Institute of Bioregulation, Kyushu Univ. ²) MORITO, Masayuki¹; HATA,
Kosuke²; IZUMI, Yoshihiro²; BAMBA, Takeshi²; KINOSHITA, Masanao¹; MATSUMORI, Nobuaki¹

生体膜は、数万種類に及ぶ多様な脂質からなる脂質二重膜とそこに存在する多種の膜タンパク質から構成され、膜輸送や情報伝達など多岐にわたる重要な生理機能を有する。そこでは脂質分子が特異的に膜タンパク質と相互作用しており、この相互作用によって膜タンパク質の構造や機能が調節されている (*Science* **2007**, *318*, 1258–65., *Nature* **2012**, *481*, 525–529.). しかし、脂質結合タンパク質を系統的かつ網羅的に取得する手法が欠如しているため、脂質分子による膜タンパク質の機能制御についての研究が進んでいないのが現状である。したがって、脂質の生理機能を明らかにするためにも、脂質特異的結合タンパク質の網羅的解析法の開発が切に望まれている。

当研究室では脂質分子を磁性ビーズ上に固定化することで「脂質固定化ビーズ」を作製し、スフィンゴミエリン (SM) とセラミド (Cer) に特異的に結合するタンパク質の探索を行った (*Analyst* **2024** in press.). このビーズは表面に脂質分子が高密度で共有結合しており、ビーズ表面に脂質膜を模した構造をもつ。これにより界面活性剤存在下でも適用できるため、水溶性タンパク質だけでなく膜タンパク質のスクリーニングも可能である。今回 SM と Cer に加え、これらの二重結合が還元されたジヒドロ体 2 種、スフィンゴ脂質以外からもホスファチジルコリンとコレステロール (Chol) をビーズに固定化した。さらに SM と Chol を混合して固定化し、脂質ラフトを模した SM/Chol ビーズも作製した (**Fig. 1**). これらビーズとマウス神経芽腫細胞ライセートを混和することでビーズにタンパク質を結合させ、二回の洗浄の後、熱溶出により結合タンパク質を取得した。その後、一細胞ショットガンプロテオミクスを実現した高感度分析システム (*Anal. Chem.* **2020**, *92*, 4, 2997–3005.) によって網羅的解析を行い、各ビーズよりそれぞれ 3000 を超えるタンパク質を同定した。その中には SM 特異的な p24 や Chol 特異的な Interferon gamma receptor 1 などの既知の脂質結合タンパク質も含まれており、本手法によって脂質特異的結合タンパク質の網羅解析が可能であることを示した。現在同定タンパク質のより詳細なデータ解析を進めており、その後の同定タンパク質と脂質の機能・相互作用解析についても検討中である。

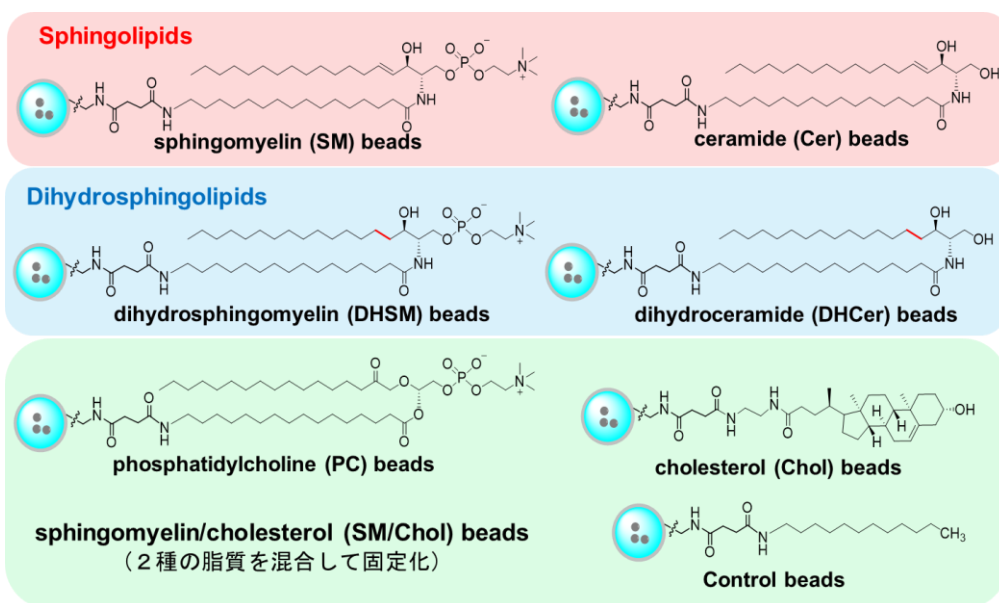


Fig. 1 作製した脂質固定化ビーズの構造。

リン脂質膜上における相分離ドメイン制御を基盤とした構造安定リン脂質チューブの設計

○内田紀之¹・石坂龍¹・河北杏樹¹・奥村正樹²・村岡貴博^{1,3} (¹東農工大院工、²東北大学際研、³神奈川県立産総研)

Design of structurally stable phospholipid tubes based on control of phase-separated domain on the phospholipid membrane (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology¹, Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University², KISTEC³) Noriyuki Uchida¹; Ryu Ishizaka¹; Anju Kawakita¹; Masaki Okumura²; Takahiro, Muraoka^{1,3}

細胞内の小胞体や神経細胞の樹状突起に代表されるように、リン脂質のチューブ状集合体は細胞活動において必須の構造体である。このようなリン脂質チューブを人工的に作成することで、細胞内のリン脂質チューブに結合するタンパク質に対する分子生物学的解析ツールなど、様々な生体機能性材料として利用できる。しかしながら、異方的なリン脂質チューブは一般的に熱力学的に不安定であり、ボトムアップ的に設計することは未だ困難である。これまで演者はリン脂質膜上における相分離ドメイン構造の制御を基盤とした膜変形材料を開発し、生体機能性材料への応用を進めてきた¹⁻⁵。その中で最近、DOPC、DPPC、コレステロールからなる三成分リン脂質膜 (3L) にカチオン性受容体脂質 (CaRL、図 1a) が組み込まれた巨大ベシクル (GV^{3L/CaRL}) を開発した。興味深いことに、オリゴアスパラギン酸を GV^{3L/CaRL} に添加し、CaRL の集合化を誘導すると、膜中で相分離によるドメインが形成されると共に、基盤上で扁平構造を経てチューブ状構造体 (Tube^{3L/CaRL}) へと変形した (図 1b, c)。この Tube^{3L/CaRL} は、従来の熱力学的不安定なリン脂質チューブとは異なり、温度や含塩条件などの外部環境の変化に対して高い安定性を示し、材料応用する上で有用である。本発表では、この構造安定リン脂質チューブの作製法と、生体分子解析への応用に向けた膜結合タンパク質の足場材料としての応用に関して紹介する。

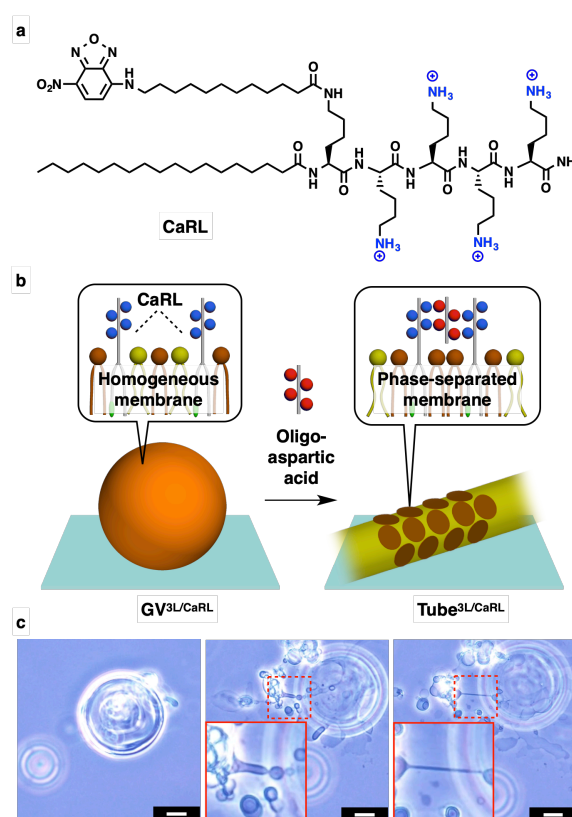


Fig. 1 (a) Molecular structure of CaRL. Schematic illustration (b) and microscopy (c) of the tube formation induced by assembly of CaRL on the phospholipid membrane. Scale bar = 20 μm .

- 1) N. Uchida*, N. N. Horimoto, K. Yamada, T. Hikima, Y. Ishida*, *ChemBioChem*, **19**, 1922–1926 (2020)
- 2) Y. Takagi, N. Uchida*, Y. Anraku, T. Muraoka*, *Chem. Commun.*, **58**, 5164–5167 (2022)
- 3) N. Uchida*, T. Muraoka*, et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, **145**, 6210–6220 (2023)
- 4) N. Uchida*, *Polymer Journal*, **55**, DOI: 10.1038/s41428-023-00788-3 (2023)
- 5) N. Uchida*, T. Muraoka*, *Chem. Commun.*, **59**, 9665–9782 (2023)

核酸関連

座長：神谷 由紀子（神戸薬科大学）

2024年9月12日(木) 10:40 ～ 12:00 B会場 (大会議室102)

[1OB-04] SARS-CoV-2 RNA 上で“形成するグ” アニン四重鎖構造を標的とした 低分子リガント”の創製

*佐々木 捷悟^{1,2}、中嶋 章悟³、野原 玲奈¹、竹内 紀人¹、池袋 一典¹、長澤 和夫¹、渡土 幸一^{3,4}、寺正行¹（1. 東京農工大学大学院工学府、2. 奈良女子大学理学部、3. 国立感染症研究所、4. JST未来社会創造事業）

10:40 ～ 11:00

[1OB-05] 医薬応用を指向した化学合成に基づく高度化学修飾 mRNAの創出

*木村 康明¹、岩井 宏徒²、本間 正一²、山田 浩貴²、中本 航介¹、稲垣 雅仁¹、橋谷 文貴¹、阿部 奈保子¹、山本 潤一郎²、阿部 洋^{1,3}（1. 名古屋大学大学院理学研究科、2. 協和キリン株式会社、3. 糖鎖生命コア研究所）

11:00 ～ 11:20

[1OB-06] 遺伝子発現をホスト-ゲスト相互作用で制御可能な人工核酸の開発

*岡村 秀紀^{1,2}、矢尾 健行^{1,2}、永次 史^{1,2}（1. 東北大学多元物質科学研究所、2. 東北大学大学院理学研究科）

11:20 ～ 11:40

[1OB-07] In-cell NMR法によるヒト細胞内における HIV Tat捕捉 RNAアプタマーと標的分子との相互作用の解析

*山置 佑大^{1,2}、Eladl Omar^{1,2}、近藤 敬子¹、永田 崇^{1,2}、片平 正人^{1,2}（1. 京都大学エネルギー理工学研究所、2. 京都大学エネルギー科学研究科）

11:40 ～ 12:00

SARS-CoV-2 RNA 上で形成するグアニン四重鎖構造を標的とした 低分子リガンドの創製

○佐々木捷悟^{1,2}・中嶋章悟³・野原玲奈¹・竹内紀人¹・池袋一典¹・長澤和夫¹・
渡士幸一^{3,4}・寺正行¹ (¹農工大院工、²奈良女大理、³国立感染症研究所、⁴JST 未
来社会創造事業)

Synthesis of small molecules targeting G-quadruplexes formed on SARS-CoV-2 RNA (Graduate School of Engineering, Tokyo Univ. Agric. Technol.,¹ Faculty of Science, Nara-women Univ.,² Research Center for Drug and Vaccine Development, National Institute of Infectious Diseases,³ MIRAI, JST⁴) SASAKI, Shogo^{1,2}; NAKAJIMA, Shogo³; NOHARA, Rena¹; TAKEUCHI, Norito¹; IKEBUKURO, Kazunori¹; NAGASAWA, Kazuo¹; WATASHI, Koichi^{3,4}; TERA, Masayuki¹

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は、コロナウイルスの一種である SARS-CoV-2 により引き起こされる疾患である。SARS-CoV-2 は、ウイルスゲノムとして約 30kDa の一本鎖 RNA を有しており¹、当該 RNA 上で核酸の高次構造の一種であるグアニン四重鎖構造 (G4) の形成が報告されている。ウイルス RNA において G4 が安定化されると、ウイルスの複製や翻訳が阻害されることが複数のウイルスで報告されており、ウイルス由来の G4 は抗ウイルス薬の新たな分子標的として期待される^{2,3}。G4 標的型抗ウイルス薬の探索戦略では、ウイルス特有の G4 構造 (宿主細胞にはない G4) を取得し、それに特異的に結合する低分子化合物を得ることが重要である。こうした創薬標的となる G4 を取得するために、配列情報から G4 を予測するツール (G4 予測器) が開発されてきた。これらを用いて SARS-CoV-2 ゲノム上から G4 が探索されたが、当該ゲノムにはグアニンが 3 つ以上連続する配列が少ないため、精度の高い G4 予測が困難である。最近、当研究室では、G4 リガンドの一種である 6OTD-Pyrene を用いた G4 スクリーニング法により、新たな G4 形成配列 (SC-2) の同定に成功した⁴。本配列は、G4 構造内の G-quartet 平面は 2 層であり、これらを繋ぐループ配列が 12 塩基と長く、既存の G4 配列からは逸脱した特徴を有していた。そこで本研究では、SC-2 が抗ウイルス薬の新たな標的としての可能性を評価するために、SC-2 を標的とした新しい抗ウイルス活性候補化合物の探索を目的とした。

当研究室が有する化合物ライブラリーから、SC-2 G4 と相互作用する化合物を探索するためにチアゾールオレンジ (TO) 追い出し実験によるスクリーニングを行った。その結果、ビスウレア基またはビスチオウレア基を有する化合物群 (BU または BT) が SC-2 G4 と強く相互作用することがわかった (Figure 1)。また、BU および BT の SARS-CoV-2 に感染させた VeroE6/TMPRSS2 細胞に対する抗ウイルス活性を評価したところ、BU および BT は宿主細胞への毒性は示さずに (CC₅₀ > 10 μM) ウイルスを減少させることが示された (BU: IC₅₀ = 0.9 μM, BT: IC₅₀ = 1.2 μM)。その中でも BT は、抗 SARS-CoV-2 薬であるレムデシビル (RDV) よりも有意に増殖阻害活性が強いことがわかった。本発表では、BT および BU 化合物群の作用機序解析の結果について述べる。

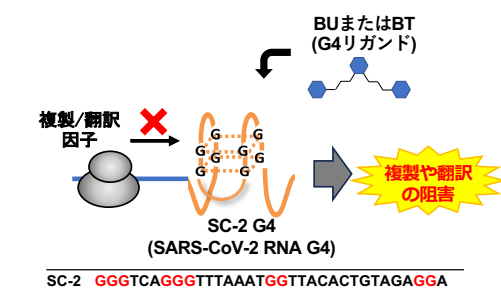


Figure 1 ビスウレア化合物 (BU) またはビスチオウレア化合物 (BT) によるSC-2 G4を介した複製および翻訳の制御

[references]

- 1) Z.-L. Shi, *et al.*, *Nature*, **2020**, 579, 270; 2) J. Amato, *et al.*, *Chem. Commun*, **2022**, 58, 11913; 3) S. N. Richter, *et al.*, *ACS Infect. Dis.*, **2019**, 5, 2127; 4) M. Tera, *et al.*, *Translat. Regulat. Sci.*, **2021**, 3, 89.

医薬応用を指向した化学合成に基づく高度化学修飾 mRNA の創出

○木村康明¹・岩井宏徒²・本間正一²・山田浩貴²・中本航介¹・稲垣雅仁¹・橋谷文貴¹・阿部奈保子¹・山本潤一郎²・阿部洋^{1,3} (¹ 名大院理、² 協和キリン株式会社、³ 糖鎖生命コア研究所)

Development of Chemically Modified mRNA based on Chemical Synthesis for Highly Efficacious mRNA Therapeutics (Graduate School of Science, Nagoya Univ.¹, Research Unit, Research Division, Kyowa Kirin Co., Ltd.², Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Nagoya University) KIMURA Yasuaki¹, IWAI Hiroto², HONMA Masakazu², YAMADA Hiroki², NAKAMOTO Kosuke¹, INAGAKI Masahito¹, HASHIYA Fumitaka¹, ABE Naoko¹, YAMAMOTO Junichiro², ABE Hiroshi^{1,3}

SARS-CoV-2 に対する mRNA ワクチンの開発を契機として、mRNA 医薬の開発研究が加速している。mRNA 医薬については、細菌・ウイルス抗原を用いる感染症ワクチン、癌特異的抗原を利用した癌ワクチン、遺伝子変異に起因する疾患に対するタンパク質補充療法など、多様な医薬応用が期待されている¹。しかし、mRNA 医薬の汎用化には、生体内での mRNA の安定性、翻訳効率の向上、望ましくない免疫応答の抑制、特定の組織や細胞を標的とする効率的な送達手段の開発、等の種々の課題が残っている。

こうした背景を踏まえ、我々は化学合成に基づく高度化学修飾 mRNA の開発に着手し、化学修飾が mRNA の翻訳活性・安定性に与える影響を体系的に評価した。mRNA の調製に化学合成²を用いることで、位置特異的に多様な化学修飾を精密に導入することが可能となり、従来の転写合成法では不可能であった構造活性相関の詳細な解析が可能となった。その結果、翻訳領域の特定の位置に核酸糖部修飾を導入することで、翻訳効率を維持したまま mRNA の生物学的安定性を大幅に向上できることを見出した。また、化学修飾パターンの精密な制御が、従来の *in vitro* 転写 mRNA よりも高い翻訳活性を実現する上で重要であることが示された。さらに、様々なヌクレオシドおよびリン酸誘導体を用いて非翻訳領域およびポリ A 配列の修飾を評価し、翻訳活性・安定性の向上に有効な化学修飾パターンを見出した。

近年では化学合成に基づく mRNA の医薬応用の可能性に注目され始めており³、本研究で得られた知見は、化学合成 mRNA 医薬の分子設計と機能向上において有益な指針を提供するものと考えられる。

References:

- [1] Rohner, E.; Yang, R.; Foo, K. S.; Goedel, A.; Chien, K. R., *Nat. Biotech.* **2022**, *40*, 1586.
- [2] Abe, N.; Imaeda, A.; Inagaki, M.; Li, Z.; Kawaguchi, D.; Onda, K.; Nakashima, Y.; Uchida, S.; Hashiya, F.; Kimura, Y.; Abe, H., *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17*, 1308.
- [3] Imani, S.; Tagit, O.; Pichon, C. *npj Vaccines* **2024**, *9*, 14.

遺伝子発現をホスト-ゲスト相互作用で制御可能な人工核酸の開発

○岡村秀紀^{1,2}・矢尾健行^{1,2}・永次史^{1,2} (1 東北大多元研、2 東北大院理)

Development of artificial nucleic acids for reversible control of gene expression via host-guest interaction

(Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University¹, Graduate School of Science, Tohoku University²) OKAMURA, Hidenori^{1,2}; YAO, Takeyuki^{1,2}; NAGATSUGI, Fumi^{1,2}

DNA の遺伝情報を転写・翻訳する遺伝子発現は根源的な生命現象であり、その理解と制御は医療技術やバイオテクノロジーの開発において大きな意義を持つ。近年では、人工的に設計・合成した DNA 遺伝子を用いる合成生物学研究が国内外で大きな潮流を生み出しており、遺伝子発現メカニズムの解明や人工細胞の構築、遺伝子治療への応用が期待されている。これら人工遺伝子を用いる研究において、遺伝子発現をオンデマンドに調節できる技術は、強力なツールとなり得る。このような背景のもと、本研究では、人工遺伝子の精密な可逆発現制御を目的として、ホスト-ゲスト相互作用を駆動力として二重鎖形成を可逆制御できる人工核酸の開発を目指した。具体的には、ククルビット[7]ウリル (CB[7]) と結合するゲスト分子を修飾したアデノシン誘導体 (Guest_dA) を設計した (Fig. 1)。本誘導体を組み込んだ DNA は、相補配列のチミジンと塩基対を形成し、安定な二重鎖を形成する。一方、CB[7] の存在下では、強固かつ嵩高い CB[7]-ゲスト複合体を形成し¹、二重鎖構造を解離すると考えられる。さらに、CB[7] に対してより強く結合するゲスト分子を添加することでゲスト交換が生じ、二重鎖構造の再形成を誘起できると期待した。

まず、種々の Guest_dA を組み込んだ DNA を化学合成し、ホスト-ゲスト相互作用に基づく可逆的な二重鎖形成を評価した。その結果、Guest_dA を組み込んだ二重鎖 DNA は、CB[7] の添加によって大きく不安定化し、CB[7] と可逆的に結合するゲスト分子を追加することで再安定化することを確認した。また、アデノシンに導入するゲスト分子の構造を変えることにより、可逆制御の速度を調整できることも見出した。

次に、T7 プロモーター配列の特定の位置に Guest_dA を導入した DNA を用いて、無細胞発現系における RNA への転写及びタンパク質への翻訳について検討した (Fig. 2)。その結果、転写及び翻訳いずれも CB[7] の会合と解離による可逆制御に成功し、遺伝子発現を制御できることを明らかにした²。発表では、Guest_dA の分子設計と二重鎖形成可逆制御の詳細、ならびに遺伝子発現制御について議論する。

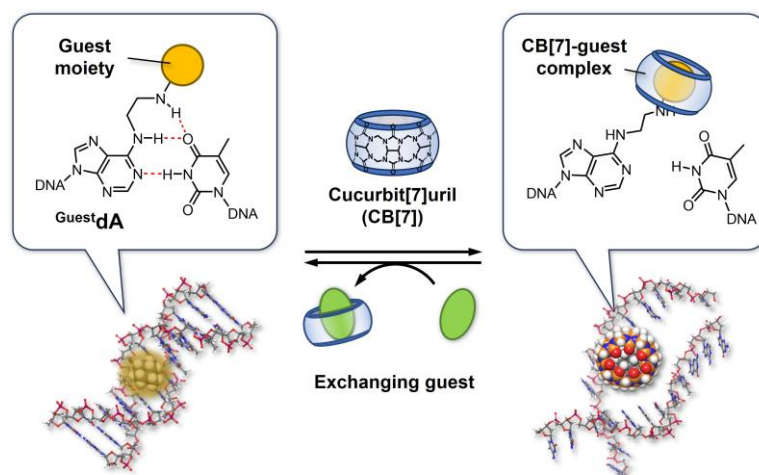


Figure 1. Design of the guest-modified adenosines (Guest_dA) for reversible control of duplex formation via host-guest interaction.

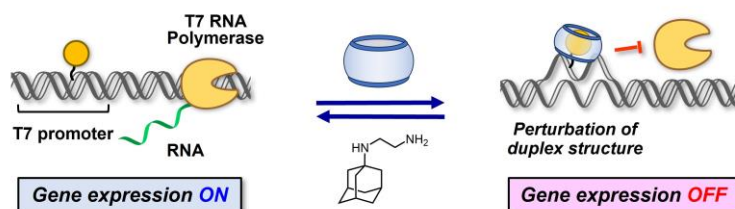


Figure 2. Reversible control of gene expression via host-guest interaction.

¹ S. Liu, C. Ruspice, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, P. Y. Zavalij, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15959.

² H. Okamura, T. Yao, F. Nagatsugi, *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, DOI: 10.1021/jacs.4c04262.

In-cell NMR 法によるヒト細胞内における HIV Tat 捕捉 RNA アプタマーと標的分子との相互作用の解析

○山置佑大^{1,2}・Eladl Omar^{1,2}・近藤敬子¹・永田崇^{1,2}・片平正人^{1,2} (1京大エネルギー理工学研究所、2京大院エネルギー科学)

In-cell NMR study on the interaction of HIV Tat-binding RNA aptamer with its target molecule in living human cells (Institute of Advanced Energy, Kyoto University¹, Graduate School of Energy Science, Kyoto University²) YAMAOKI Yudai^{1,2}; ELADL Omar^{1,2}; KONDO Keiko¹; NAGATA Takashi^{1,2}; KATAHIRA Masato^{1,2}

RNA アプタマーは標的分子に高い親和性で結合する機能性 RNA の総称であり、細胞内分子を標的とした RNA ドラッグとしても期待されている。標的分子が存在する生きた細胞内は様々な生体分子が密に存在する分子混雑環境であり、RNA の構造、ダイナミクス、蛋白質との相互作用が従来の試験管内とは必ずしも一致しない^{1,2}。そのため、RNA アプタマーを用いたドラッグ開発には、細胞内における RNA アプタマーの構造および標的分子との相互作用解析が重要である。細胞内 RNA の構造情報を得るために、in-cell NMR 法^{3,4}は強力な手法であるが、ヒト生細胞内核酸の in-cell NMR スペクトルの報告は、一次元の NMR スペクトルに限られており、¹H-¹³C および ¹H-¹⁵N HMQC のような異種核二次元 NMR スペクトルの報告はなかった。この一因として、in-cell NMR 測定用の細胞試料調製に必要な大量の ¹³C, ¹⁵N 標識 RNA の調製が高価であることが挙げられる。本研究では、HIV-1 Tat タンパク質に対し、ヒト生細胞内においても高い捕捉・不活化能を有する RNA アプタマー(TAp)について、大腸菌発現系を用いることで、比較的安価な ¹³C, ¹⁵N 標識体の大量調製系の確立に成功した⁵。

調製した TAp を Tat のモデル分子であるアルギニンアミドおよび Tat の部分ペプチドとの複合体としてヒト生細胞内へと導入し、1D ¹H-NMR, ¹H-¹³C HMQC および ¹H-¹⁵N HMQC スペクトルを取得した。これにより、ヒト生細胞内核酸の二次元 NMR 測定に世界で初めて成功した⁵。試験管内および細胞内のスペクトルを比較した結果、いくつかのシグナルの化学シフトが異なることが見出された。一方で、両者のスペクトルは基本的にはよく似ていることが示された。ここから、ヒト細胞内において、TAp は試験管内と局所的に異なる構造を形成しつつも、全体としてはよく似た複合体構造を形成していることが示唆された^{5,6}。特に、複合体形成時にのみ観測される U-A*U ベーストリプル構造に由来するシグナルが観測された(図 1、破線四角)ことから、この特殊な塩基対がヒト生細胞内においても形成されていることが示された(図 1)⁶。当研究室の試験管内における先行研究において、TAp は Tat 結合時に U-A*U ベーストリプルを形成することで、主溝部分を大きく開口し、標的分子にアクセスすることが示されていた。今回の結果より、ヒト生細胞内においても、U-A*U ベーストリプルの形成によって標的分子への高い結合能を発揮していることが示唆された。これらの細胞内 RNA アプタマーの構造および相互作用様式の解析はアプタマーベースのドラッグ開発において有用な知見と期待される。

(1) Yamaoki *et al.*, (2022) *Nat. Commun.* 13, 7143. (2) Sakamoto & Yamaoki *et al.*, (2021) *Chem. Commun.* 57, 6364. (3) Yamaoki *et al.*, (2018) *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20, 2982. (4) Yamaoki *et al.*, (2020) *Biophys. Rev.* 12, 411. (5) Eladl & Yamaoki *et al.*, (2023) *Chem. Commun.* 59, 102. (6) Eladl & Yamaoki *et al.*, (2023) *Int. J. Mol. Sci.* 24, 9069.

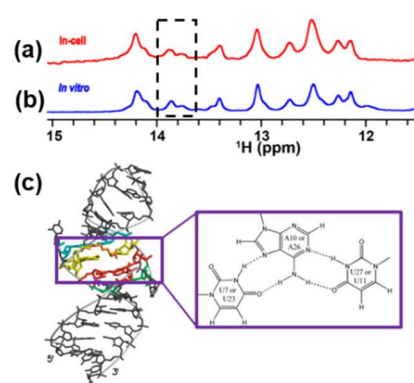


図 1. 細胞内(a)および試験管内(b)における TAp-Tat ペプチド複合体の NMR スペクトル. (c) TAp の U-A*U ベーストリプル構造.

一般口頭発表 | 核酸関連

核酸関連

座長：愛場 雄一郎（名古屋大学）

2024年9月12日(木) 15:10 ～ 16:30 B会場 (大会議室102)

[1OB-08] 3脚型キノン-シアニン色素の光増感活性によるガン細胞選択的アポトーシス誘導

*村元 順哉¹、坂本 隆^{1,2}（1. 和歌山大学システム工学研究科、2. 和歌山大学システム工学部）
15:10 ～ 15:30

[1OB-09] 非環状型 XNAの化学的鎖伸長反応のメカニズム解析と高効率化

*村山 恵司¹、沖田 ひかり¹、浅沼 浩之¹（1. 名古屋大学大学院工学研究科）
15:30 ～ 15:50

[1OB-10] Ru錯体からの三重項エネルギー移動を利用した部位特異的 DNA光架橋

*樫田 啓¹、東 秀憲¹、五月女 光²、宮坂 博²、浅沼 浩之¹（1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 大阪大学大学院基礎工学研究科）
15:50 ～ 16:10

[1OB-11] 人工リボ"スイッチ"の開発と無細胞合成生物学への応用

*福永 圭佑^{1,6}、石井 裕太²、大谷 俊貴²、寺本 岳大³、中島 ももか³、勝木 陸⁴、クーニー エイリーン^{1,5}、角田 佳充³、横林 洋平⁶、松浦 友亮¹（1. 東工大ELSI、2. 東工大院生命理工、3. 九大院農、4. 電通大院情報理工、5. インペリアル・カレッジ・ロンドン、6. OIST）
16:10 ～ 16:30

3 脚型キノン-シアニン色素の光増感活性によるガン細胞選択的アポトーシス誘導

○村元順哉¹・坂本隆^{1,2} (¹和歌山大院シス工、²和歌山大シス工)

Cancer-selective apoptosis induction by the photosensitizing activity of tripodal quinone-cyanine dyes
(Graduate School of Systems Engineering, Wakayama University¹, Faculty of Systems Engineering, Wakayama University²) MURAMOTO, Junya¹; SAKAMOTO, Takashi^{1,2}

非標準的な核酸構造の1つである G4 DNA は、染色体テロメア領域や、種々のがん関連遺伝子のプロモーター領域にも多く存在し、がんの光線力学療法 (PDT) の標的になると期待されている。そのため、G4 DNA を標的とした光増感剤 (PS) が求められているが、フタロシアニン¹⁾ やポルフィリン²⁾ などの骨格を除くと現状報告例が非常に少なく、新たな PS の開発が求められている。

本研究では、G4 DNA を標的とした新しい骨格の PS を開発することを目的に、3 脚型キノン-シアニン色素 (QCy(RBT)₃) (図 1) に注目した。QCy(RBT)₃ は G4 DNA への親和性が非常に高い G4 DNA 蛍光イメージングプローブである^{3), 4)}。一方でこれら 2 つの化合物の蛍光量子収率は 0.02 程度と非常に小さいため、光励起により活性酸素種 (ROS) を放出する可能性が高い。これらのことから、QCy(RBT)₃ は G4 DNA を標的とし、ROS を放出する優れた PS となる可能性がある。そこで本研究では QCy(RBT)₃ の PS としての機能評価を試みた。

QCy(RBT)₃ をヒト子宮頸がん由来細胞 (HeLa 細胞) に導入し光毒性 (530 nm) を確認したところ、特に QCy(BnBT)₃ の場合に顕著な細胞生存率の減少が確認された。光照射による細胞死の要因を調べる為に SOSG を用いて細胞内 ROS を調べたところ、光照射により細胞内 ROS が優位に増加していることが確認できた。また JC-1 を用いてミトコンドリアの膜電位を調べたところ、光照射によりミトコンドリアの脱分極が誘導されていると明らかになり (図 2)、アポトーシスの誘導が示唆された。光毒性の細胞種依存性を調べたところ、光照射後の HeLa 細胞の生存率がヒト正常腎由来細胞 (HEK293 細胞) に比べ約 41% 低く、一定のがん細胞選択性を有していることが明らかになった。以上から QCy(BnBT)₃ は G4 DNA を標的とした PDT の新たな PS として一定の有用性があることが確認され、3 脚型キノン-シアニン骨格が、ガン PDT の PS を設計するための新たな骨格になりうることを示唆された。

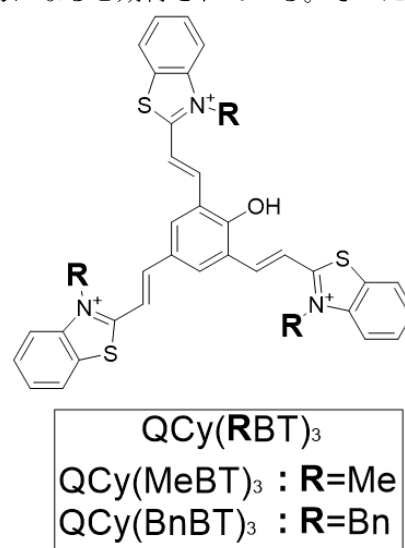


図 1 3 脚型キノン-シアニン色素の構造

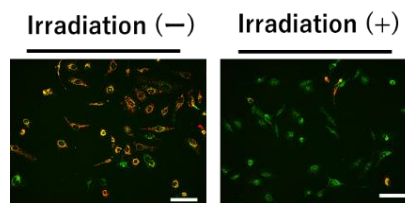


図 2 QCy (BnBT)₃ による HeLa 細胞ミトコンドリア損傷. [QCy (BnBT)₃] = 15 μM in 5 % Glucose, [JC-1] = 15 μM in DMEM (10% FBS). Scale bar = 100 μm. 赤色蛍光は高い膜電位を、緑色蛍光は低い膜電位を表す。

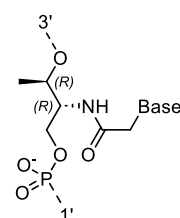
- 1) K. Kawauchi, W. Sugimoto, T. Yasui, K. Murata, K. Itoh, K. Takagi, T. Tsuruoka, K. Akamatsu, H. Tateishi-Karimata, N. Sugimoto, D. Miyoshi, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 221.
- 2) Li. Zhu, S. Shi, L. Yang, M. Zhang, K. Liu, L. Zhang, *RSC Adv.* **2016**, 6, 13080
- 3) T. Sakamoto, Z. Yu, Y. Otani, *Anal. Chem.* **2022**, 94, 4269–4276.
- 4) Y. Muraoka, J. Muramoto, Y. Yasuhara, K. Mayuko, T. Sakamoto, *Anal. Chem.* **2023**, 95, 17162–17165.

非環状型 XNA の化学的鎖伸長反応のメカニズム解析と高効率化

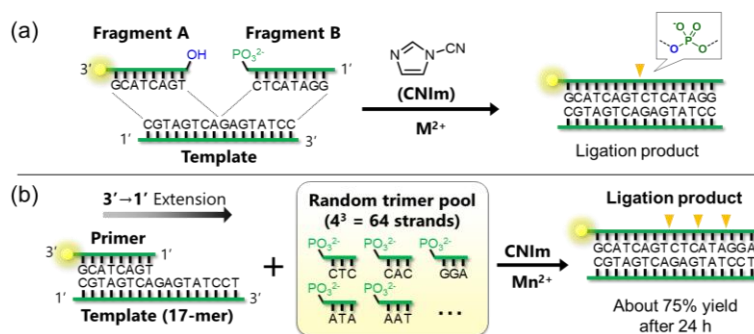
○村山恵司¹・沖田ひかり¹・浅沼浩之¹ (¹ 名大院工)

Rapid chemical primer extension reaction of acyclic XNA by elucidation of mechanism. (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.¹) MURAYAMA, Keiji¹; OKITA, Hikari¹; ASANUMA, Hiroyuki¹

我々はこれまでに、DNA の糖骨格を改変した人工核酸 Xeno Nucleic Acid (XNA)として、Serinol Nucleic Acid (SNA)と *acyclic* Threoninol Nucleic Acid (*a*TNA)を開発してきた¹。中でも L 体の *a*TNA(図 1)は相補的な *a*TNA と極めて安定な二重鎖を形成するだけでなく、DNA や RNA とともに二重鎖形成することを明らかにした。これまでに、L-*a*TNA の複製反応構築を目指し、化学ライゲーション(図 2a)を利用した非酵素的な鎖伸長反応の開発を行ってきたが、9 残基の伸長に成功したのみで、長鎖の鎖伸長は困難であった(図 2b)²。本研究では、金属イオンの影響や反応の速度論を詳細に解析することで、鎖伸長反応の高効率化を検討した。

図 1. L-*a*TNA の構造

まずは、系中の金属イオン種の影響を評価した結果、Mn²⁺から Cd²⁺, Ni²⁺, Co²⁺などに変更することでケミカルライゲーションは大幅に高速化されることが確認された(図 3a)。この現象は DNA でも同様に観測され、これまで反応が遅かった DNA の連結も高速化することに成功した(図

図 2. L-*a*TNA の(a)ケミカルライゲーションと(b)鎖伸長反応

3b)。また、試薬濃度の影響や NMR 解析の結果、ライゲーションの律速はリン酸基の活性化段階であることが明らかとなり、L-*a*TNA の 3'リン酸が銕型との二重鎖形成によって適切な配向に固定されている場合に、活性化速度が顕著に増大することを明らかにした(data not shown)。反応機序解析の結果をもとに、金属イオンとして Cd²⁺を用い、伸長方向を 3'→1'から 1'→3'に変更した結果、鎖伸長反応は顕著に高効率化し、7つのフラグメントの取り込みによる 21-mer の伸長を達成した(図 3c)³。

以上のように、ポリメラーゼ鎖伸長に相当する反応を、人工核酸 L-*a*TNA で酵素を利用せず実現することに成功した。本システムは人工生命の遺伝子システム・原始生命の遺伝子モデルとして重要であるだけでなく、SELEX 法に応用することで、L-*a*TNAzyme や L-*a*TNA アプタマーなど新規 XNA ツールの開発も期待できる。

1. K. Murayama, *et al.*, ChemBioChem, 22, 2507-2515 (2021).

2. K. Murayama, *et al.*, Nat. Commun., 12, 804 (2021).

3. H. Okita, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 145, 17872-17880 (2023).

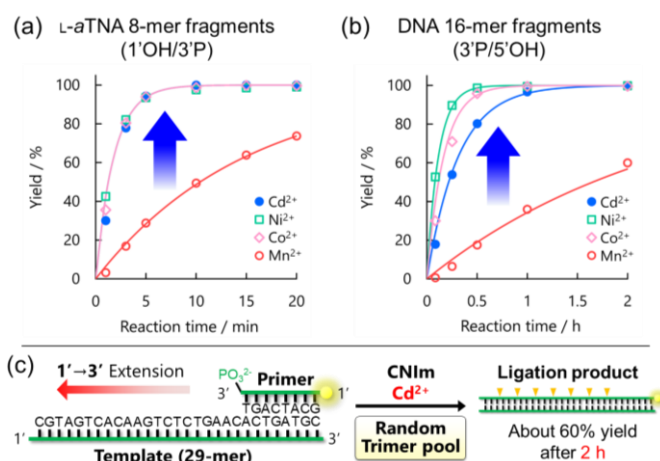


図 3. (a) L-*a*TNA 及び(b) DNA ケミカルライゲーション速度の金属依存性, (c) 最適化鎖伸長スキーム(21-mer 伸長)

Ru 錯体からの三重項エネルギー移動を利用した部位特異的 DNA 光架橋

○樫田啓¹・東秀憲¹・五月女光²・宮坂博²・浅沼浩之¹

(¹名大院工、²阪大院基礎工)

Site-specific DNA photocrosslinking by using triplet energy transfer from Ru complex (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.¹, Graduate School of Engineering Science, Osaka Univ.²) KASHIDA, Hiromu¹; AZUMA, Hidenori¹; SOTOME, Hikaru²; MIYASAKA, Hiroshi²; ASANUMA, Hiroyuki¹

DNA 二重鎖の光架橋は二重鎖やナノ構造体の安定化などのために幅広く利用されている。当研究室ではスチルベン誘導体の[2+2]光環化付加反応を利用した DNA 光架橋法を報告している¹。また、スチルベンの化学構造を改変することで励起波長を制御可能であることを明らかにした²。しかしながら、従来の手法では励起波長にオーバーラップがあるため、複数の光反応性部位を独立に制御することは困難であった。そこで、本研究では Ru 錯体を利用した部位特異的 DNA 光架橋法の開発を目指した。具体的には、スチルベンペアを DNA 二重鎖に導入し、Ru(bpy)₃ 錯体を三重鎖形成核酸に導入した (Fig.1 左)。スチルベンは可視光を吸収しないため、Ru 錯体非存在下では可視光を照射しても反応しない。一方、三重鎖を形成した際には、可視光を照射することで Ru 錯体を選択的に励起される。更に、スチルベンへの三重項—三重項エネルギー移動 (TTET) が進行することでスチルベンの光二量化反応が進行することを期待した。TTET は極めて近距離においてのみ進行するため、Ru 錯体が近接した部位のみ特異的に反応が進行することが期待できる。

まず、スチルベンのみを導入した二重鎖に対し可視光を照射したところ、吸収スペクトルが変化せず全く反応が進行しないことがわかった。一方、Ru 錯体導入 TFO を加えた三重鎖に対して可視光を照射したところ、スチルベンの吸収が速やかに減少した (Fig.1 右)。このことは、スチルベンによる[2+2]光環化付加反応が進行したことを示している。一方、Ru 錯体を反対側に導入した三重鎖では全く反応が進行しないことがわかった。このことは、Ru 錯体からのエネルギー移動が強い距離依存性をもつことを示している。量子化学計算の結果、Ru 錯体の三重項エネルギーがスチルベンよりも高いことから TTET を介して反応が進行していることが明らかとなった。更に、スチルベンを 2 ペア導入した三重鎖を利用することで DNA 二重鎖の部位特異的な光架橋が可能であることがわかった。以上のように、Ru 錯体からの三重項エネルギー移動を利用することで部位特異的な DNA 光架橋法の開発に成功した³。

1. H. Kashida, T. Doi, T. Sakakibara, T. Hayashi, H. Asanuma, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7960-7966.
2. T. Doi, H. Kawai, K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 10533-10538.
3. H. Kashida, H. Azuma, H. Sotome, H. Miyasaka, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2024**, *63*, e202319516.

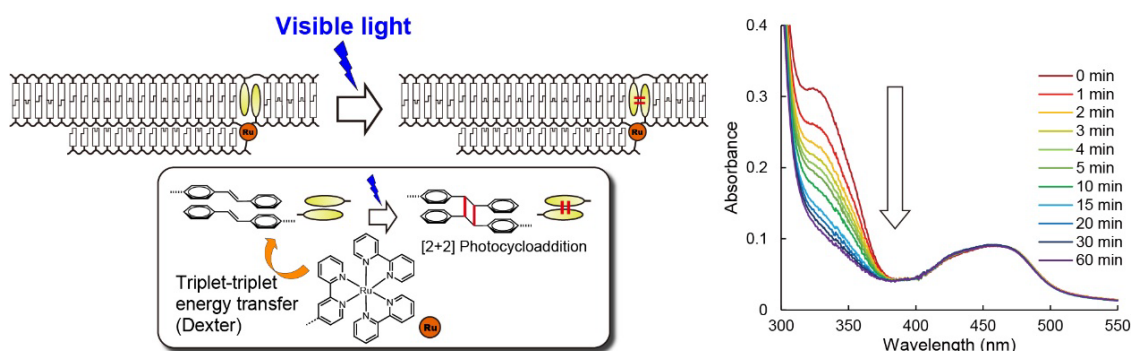


Fig. 1. Illustration and absorption spectra of photo-crosslinking reaction mediated by Ru complex.

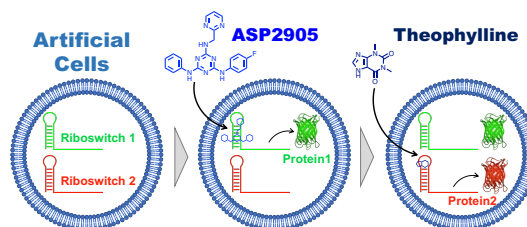
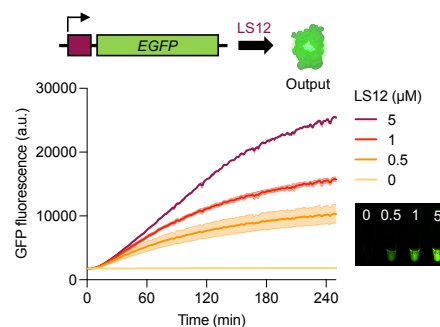
人工リボスイッチの開発と無細胞合成生物学への応用

○福永圭佑^{1,6}・石井裕太²・大谷俊貴²・寺本岳大³・中島ももか³・勝木陸⁴・
Cooney Aileen^{1,5}・角田佳充³・横林洋平⁶・松浦友亮¹ (¹東工大 ELSI、²東工大院
生命理工、³九大院農、⁴電通大院情報理工、⁵インペリアル・カレッジ・ロンドン、
⁶OIST)

Development of synthetic riboswitches and its applications in cell-free synthetic biology (¹Earth-Life Science Institute, and ²Graduate School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, ³Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Kyushu University, ⁴Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications, ⁵Molecular Sciences Research Hub, Imperial College London, ⁶Nucleic Acid Chemistry and Engineering Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University) FUKUNAGA, Keisuke^{1,6}; ISHII, Yuta²; OHTANI, Toshitaka²; TERAMOTO, Takamasa³; NAKASHIMA, Momoka³; KATSUKI Riku⁴; COONEY, Aileen^{1,5}; KAKUTA, Yoshimitsu⁴; YOKOBAYASHI, Yohei⁶; MATSUURA, Tomoaki¹

合成リボスイッチは遺伝子発現調節、特に、翻訳制御を行うための RNA スイッチであり、リガンド認識を担うアプタマー配列を含む。進化分子工学の手法 (SELEX) で取得した RNA アプタマーを利用することで任意のリガンド分子に応答する合成リボスイッチを創り出すことが可能である。以前の研究で、バクテリオファージに提示させた RNA 結合タンパク質 (RBP) 変異体ライブラリーと RNA ライブラリーを試験管内で共進化させる手法 (PD-SELEX 法) を用いることで、人工 RNA-RBP ペア 2 組 (CS1-LS4, CS2-LS12) を取得することに成功していた¹。最近、PD-SELEX 法で取得した RNA-RBP ペア 2 組の X 線共結晶構造解析を行うことに成功した²。また、これら RNA-RBP ペアを用いて、無細胞タンパク質合成系で機能するタンパク質応答型リボスイッチを開発した。これまでに 3 桁の ON/OFF 比を示すセルフフリーリボスイッチは報告されていなかったが、リボスイッチ配列を 2 段階で最適化することにより、ON/OFF 比 500 に匹敵する高性能リボスイッチを創り出すことに成功した²。複数のリボスイッチを組み合わせたカスケード回路 (人工遺伝子回路) の構築も試みており、これらも紹介したい。

前述のタンパク質応答型リボスイッチを開発した際、設計原理を用い、ASP2905³ やテオフィリンなど低分子リガンドに結合する既知の RNA アプタマーを使ったセルフフリーリボスイッチも開発した。これら 2 組のリボスイッチを無細胞タンパク質合成系と共に人工細胞 (リポソーム) 内に封入し、異なる 2 つのレポーター遺伝子の発現を直交的・経時的に制御することに成功した⁴。



- 1) Fukunaga and Yokobayashi, *Nucleic Acids Res.* 50, 601-616 (2022)
- 2) Fukunaga, Teramoto *et al.*, *manuscript in preparation*
- 3) Fukunaga *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 145, 7820-7828 (2023)
- 4) Ishii *et al.*, *Chem. Commun.* 60, 5972-5975 (2024)

一般口頭発表 | ペプチド

ペプチド

座長：森本 淳平（東京大学）

2024年9月12日(木) 16:40 ～ 17:40 B会場 (大会議室102)

[1OB-12] 化学反応の選択性を制御する機能性アミロイド

*澤崎 鷹¹、村井 颯馬¹、山本 快¹、佐々木 大輔¹、相馬 洋平¹（1. 和歌山県立医科大学薬学部）

16:40 ～ 17:00

[1OB-13] コアセルベート形成のための抗体スキャホールド創製と抗体の細胞内送達

*川口 祥正¹、清川 めぐみ¹、二木 史朗¹（1. 京都大学化学研究所）

17:00 ～ 17:20

[1OB-14] 保護基の使用を最少化する逆伸長型ペプチド合成法

巽 俊文¹、笹本 晃生¹、松本 拓也¹、平野 遼¹、及川 和輝¹、中野 真人²、吉田 勝²、*生長 幸之助^{1,2}、金井 求¹（1. 東京大学大学院薬学系研究科、2. 産業技術総合研究所 触媒化学融合研究センター）

17:20 ～ 17:40

化学反応の選択性を制御する機能性アミロイド

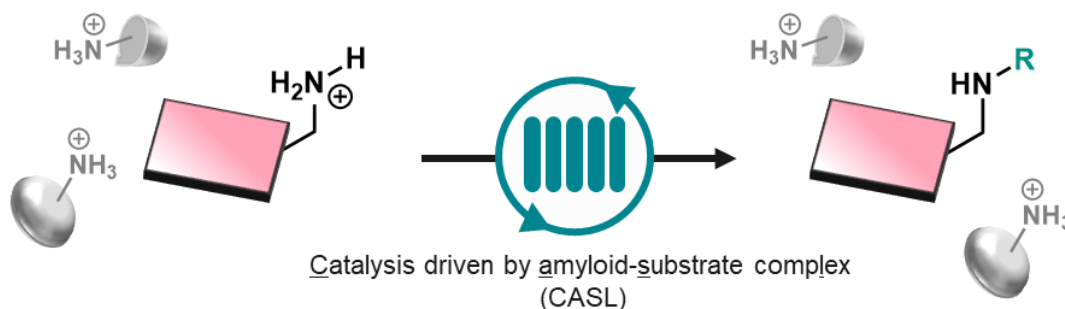
○澤崎鷹・村井颯馬・山本快・佐々木大輔・相馬洋平（和歌山県医大薬）

Functional Amyloids that Control Selectivity on Chemical Transformations (School of Pharmaceutical Sciences, Wakayama Medical University) SAWAZAKI, Taka; MURAI, Fuma; YAMAMOTO, Kai; SASAKI, Daisuke; SOHMA, Youhei

医薬品や高機能性材料などは多段階の化学反応を経て合成されるため、合成の短工程化は、より低コストかつ迅速な供給を実現する。したがって、化学反応を所望の基質や部位でのみ促進できる方法論の開発は、保護・脱保護などの位置制御のための反応や精製工程の省略ないし簡略化に直結するため、重要な研究の一つである。我々は、ペプチドの β シートが垂直に積み重なり形成されるアミロイドと呼ばれる線維状のペプチド凝集体が化学反応の選択性を制御できることを見出した。

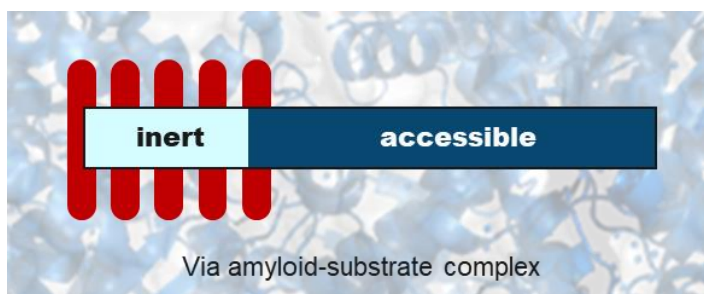
1. アミロイドと基質の複合体形成を起点にした触媒反応（CASL）

アミリン（膵ホルモン）に由来するヘキサペプチド Ac-Asn-Phe-Gly-Ala-Ile-Leu-NH₂ からなるアミロイドは、アミロイド結合性の基質が有するアンモニウムイオンの修飾化を促進できることを見出した¹。結晶構造解析の結果、アミロイドの Phe-Gly 間のアミド基が、アミロイドと基質の複合体形成時において、基質アンモニウム基を活性化していることが明らかになった。この結果、例えばアミロイドには結合しないタンパク質に含まれるリシン残基側鎖のアミノ基には反応せずに、アミロイドに結合する基質に対してのみ修飾化できる基質選択的な変換反応を実現した。



2. アミロイド協働型酵素反応

アミロイド結合性基質は、アミロイドとの複合体形成により酵素触媒反応から保護されることされることが見いだされた。本知見に基づき、基質のうち、アミロイドと結合する部位の近傍に存在する反応点はアミロイドによって保護される一方、遠隔位では酵素反応により変換することのできる反応を実現した。本結果は、アミロイドの活用により、酵素触媒反応に新たな位置選択性を付与できることを示している。



引用文献

1. T. Sawazaki, D. Sasaki, Y. Sohma *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2024**, 121, e2314704121.

コアセルベート形成のための抗体スキャホールド創製と抗体の細胞内送達

○川口祥正¹・清川めぐみ¹・二木史朗¹（¹京大化研）

Development of antibody scaffolds for coacervate formation and intracellular antibody delivery

(Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.¹) KAWAGUCHI, Yoshimasa¹; KIYOKAWA, Megumi¹; FUTAKI, Shiroh¹

抗体医薬は、その高い標的特異性と結合親和性により、現在、バイオ医薬品の最大のクラスを占めている。しかし、抗体は分子量が大きく親水性であることから、膜透過性に乏しく、細胞質にはほとんど移行せず、抗体医薬の創薬標的は細胞外分子に限定されている。細胞内には、抗体で容易に制御可能なタンパク質間相互作用や天然変性タンパク質など *undruggable* な標的が多数存在している。抗体を細胞内に導入できれば、高難度標的を制御するための新たな創薬モダリティとして発展させられるだけでなく、生命機能を明らかにするためのケミカルバイオロジーツールにもなりうる。よって、数多の高難度標的が存在する細胞質に抗体を導入する技術の開発ニーズが高まっている。これまで、抗体の細胞内送達技術として、細胞膜透過ペプチドやポリマー、脂質ナノ粒子が開発されているが、送達効率や調製の複雑さから創薬応用には至っていない。

コアセルベートは、静電的相互作用などによって液-液相分離することで均一な溶液が二つ以上の液相に分離して、高分子を含む濃縮相と溶媒を含む希薄相が入り混じった物体である。コアセルベートによってタンパク質や核酸、低分子を分画濃縮することで、プロトセルやマイクロリアクターなどが構築されている。また、コアセルベートは安全性の高い生体高分子や中分子、低分子化合物から形成されるため、薬物送達キャリアにおいても、高効率にカプセル化し、細胞内に送達することができることから次世代の細胞内送達技術として注目を浴びている。

我々は、クモ毒由来の膜傷害性ペプチドである M-lycotoxin の疎水面に位置する 17 残基目のロイシンをグルタミン酸に置換した L17E を開発し、抗体などの高分子と混合することで、細胞質に高分子を送達できることを見出している¹。そして、Fc 結合ペプチドと L17E の三量体を結合した FcB(L17E)₃ は蛍光分子である Alexa488 標識した抗体 (IgG-Alexa) と混合することで、コアセルベートを形成し、短時間で一気に IgG-Alexa が細胞質に送達される²。その一方で、本コアセルベートには、Alexa488 標識が必要であり、修飾位置を制御できず、抗原認識能に影響を与える可能性がある。よって、コアセルベートを創薬応用に向けた抗体送達技術にするためには、蛍光標識を必要としない抗体スキャホールドの開発が必要である。

Alexa488 は 2 つのスルホン基とキサンテン構造を有することからコアセルベート形成には静電的相互作用やカチオン- π からなる液-液相分離が重要である可能性がある。そこで、本研究では、負電荷性のタグ配列を設計し、それを抗体に遺伝子工学的に融合した負電荷抗体スキャホールドを創製した。これらの負電荷タグ修飾抗体は FcB(L17E)₃ と混合することでコアセルベートを形成し、生理的条件下においても安定であることが示された。そして、本コアセルベートによって抗体が細胞質に導入され、細胞内の抗原分子を認識可能であることが明らかとなった。また、そのコアセルベートの物理化学的特性について検討したところ、ゲル様粒子である可能性が示唆された。以上の結果から、負電荷抗体スキャホールドと FcB(L17E)₃ によるコアセルベートは、抗体の細胞質送達技術として創薬研究や細胞制御ツールに展開できると期待される。

1. M. Akishiba, *et al.*, *Nat. Chem.* 9, 751-761 (2017).
2. T. Iwata, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 60, 19804-19812 (2021).

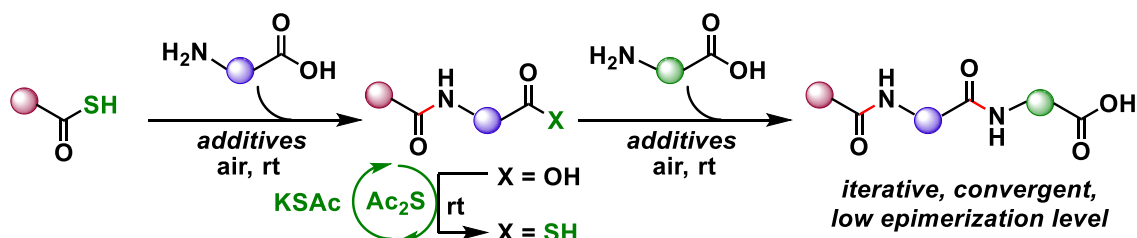
保護基の使用を最少化する逆伸長型ペプチド合成法

巽俊文¹, 笹本晃生¹, 松本拓也¹, 平野遼¹, 及川和輝¹, 中野真人², 吉田勝²,
○生長幸之助^{1,2}, 金井求¹ (¹東大院薬、²産総研)

Practical inverse peptide synthesis with minimal protecting groups (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo¹, Interdisciplinary Research Center for Catalytic Chemistry (IRC3), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)²) TATSUMI Toshifumi¹; SASAMOTO, Koki¹; MATSUMOTO, Takuya¹; HIRANO, Ryo¹; OIKAWA, Kazuki¹; NAKANO, Masato²; YOSHIDA, Masaru²; OISAKI, Kounosuke^{1,2}; KANAI, Motomu¹

ペプチドは低分子医薬と抗体医薬の両方の利点を兼ね備えた医薬品として注目されている。特に 5～10 残基長のペプチドは、中分子医薬品の代表格として広い応用が期待されている。天然型・非天然型問わず多様なアミノ酸構造を導入し、大量供給を達成するためには化学合成法が汎用されている。従来のペプチド化学合成法では、C 末端から N 末端に向かってペプチド鎖を伸ばしている (C to N 法)。しかし、この方法では高価な保護アミノ酸や縮合に由来する廃棄物が大量に発生し、環境負荷や製造コストが高くなる問題がある。従来法とは逆の伸長方向である N 末端から C 末端へのペプチド伸長反応 (N to C 法) は、主鎖無保護アミノ酸を利用できるため、これらの問題点を劇的に改善するポテンシャルを秘める手法とされてきたが、その開発は困難である。高効率なペプチド合成には、ペプチド伸長末端と原料アミノ酸を区別しながら伸長反応を進行させ、副反応であるエピメリ化を低く抑える必要がある。N to C 法においては、これらを同時に満たすことが極めて困難な課題とされてきたため、現状では C to N 法にもとづくペプチド合成法が広く用いられている。

このような背景のもと、我々は以前、ペプチド C 末端のカルボン酸をペプチドチオカルボン酸 (peptide thiocarboxylic acid, PTC) に 1 工程で変換する触媒系を報告した¹⁾。今回、PTC が活性型アシル基等価物とみなせることに着目し、PTC を用いた N to C 伸長型の液相ペプチド合成法の開発に取り組んだ。その結果、主鎖無保護のアミノ酸とのカップリング反応をペプチドチオ酸選択的な活性化によって実現することができた。ペプチドチオ酸の酸化的二量化反応から生成するジアシルジスルフィド中間体がカップリング反応の活性種となる。反応完結後に回収が容易で再利用可能な N-ヒドロキシピリドン誘導体の添加剤を用いることで、エピメリ化を大幅に抑制することに成功した。反応条件の最適化によって 6 時間以内に反応が完結し、立体障害の大きいアミノ酸やフラグメントカップリングにも適用可能であった。また、本反応はグラムスケールでも問題なく進行した。本反応を用いて、生物活性ノナペプチドである Delta Sleep Inducing Peptide (DSIP) のサブグラムスケールでの収束的合成に成功し、本手法の医薬合成における有用性を示した²⁾。



[Reference]

- 1) Matsumoto, T.; Sasamoto, K.; Hirano, R.; Oisaki, K.; Kanai, M. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 12222.
- 2) Tatsumi, T.; Sasamoto, K.; Matsumoto, T.; Hirano, R.; Oikawa, K.; Nakano, M.; Yoshida, M.; Oisaki, K.; Kanai, M. *Commun. Chem.* **2023**, 6, 231.

一般口頭発表 | DDS

DDS

座長：若林 里衣（九州大学）

2024年9月12日(木) 09:30 ～ 10:30 C会場 (中会議室202)

[1OC-01] クリックケミストリーの温度制御による高分子ミセルのデリバリー

*山田 創太¹、花岡 健二郎¹（1. 慶應義塾大学大学院薬学研究科）

09:30 ～ 09:50

[1OC-02] ナノ粒子ディップコート法による生体膜ハイブリッドの創製

*佐々木 善浩¹、水田 涼介²、右京 慶吾¹、澤田 晋一³、秋吉 一成⁴、金尾 英佑⁵、石濱 泰⁵、横山 達大^{1,6}、原田 浩之⁶（1. 京都大学大学院工学研究科、2. スクリプス研究所、3. 千葉大学sSIMVa、4. 京都大学大学院医学研究科、5. 京都大学大学院薬学研究科、6. 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）

09:50 ～ 10:10

[1OC-03] 抗体部位特異的修飾技術と組織移行性抗体 AccumBody®を使った標的組織への薬物送達技術

*伊東 祐二¹、吉矢 拓²、香月 康宏³、冨塚 一磨⁴（1. 鹿児島大学大学院理工学研究科理学専攻、2. 株式会社ペプチド研究所、3. 鳥取大学医学部生命化学科、4. 東京薬科大学生命科学部）

10:10 ～ 10:30

クリックケミストリーの温度制御による高分子ミセルのデリバリー

○山田 創太・花岡 健二郎（慶應大院薬）

Thermo-responsive click chemistry for drug delivery by polymeric micelles (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University) YAMADA, Sota; HANAOKA, Kenjiro

生体内の任意の標的組織に対して薬物をデリバリーするために、薬の運び屋である薬物キャリアの体内動態を体外から制御する技術に大きな期待が寄せられている。これまでに、体外に配置した磁石によって、磁性キャリアの体内動態を制御する技術が開発されてきた。しかし、磁場による引力は一過的であるため、磁石を取り外した後には効果が持続しないという課題がある。

そこで本研究では、体外からの加温によって不可逆的に架橋する薬物キャリアの開発を目指した。薬物キャリア同士の架橋によって大きな構造体を形成することで、加温組織における薬物キャリアの滞留性が増大し、加温組織への選択的なデリバリーに繋がると考えた。

具体的には、生体内でも特異的に共有結合を形成するアジドとアルキンを別々に導入した高分子ミセルのペアを設計した (Fig. 1)。また、これらのミセルの表面に、加温すると疎水性を示して収縮する温度応答性高分子を用いることで、アジド-アルキンのクリックケミストリーを介したミセルの架橋を温度で制御した。

各ミセルの応答温度は約 40°C に調節し、生理的温度である 37°C ではミセルは分散していた。一方、臨床でも適用可能な 42°C に加温した時には、ミセル表面の温度応答性高分子が相転移し、疎水性相互作用によってミセルは凝集した。さらに、高温時の高分子収縮によってミセル表面にアジドが露出することで、ミセル同士の架橋が誘導された。10 分間の加温によって、約 100 nm のミセルは約 2 μm の粒子を形成し、この構造体は加温を終了した後も維持されていた。このように、加温に応答して不可逆的に架橋する高分子ミセルの開発に成功した。続いて、担がんモデルマウスに対してペアとなるミセルを同時に尾静脈内投与したところ、腫瘍組織へのミセルの集積率は局所加温によって有意に増大し、この集積効果は投与 48 時間後も持続していた (Fig. 2)。このように、加温に応答したミセルの高効率なデリバリーに成功した。さらに、本技術を用いて抗がん剤であるドキソルビシンを腫瘍組織へデリバリーしたところ、1 回の処置によって半数以上のマウスで完治を達成した。

本研究で開発した高分子ミセルは、ハイパーサーミア装置など体内の深部まで局所加温可能な装置と併用することで、任意の組織への薬物デリバリーが可能になると期待される。

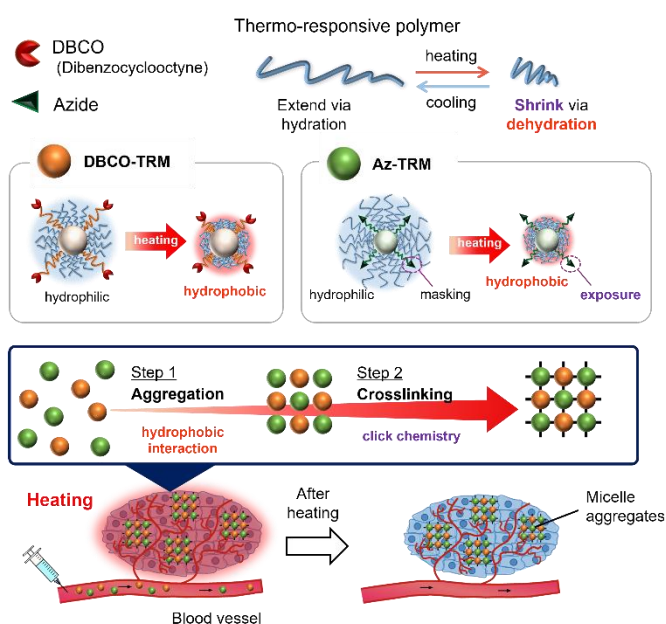


Figure 1. Thermally induced crosslinking of polymeric micelles

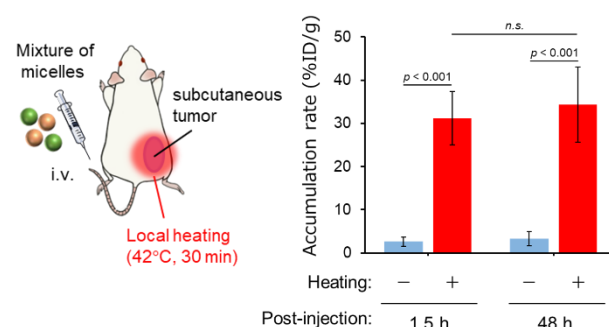


Figure 2. Targeted delivery to tumor tissues by local heating

このように、加温に応答したミセルの高効率なデリバリーに成功した。さらに、本技術を用いて抗がん剤であるドキソルビシンを腫瘍組織へデリバリーしたところ、1 回の処置によって半数以上のマウスで完治を達成した。

ナノ粒子ディップコート法による生体膜ハイブリッドの創製

○佐々木善浩¹・水田涼介²・右京慶吾¹・澤田晋一³・秋吉 一成⁴・金尾英佑⁵・石濱 泰⁵・横山達大^{1,6}・原田浩之⁶（¹京大院工、²Scripps 研究所、³千葉大 cSIMVa、⁴京大院医、⁵京大院薬、⁶東京医歯大院医歯）

Fabrication of Biomembrane Hybrids by Nanoparticle Dip Coating Method (Graduate School of Engineering Kyoto Univ.¹, The Scripps Research², Chiba University Synergy Institute for Futuristic Mucosal Vaccine Research and Development, Chiba Univ.³, Graduate School of Medicine, Kyoto Univ.⁴, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ.⁵, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Med. Dent. Univ.⁶) SASAKI, Yoshihiro¹; MIZITA, Ryosuke²; UKYO, Keigo¹; SAWADA, Shinichi³; AKIYOSHI, Kazunari⁴; KANAO, Eisuke⁵; ISHIHAMA, Yasushi⁵; YOKOYAMA, Tatsuhiro⁶; HARADA, Hiroyuki⁶

細胞外小胞やエンベロープウイルスをはじめとする生体膜に覆われたナノ粒子は生体内の様々なイベントに関わっている。こうした粒子は、その複雑な膜のもつ機能に由来する生体適合性やターゲティング能力を活かして、内包する核酸やタンパク質などを受容細胞へ伝達する天然のキャリアと言える。こうした優れた生体膜小胞をバイオ治療薬や DDS キャリアとして利用することが検討されているが、単離効率の悪さ、組成の不均一さや薬物のローディング効率の低さといった問題点が指摘されている。そこで近年、それら天然のキャリアに触発された人工的な生体膜ナノ粒子が研究されている。その中でも特に、有機-無機ハイブリッドマテリアルで構築された人工生体膜ナノ粒子が特に注目を集めている。

無機材料にはアップコンバージョンや半導体特性をはじめとするユニークで優れた磁気、光学、電気的特性を持つものが報告されている。こうした無機材料と生体膜小胞の複合化は無機物の潜在的な毒性を回避するだけでなく新たな造影法、治療法、バイオセンサーやナノマシンの開発につながる事が期待されている。従来、生体膜の被覆はエクストルーダーや超音波を用いた、物理的な膜の抽出と微粒子との融合による方法が一般的であった。しかし、これらの手法は、細胞の破壊と、生体膜の分離操作を必要とすることから、操作の煩雑さや生体膜の生来の機能の喪失など、多くの課題があり、生体膜ハイブリッド微粒子の効率的な作製手法の確立がのぞまれている。

本研究では無機微粒子をコアとする生体膜ハイブリッドの新規構築法の確立について検討をおこなった (Figure 1)。具体的には、密度勾配遠心により脂質膜が濃縮された脂質層を作製し、そこに対してナノ粒子を透過させる手法、すなわち、ナノ粒子ディップコート法 (NanoDIP 法) により、人工および天然の生体膜を効率的に被覆する手法を開発した。この手法は、均一にさまざまな組成の生体膜を被覆した粒子を高い収率で得ることができ、様々なナノ粒子の生体適合性を向上させながら、表面特性を変更し、機能化することができる。コアとなるナノ粒子として、シリカ粒子、ポーラス粒子、銀ナノ粒子などを用い、本手法がナノ粒子被覆のために汎用性があることを明らかにした。さらに、脂質膜被覆粒子表面に無細胞タンパク質発現系を利用した、自己組織的な膜タンパク質修飾についても検討した。

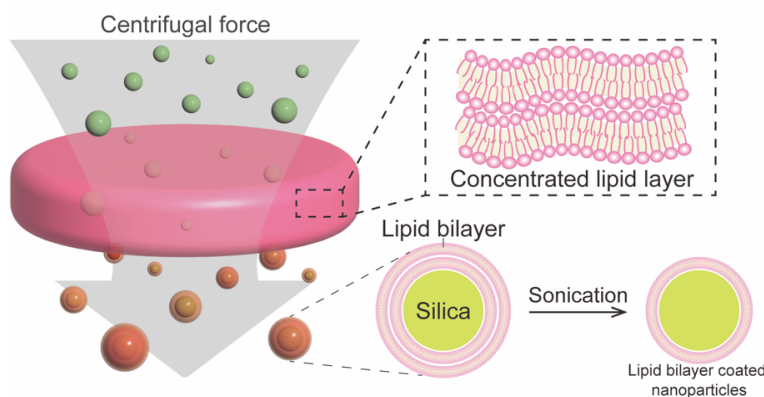


Figure 1. Schematic of lipid bilayer coating method by penetration of nanoparticles through a lipid layer concentrated by density gradient centrifugation.

抗体部位特異的修飾技術と組織移行性抗体 AccumBody®を使った 標的組織への薬物送達技術

○伊東祐二¹・吉矢拓²・香月康宏³・冨塚一磨⁴ (1 鹿児島大院理工、2 ペプチド研、
³ 鳥取大医、⁴ 東薬大生命科学)

Drug delivery system to target tissues using antibody site-specific modification technology and tissue-targeting antibody AccumBody (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima Univ.¹, Peptide Institute Inc.², Faculty of Medicine, Tottori Univ.³, Tokyo Univ. of Pharmacy and Life Science⁴) ITO, Yuji¹; YOSHIYA Taku²; KAZUKI Yasuhiro³; TOMIZUKA Kazuma⁴

抗体医薬品は、様々な疾患に対する治療薬として使用されており、現在 100 種以上の抗体医薬品が上市されている。抗体は、ADCC、CDC といった細胞殺傷活性をはじめ、阻害抗体や、シグナリング抗体といった様々な作用機序によってその薬効を発揮するが、最も重要な抗体の特性は、その特異的な分子標的能である。近年、この機能を活用して、副作用を抑えながらガンに対する薬剤（ペイロード）の特異的な DDS により高い治療効果を示しているのが、抗体薬物複合体（ADC）である。従来から、抗体を利用した薬物送達技術（DDS）が研究されてきたが、本発表では、DDS に必要な技術として、我々が開発した部位特異的な抗体修飾技術と、組織特異的な送達能を有する抗体 AccumBody®について報告する。

抗体に薬剤を連結させるための技術として、様々な部位特異的修飾技術が報告されている¹。我々は、ヒト IgG₁-Fc に特異的に結合する親和性ペプチド（IgG-BP、Z34C）を利用して、Fc 上の Lys248 の側鎖に親和性ペプチド自身を連結する方法を開発した^{2,3}。この CCAP 法と呼ぶ技術は、前もって、親和性ペプチドに機能性の薬剤を連結しておけば、容易に抗体の薬剤の部位特異的な付加が可能である。一方で、CCAP では、生成するコンジュゲートに親和性ペプチドが付加されているため、FcRn との結合が阻害され、血中半減期が短くなるという課題があった。そこで、その課題を解決するための tCAP 法という新たな技術を開発した。この tCAP 法は、抗体と反応後の生成コンジュゲートに親和性ペプチドが残存しないため、血中半減期の課題をクリアした方法である。発表では、これらの CCAP 法、tCAP 法の応用による種々の抗体コンジュゲートの特性について報告する。

一方、我々は、薬剤を標的部位、臓器に送達するための抗体、AccumBody®も開発してきた。脳、腸、筋に特異的な抗原に対する抗体を種々の方法で取得し、高い効率で、各臓器に移行・滞留する抗体を見出すことに成功した。例として、右図に、腸に特異的な抗原である GPA33 に対する抗体を蛍光標識後、尾静脈投与し、24 時間後に灌流・開腹した後の蛍光画像を示すが、腸への効率的な集積がみられることがわかる。

現在、AccumBody に CCAP 法、tCAP 法にて様々な薬剤（低分子、核酸、放射性同位体等）を導入した抗体コンジュゲートによる医薬品開発を進めており、これらのコンジュゲートの有用性、更なる応用について議論したい。

1. K. Yamada, & Y. Ito, ChemBioChem 20, 21, 2729-2737 (2019)
2. S. Kishimoto, et al., Bioconjugate Chem. 30, 3, 698-702 (2019)
3. S. Mori, et al., J. Biochem. 169, 1, 35-42 (2020)

腸AccumBody コントロール
抗体

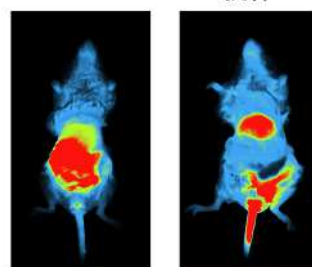


図 腸 AccumBody の腸移行性

一般口頭発表 | DDS

DDS・環境バイオ

座長：寺井 琢也（東京大学）

2024年9月12日(木) 10:40 ～ 12:00 C会場 (中会議室202)

[10C-04] クリッカブルな二反応性金ナノクラスターの合成と赤色光誘導アンケーシングへの応用

*渡邊 賢司^{1,2}、Mao Qiyue³、Zhang Zhouen²、畑 真知³、山本 康友¹、小寺 政人³、北岸 宏亮³、丹羽 節^{2,4,5}、細谷 孝充^{2,5}（1. 同志社女子大学薬学部、2. 理化学研究所生命機能科学研究センター、3. 同志社大学理工学部、4. 九州大学大学院薬学研究院、5. 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所）

10:40 ～ 11:00

[10C-05] 抗体の表面修飾による OLE-ZIP 蛋白質カプセルベースの蛋白質医薬品の送達手法の検討

*水野 稔久¹、高橋 孝介¹、西山 泰貴¹（1. 名古屋工業大学大学院工学研究科）

11:00 ～ 11:20

[10C-06] 抗原タンパク質修飾ペプチド超分子によるワクチン効果の評価

*若林 里衣¹、難波江 友紀¹、樋口 亜也斗¹、神谷 典穂^{1,2}、後藤 雅宏^{1,2}（1. 九州大学大学院工学研究院、2. 九州大学未来化学創造センター）

11:20 ～ 11:40

[10C-07] 土壌細菌内シトクロム P450の基質誤認識に基づく芳香族性化合物の微生物分解

*伊藤 史哉¹、有安 真也¹、唐澤 昌之¹、笠井 千枝¹、愛場 雄一郎¹、荘司 長三¹（1. 名古屋大学大学院理学研究科）

11:40 ～ 12:00

クリックブルな二反応性金ナノクラスターの合成と赤色光誘導アンケーシングへの応用

○渡邊賢司^{1,2}・Qiyue Mao³・Zhouen Zhang¹・畑真知³・山本康友¹・小寺政人³・北岸宏亮³・丹羽節^{2,4,5}・細谷孝充^{2,5} (1 同志社女大薬、2 理研 BDR、3 同志社大理工、4 九大院薬、5 医科歯科大生材研)

Synthesis of Clickable Bisreactive gold nanoclusters for red-light induced uncaging. (Fac. Pharm. Sci., Doshisha Women's College of Liberal Arts¹, RIKEN BDR², Fac. Sci. Eng., Doshisha Univ.³, Grad. Sch. Phar. Sci., Kyusyu Univ.⁴, IBB, Tokyo Med. & Dent. Univ.⁵) WATANABE, Kenji^{1,2}; MAO, Qiyue³; ZHANG, Zhouen²; HATA, Machi³; YAMAMOTO, Yasutomo¹; KODERA, Masahito³; KITAGISHI, Hiroaki³; NIWA, Takashi^{2,4,5}; HOSOYA, Takamitsu^{2,5}

金属ナノ粒子はイメージングやドラッグデリバリー、光線力学的療法 (PDT) など生命科学や創薬の分野において有用なナノ材料として注目を集めている。特に、小サイズの金ナノクラスター (<2 nm) は、高い化学安定性と光安定性を持ち、体内から適度に排泄されるため病態への集積性と生体適合性のバランスに優れている¹。近年では、マルチモダリティの観点から、複数の機能を持つナノ材料の開発に関心が集まっている。2 つ以上の異なる連結基を持つ金ナノクラスターは多機能ナノ材料を合成する上で重要な中間体となる。しかし、従来の金ナノクラスターの合成方法では、連結基が粒子上の様々な位置と量でランダムに導入され、均等に修飾された粒子を合成することが困難である (図 1A)。

本研究ではアジド基とアミノ基を一つずつ持つチオールペプチドで修飾された小サイズの金ナノクラスター (2 nm) を合成した (図 1B)²。従来のアジド基を持つ金ナノクラスターの合成では、塩化金 (III) 酸の強いルイス酸性と還元剤の影響で、アジド基の一部がアミノ基に還元されてしまう問題があった³。このため、アジド基とアミノ基を均等に金ナノクラスター上に配列することが困難であった。我々は、アジド基、アミノ基およびチオール基を持つトリペプチドの存在下、ナトリウムフェノキシドを用いて塩化金 (III) 酸を還元するとアジド基を損なうことなく金ナノクラスターが得られることを見出した (図 1B)。

次に、我々はこの二反応性ナノクラスターを多機能性ナノ材料の合成のための中間体として利用した。本中間体を用いることで、我々が開発した赤色光照射で抗がん剤を放出するインドリジンを母核とするケージド化合物³やアンケーシングのための光増感剤、環状 RGD ペプチドなどで修飾された種々の金ナノクラスターを簡単に合成することができた。最後に、これらの金ナノクラスターの抗がん活性をヒト肺がん由来の A549 細胞を用いて検証した。これらの金ナノクラスターは暗闇下ではほぼ細胞毒性を示さないが、赤色光照射条件において A549 細胞に対して顕著な細胞毒性を示した。

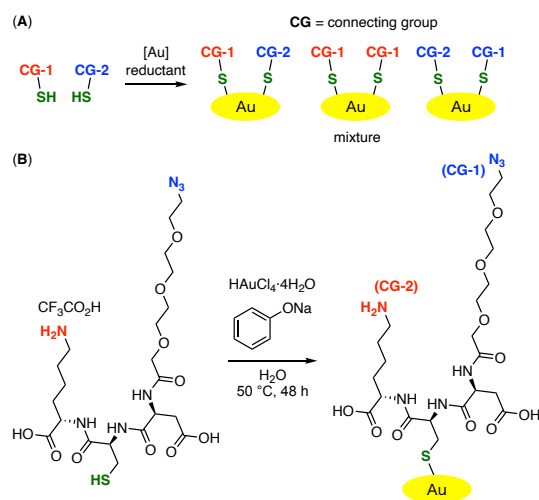


図 1. 異なる連結基を持つ二反応性金ナノクラスターの合成. (A) ランダムな導入法. (B) 等量のアジド基とアミノ基を持つチオールペプチドを用いた合成

1. M. F. Matus, H. Häkkinen, *Small* 17, 2005499 (2021)
2. K. Watanabe, Q. Mao, Z. Zhang, M. Hata, M. Koder, H. Kitagishi, T. Niwa, T. Hosoya, *Chem. Sci.* 15, 1402–1408 (2024)
3. K. Klein, K. Loza, M. Heggen, M. Eppele, *ChemNanoMat*, 7, 1330–1339 (2021)
4. K. Watanabe, N. Terao, I. Kii, R. Nakagawa, T. Niwa, T. Hosoya, *Org. Lett.* 22, 5434–5438 (2020); K. Watanabe, N. Terao, T. Niwa, T. Hosoya, *J. Org. Chem.* 86, 11822–11834 (2021); K. Watanabe, A. Kuratsu, D. Hashizume, T. Niwa, T. Hosoya, *Commun. Chem.* 5, 91 (2022)

抗体の表面修飾による OLE-ZIP 蛋白質カプセルベースの蛋白質医薬品の送達手法の検討

○水野 稔久・高橋 孝介・西山 泰貴（名工大院工）

A Study on Cytosolic Delivery Methods for Protein Pharmaceuticals Using Antibody-Surface-Modified OLE-ZIP Protein Capsules (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) MIZUNO, Toshihisa; Kousuke Takahashi

近年我々は、ツーヘリックスバンドル蛋白質の表面に疎水部と親水部を両端に偏らせて配置することで、リポソーム様の「蛋白質のみからなるカプセル」を構築できることを明らかにしている。具体的には、オレオシン由来の疎水ペプチド配列を疎水部、ヘテロコイルドコイルを形成するペプチド配列を親水部に採用した「OLE-ZIP」を設計し、これをエマルジョン法を用いて集合化させることで、200分子程度のゲスト蛋白質を安定に内包可能な、リン脂質二分子膜のような蛋白質シェルを持つ、蛋白質カプセルの構築に成功している (*Colloid and Interf. Sci. Commun.* **40**, 100352 (2021))。さらに、カプセル表面に IgG 抗体を表面修飾することで、細胞種選択的な蛋白質カプセルの細胞内への取り込みと、カプセル内部に内包された薬剤蛋白質の細胞内送達、さらに送達された薬剤蛋白質由来の薬理活性の発現まで可能であることも報告している (*Chem. Commun.* **60**, 968-971 (2024))。しかし、IgG 抗体の定常領域に結合活性を持つ Protein G 由来の結合ドメインを、OLE-ZIP 蛋白質カプセル表面に提示し、あとから IgG 抗体を非共有結合的に結合し利用していたため、血中投与時には他の IgG 抗体と入れ替わり、細胞種選択的な送達能が失われることが危惧された。そこで本研究では、EGFR に結合活性を持つ VHH 抗体を、リンカーペプチドを介して（共有結合的に）OLE-ZIP に複合化した VHH-OLE-ZIP を開発し、これと Trx-OLE-ZIP を混合し調製される OLE-ZIP 蛋白質カプセルの、細胞種選択的な薬剤蛋白質送達キャリアとしての機能評価を行った。

VHH-OLE-ZIP と Trx-OLE-ZIP を 1 : 9 の比で混合しエマルジョン法を適応することで、100~200 nm の粒子径を持つ球状カプセルが調製可能であることが、DLS、TEM 測定などから確認された。次にこのカプセルに対し FITC で蛍光ラベル化し、細胞種選択的な細胞内取り込み挙動が見られるか、CLSM、FACS などで評価を行った。なおこの時には、VHH と OLE-ZIP の間のリンカー部分の長さの異なる変異体 (VHH-OLE-ZIP-EV n , $n=0\sim2$) も合わせて評価を行った。その結果、添加 12 時間後以降から標的細胞（この場合には A431 細胞）の細胞内への取り込みが観測され、取り込み割合についてはリンカー部分の長さが長いことで向上が見られた。カプセル内部に、ガン細胞を死滅させる RNaseA、相同組み換えを誘導する Cre Recombinase などを内包し利用した場合にも、同様な細胞内への取り込み能は維持され、細胞種選択的なこれら薬剤蛋白質の送達とともに、薬理活性の発現も達成されている。詳細は、当日の発表にて説明を行う。

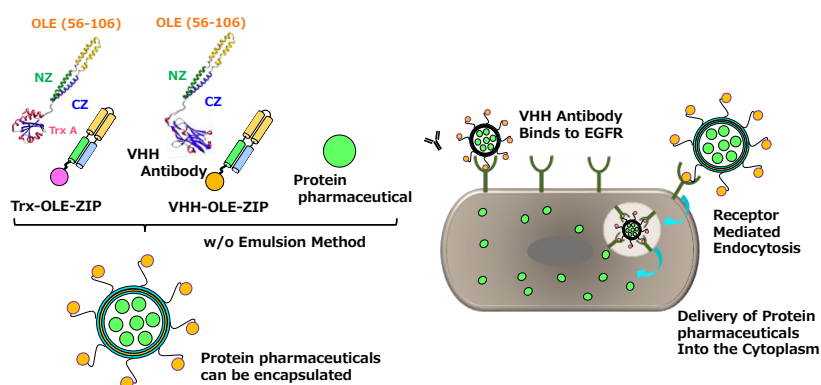


図1 Anti-EGFR VHH 抗体を提示した OLE-ZIP 蛋白質カプセルを用いた、Receptor-binding mediated endocytosis を介した細胞種選択的な (A431 細胞特異的な) 薬剤蛋白質の細胞内への輸送

抗原タンパク質修飾ペプチド超分子によるワクチン効果の評価

○若林里衣¹・難波江友紀¹・樋口亜也斗¹・神谷典穂^{1,2}・後藤雅宏^{1,2}

(¹九州大学大学院工学研究院、²九州大学未来化学創造センター)

Evaluation of vaccine efficacy of antigenic protein-conjugated peptide supramolecules

(Faculty of Engineering, Kyushu University¹, Center for Future Chemistry, Kyushu University²)

WAKABAYASHI, Rie¹; NABAE, Yuki¹; HIGUCHI, Ayato¹; KAMIYA, Noriho^{1,2}; GOTO, Masahiro^{1,2}

ペプチドや両親媒性ペプチドが水中で自己組織化し形成するペプチド超分子は、構造や物性に応じた機能を示すことから、ドラッグデリバリーをはじめとしたバイオ機能材料創製のために有用である。最近の研究では、エピトープペプチドを有する超分子が免疫応答の増強、すなわちアジュバント効果を示すことが報告され、ペプチド超分子のワクチン応用が期待されている¹⁾。しかしながら、現状は超分子に搭載される抗原は、ほとんどの場合ペプチド抗原に限定されており、抗原タンパク質の利用は超分子上にタンパク質を搭載する方法に乏しく、限定的である。

我々はこれまでに、酵素反応により超分子上にタンパク質を修飾する手法を報告した²⁾。自己組織化部位と酵素反応性ペプチド配列からなる両親媒性ペプチドは、超分子形成後に酵素反応性を保持し、タンパク質の構造・機能を変化させることなく超分子上に担持することが可能である。本研究では、抗原タンパク質を様々な超分子に担持した抗原タンパク質修飾ペプチド超分子を調製し、超分子の構造や物性がワクチン効果に与える影響を評価した。

酵素として Gln 残基と Lys 残基の側鎖間の架橋反応を触媒するトランスグルタミナーゼを用いた。モデル抗原タンパク質 EGFP を芳香環と短いトランスグルタミナーゼ認識配列からなる Ar-X-LnQG-Y (Ar, Fmoc or Pyrenyl 基; X/Y, 任意のアミノ酸; n=2, 3) が形成する種々のペプチド超分子と反応させた。超分子の構造や物性はペプチド分子デザインに応じて変化し、それに応じて酵素反応性や搭載した抗原タンパク質の細胞内移行性、ワクチン効果を示した。本発表では、特にペプチド超分子の電荷を改変した際にワクチン効果に与える影響について報告する (Figure 1)。

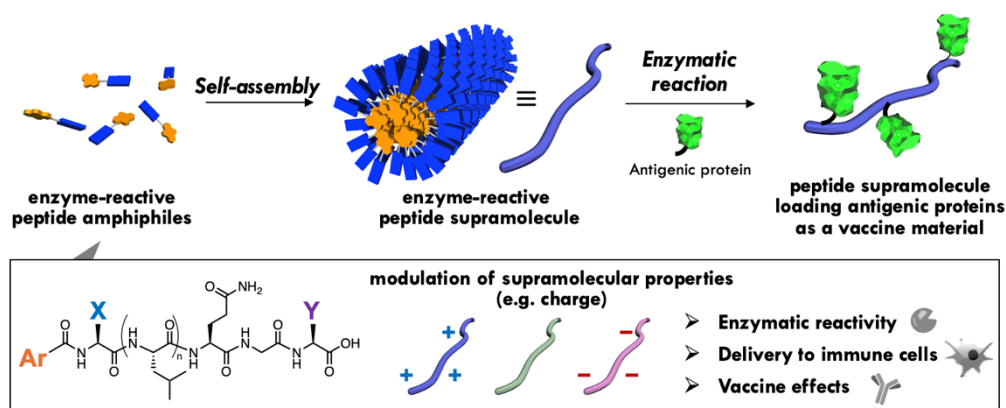


Figure 1. Schematic illustration of this study. Peptide amphiphiles having enzyme-reactive group self-assemble into enzyme-reactive peptide supramolecules, followed by loading with antigenic proteins to form vaccine materials. The effects of modulation of supramolecular properties, e.g. charge, on enzymatic reactivity, antigen delivery to immune cells, and vaccine effects were evaluated.

1) Y. Wen, *et al.*, *Curr. Opin., Immunol.*, **35**, 73 (2015).

2) R. Wakabayashi, *et al.*, *Chem. Commun.*, **55**, 640 (2019).

[謝辞] 本研究は、JSPS 科研費 JP22H01884 および JP21H05227 の助成を受けて行われた。

土壌細菌内シトクロム P450 の基質誤認識に基づく芳香族性化合物の微生物分解

○伊藤史哉・有安真也・唐澤昌之・笠井千枝・愛場雄一郎・荘司長三（名大院理）

Bacterial Degradation of Aromatic Compounds Based on Substrate Misrecognition by Cytochrome P450s in Soil Bacteria (Graduate School of Science, Nagoya University) ITO, Fumiya; ARIYASU, Shinya; KARASAWA, Masayuki; KASAI, Chie; AIBA, Yuichiro; SHOJI, Osami

【研究背景】

土壌汚染の持続可能な浄化手法として、微生物を利用するバイオレメディエーションが注目されている。多環芳香族炭化水素やダイオキシン類といった難分解性物質がターゲットとされ、昨今これらを効率よく分解可能な微生物や代謝経路が探索・開発されている。しかしながら、開発された遺伝子組換え生物の開放系利用には遺伝子汚染リスクが伴うことが実用上の障壁となっている。

当研究室では生物に広く分布するシトクロム P450（以下 P450）の反応開発を進めてきた。土壌細菌 *Priestia megaterium* 由来の P450BM3 は脂肪酸のアルキル鎖末端付近を選択的に水酸化する酵素として知られるが、脂肪酸を模した偽物の基質（デコイ分子）の添加により、本来進行しないベンゼン水酸化などを引き起こす。これはデコイ分子が酵素内に小さな反応空間を提供するためとされる (Fig. (a))¹。また、本酵素を過剰発現させた大腸菌を反応容器とした微生物変換も達成した²。最大の特徴は変異を導入せずに酵素を野生型のまま目的反応へ転用できる点である。この特徴を活かせば、当該酵素を有する天然細菌を有用反応の「触媒」として利用可能になると考えた。本研究では、天然細菌に対し遺伝子操作を一切行わず、デコイ分子を用いて内在 P450 を作動させ芳香族化合物の酸化分解へ利用することを目指した (Fig. (b))³。

【結果と考察】

初めに、天然で P450BM3 やその近縁酵素 (CYP102 酵素) を有する 12 細菌株を対象としたスクリーニングを行った。ベンゼン水酸化活性を指標とし既存のデコイ分子数十種との組み合わせ

を網羅的に評価したところ、5 株がそれぞれに適したデコイ分子存在下で水酸化活性を示した。土壌への遍在性や人体への低有害性を考慮し、*P. megaterium* と *Bacillus subtilis* をさらなる検証へ用いた。

B. subtilis は P450BM3 の近縁酵素 CYP102A2 と A3 を有する。上記反応を触媒している酵素の特定のため、各遺伝子のノックアウト株によるベンゼン水酸化活性を評価したところ、CYP102A3 遺伝子の削除に伴い反応が全く進行しなくなった。デコイ分子非添加ではいずれの株も活性を示さないことから、仮説通りデコイ分子が天然細菌の内在 P450 による水酸化反応を誘発していることが示された。

基質範囲を評価したところ、*P. megaterium* と *B. subtilis* はともに環境汚染物質として知られるトルエンやキシレン、ナフタレンなどの芳香族化合物への水酸化活性を示した。また、より重要なターゲットである塩素置換基を有する芳香族化合物（クロロナフタレンとダイオキシン類の一種 mono-chlorinated dibenzo-*p*-dioxins）の分解も試みた。両化合物ともデコイ分子存在下における迅速な分解が観測され、これらによる深刻な汚染への本手法の適用可能性が示唆された。天然細菌をデコイ分子で制御する本手法は遺伝子汚染のリスクを回避したバイオレメディエーションの新規戦略として期待できる。

Ref. [1] O. Shoji *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6606. [2] M. Karasawa *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 12264. [3] F. Ito *et al.*, Manuscript in preparation.

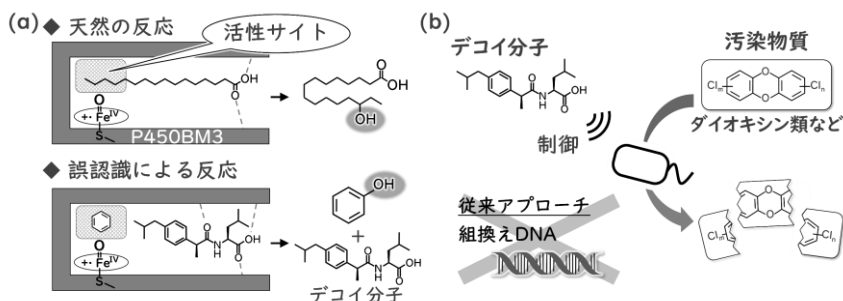


Fig. (a) デコイ分子が駆動する P450BM3 の水酸化, (b) 研究概要.

一般口頭発表 | 分析・計測・センサーデバイス

分析・計測・センサーデバイス

座長：舟橋 久景（広島大学）

2024年9月12日(木) 15:10 ~ 16:30 C会場 (中会議室202)

[10C-08] アミノペプチダーゼ活性を可視化する超偏極 MRI分子プローブの多様化戦略とがん診断への展開

*齋藤 雄太郎¹、谷田部 浩行¹、子安 憲一²、高草木 洋一³、齋藤 圭太³、山本 和俊²、Krishna Murali C.²、山東 信介¹（1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 米国国立衛生研究所、3. 量子科学技術研究開発機構）

15:10 ~ 15:30

[10C-09] pH応答性電荷反転型曲率認識ペプチドを利用した細胞外小胞のキャッチ&リリース単離法の開発

*河野 健一¹、葛馬 佑樹¹、吉尾 航一¹、細川 健太¹、大杉 悠斗¹、藤原 敬宏²、横山 文秋³、松崎 勝巳¹（1. 京都大学大学院 薬学研究科、2. 京都大学 WPI-iCeMS、3. 東京大学大学院 理学系研究科）

15:30 ~ 15:50

[10C-10] 糖鎖高分子インターフェイスを用いた非レクチンのタンパク質検出

*寺田 侑平¹、青木 寛¹（1. 産業技術総合研究所環境創生研究部門）

15:50 ~ 16:10

[10C-11] 凍結組織切片内生体小分子の迅速イメージング、及び組成解析

*西原 達哉¹、塚目 莉加¹、鈴木 我空¹、菅原 優美佳¹、西田 光輝¹、田邊 一仁¹（1. 青山学院大学理工学部）

16:10 ~ 16:30

アミノペプチダーゼ活性を可視化する超偏極 MRI 分子プローブの 多様化戦略とがん診断への展開

○齋藤雄太郎¹・谷田部浩行¹・子安憲一²・高草木洋一³・齋藤圭太³・山本和俊²・Murali C. Krishna²・山東信介¹ (¹東大院工、²米国 NIH、³QST)

Diversification strategy of hyperpolarized MRI molecular probes for aminopeptidase activities and application to cancer diagnosis (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹, National Institute of Health², National Institute for Quantum Science and Technology³) SAITO, Yutaro¹; YATABE, Hiroyuki¹, KOYASU, Norikazu², TAKAKUSAGI, Yoichi³, SAITO, Keita³, YAMAMOTO, Kazutoshi², KRISHNA, C. Murali², SANDO, Shinsuke¹

核磁気共鳴イメージング (MRI) は非侵襲的に生体深部をリアルタイムで観測・可視化できるため、生体深部の分子イメージングや画像診断法として優れている。しかし、感度の低さが問題となりその応用は大きく制限されている。この問題の解決策として、特殊な量子操作によって MRI 感度を劇的に向上させる超偏極技術が注目されている。動的核偏極法 (DNP) は、超偏極技術の一つであり、生体分子イメージングへの応用が進んでいる。これを用いた DNP-MRI は、次世代のイメージング技術や診断法として期待されており、¹³C-ピルビン酸を用いた解糖系代謝イメージングは各種がんの診断法として米国で臨床試験が進められている¹。一方、¹³C-ピルビン酸のように生体応用可能な DNP-MRI 分子プローブは少なく、観測できる分子や現象が限られていることが大きな課題となっている。このような背景の下、我々は生体内で機能する DNP-MRI 分子プローブの開発を分子設計によって実現しようと試みてきた。これまでの研究成果として、がん関連酵素であるアミノペプチダーゼ N (APN) を標的とする分子プローブ Ala-[1-¹³C]Gly-*d*₂-NMe₂ の開発に成功している²。この分子プローブを用いると、DNP-MRI によって担がんモデルマウス腫瘍領域の APN 活性の検出およびマッピングが可能である。

Ala-[1-¹³C]Gly-*d*₂-NMe₂ は、各々の部分構造がそれぞれ別の役割を担うように精密に設計された分子プローブである。例えば、N 末端 Ala 部位によって APN 選択性が実現されており、C 末端 NMe₂ 構造によって劇的な酵素反応性向上が実現されている。さらに、中間部にあたる Gly 部位は代謝前後における大きな化学シフト変化のために必要である。このような分子設計に基づき、本研究では、Ala-[1-¹³C]Gly-*d*₂-NMe₂ の部分構造を適切に改変することで本分子プローブの特性を変化させ、分子プローブの多様化を図った。種々検討の結果、N 末端構造を変化させることで標的酵素を変化させ、C 末端構造を変化させることで化学シフト値を制御できることを見出した。この知見を基に新しい分子プローブ 4 種を開発し、それぞれのプローブ単独もしくは同時に複数種を用いることで、分子プローブの生体内代謝を検出することに成功した。さらに、これらの分子プローブ群を用いることで、担がんモデルマウスを用いた動物実験における診断精度が向上することを見出した。

本発表では、分子設計の詳細に加えて、Ala-[1-¹³C]Gly-*d*₂-NMe₂ および新たに開発した分子プローブ群を用いたがん診断に向けた応用について紹介する。

Reference

¹Nelson, S. J. *et al. Sci. Transl. Med.* **2013**, *198*, 198ra108.

²Saito, Y *et al. Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabj2667.

pH 応答性電荷反転型曲率認識ペプチドを利用した細胞外小胞の キャッチ&リリース単離法の開発

○河野健一¹・葛馬佑樹¹・吉尾航一¹・細川健太¹・大杉悠斗¹・藤原敬宏²・
横山文秋³・松崎勝巳¹ (¹京都大院薬、²京都大 WPI-iCeMS、³東京大院理)

Development of extracellular-vesicle catch-and-release isolation system using a net-charge invertible curvature-sensing peptide (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University¹, Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University², Graduate School of Science, The University of Tokyo³)
KAWANO, Kenichi¹; KUZUMA, Yuki¹; YOSHIO, Koichi¹; HOSOKAWA, Kenta¹; OOSUGI, Yuuto¹; FUJIWARA, Takahiro²; YOKOYAMA, Fumiaki³; MATSUZAKI, Katsumi¹

細胞外小胞 (EV) は、様々な細胞から分泌される負に帯電した直径 50-200 nm の脂質ナノ粒子であり、細胞間コミュニケーションで重要な役割を果たしている。EV に内包されているタンパク質やシグナル分子、核酸などが、生物学分野のみならず医学分野でも重要な研究対象として注目されており、病気の診断やワクチン開発への応用などバイオテクノロジー面で幅広く活用されている。しかしながら、EV 単離方法には依然として改善の余地がある。既存手法では、超遠心分離法や免疫沈降法などが汎用されてきたが、前者は作業に長時間を要するだけでなく、過度な重力負荷による EV の凝集や形状変化を引き起こす可能性がある。また後者は、抗体を用いて EV 表面の抗原を高感度で検出できる反面、抗原欠損体の EV 単離には向かないデメリットがある。そこで、本研究では新たに創製した電荷反転型曲率認識ペプチドを用いた、pH 制御による EV 新規単離法: Extracellular-Vesicle Catch-and-Release isolation System (EV-CaRiS)を開発し、単離した EV の機能性評価を行うことで、その有用性を示した¹⁾。

EV は直径が 50-200 nm と極めて小さいために、EV を構成する膜が高度に湾曲している。EV に共通して見られる湾曲した膜 (曲率膜) を認識するのが両親媒性の曲率認識ペプチドであり、EV 表面の抗原の有無に関わらず短時間で EV に結合する性質がある。EV の結合・解離を人為的に制御するため、pH に応じて正味の電荷が変化する曲率認識ペプチド (Net-charge Invertible Curvature-sensing peptide: NIC) を開発した。具体的には、弱酸性 pH では NIC が正電荷を帯びて静電的相互作用により負電荷を帯びている EV 膜に近接しやすくなり、脂質膜上の間隙に結合することで EV を捕捉する。一方、弱アルカリ性 pH では NIC が負電荷に電荷反転することで EV 膜との静電的反発により EV が NIC から解離する。NIC をアガロース樹脂に固定することで、弱アルカリ性 pH で EV は樹脂上の NIC に捕捉 (キャッチ) され、細胞の培地に含まれる雑多な夾雑物は洗い落とされる。その後、弱アルカリ性 pH の緩衝液に置換することで EV が樹脂上の NIC から解離 (リリース) するので、EV を含む上清を回収して EV の単離精製が完了する仕組みである。

3 種類の細胞株 (ヒトがん細胞株: HeLa, PANC-1, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞: MSC-R37) の培養液からの EV 単離を試みたところ、既存手法で汎用されている超遠心分離法と比べて 3 倍高い EV 収量が得られ、全ての操作に要する時間は合計 1.5 時間と従来の 1/3 程度で完了した。単離した全種 EV においてマクロファージに対するサイトカインの TNF α の分泌誘導が確認され、MSC-R37 由来の EV は PANC-1 細胞に対して抗がん活性を示した。さらに EV バイオマーカーである 4 回膜貫通型の膜タンパク質・テトラスパニン (CD63 および CD81) 抗体を用いた EV の免疫染色で 1 分子イメージングへの応用にも成功した。これらの研究を通して、電荷反転型曲率認識ペプチドを基盤とする新規 EV 単離法の有用性と単離した EV が機能活性を有することを実証した。

1) K. Kawano et al., *Anal. Chem.* 96, 3754 (2024)

糖鎖高分子インターフェイスを用いた非レクチンのタンパク質検出

○寺田侑平¹・青木寛¹ (¹産総研 環境創生)Glycopolymer-interface for detection of non-lectin protein (AIST EMRI¹) TERADA, Yuhei¹; AOKI, Hiroshi¹

妊娠検査薬やインフルエンザ検査キットに代表されるバイオセンサーは生体分子の分子認識機構を用いて標的分子を捕捉する分子認識インターフェイス、さらにその分子の捕捉を電気信号に変換する検出部位の二つから主に構成される。これまでは検出部位の観点から新たな検出プラットフォームの開発やセンサーの高感度化を試みる研究アプローチが主流であった。一方、センサー表面に形成する分子認識インターフェイスには多くの場合、抗体が用いられてきた。抗体は標的分子に対する結合の親和性が高いが、熱や pH 変化による変性・失活が懸念される点や、表面修飾の際に多段階操作を必要とする上に非特異吸着を防ぐためのブロッキングも要することが足枷となっている。そこで、我々は抗体の代替として糖鎖高分子を挙げた。

図 1 に示すように高分子骨格の主鎖に糖鎖を提示した高分子材料であり、化学/物理的な変化に対する耐久性が高く、比較的に安価な材料で簡便かつ大量に合成が可能である。さらに nm 規模での精密な構造設計が可能であり、センサー表面に直接修飾できて、ブロッキングも必要としない高分子を容易に得ることが

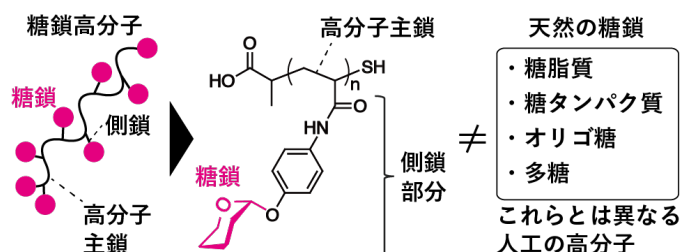


図 1 糖鎖高分子概要

ができる。糖鎖高分子は、そういった材料としての扱いやすさから抗体の上位互換として期待される一方、分子認識について未知な部分が多い。実際に糖鎖高分子を用いた研究のほとんどは糖鎖認識性タンパク質であるレクチンを対象としたものに留まっている。そこで本研究では非レクチンを対象として、これまでに糖鎖高分子による認識の前例がないタンパク質を検出可能にする糖鎖高分子が修飾された分子認識インターフェイス、すなわち糖鎖高分子インターフェイスの創出を目指す。

糖鎖の種類、高分子主鎖の長さ、さらに高分子主鎖に対する糖鎖導入率が制御された糖鎖高分子を合成し、非レクチンとの相互作用について表面プラズモン共鳴イメージング (SPRi) により網羅的に解析した (図 2)。金の表面に修飾された材料に対して分子が吸着した際の光学変化を測定することで、その相互作用をスクリーニングすることができる。特に SPRi のようにプラズモンの原理を利用したセンサーは、分子認識インターフェイスの膜厚などが検出感度に寄与するため精密設計が可能な糖鎖高分子との相性が良好である。つまりは、これまで

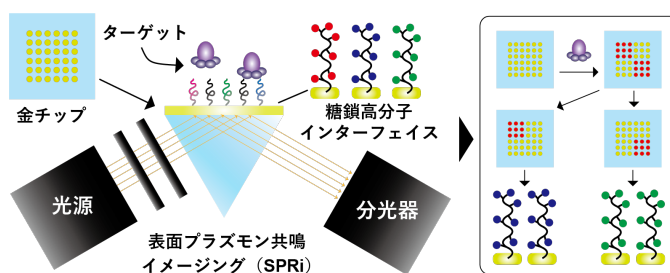


図 2 SPRi 網羅解析概要

検出感度の問題などで検出できなかった分子の検出が可能となり、非レクチンの検出に有効である。まず、レクチンと様々な設計の糖鎖高分子インターフェイスの相互作用について解析した結果、糖鎖の種類によって SPRi 応答に差異がみられ、特定の糖鎖とレクチンの特異的な結合が確認された。また、糖鎖導入率を変化させた場合に差異は見られなかったが、高分子主鎖の長さが短い主鎖の場合は SPRi 応答が小さく、長い高分子の場合に大きな SPRi 応答が見られた。長い主鎖を持つことによって高分子主鎖のフレキシビリティ向上が結合の増強につながったことが示唆された。非レクチンとの相互作用についても複数の糖鎖高分子が結合を示し、未知タンパク質検出の可能性が示された。

凍結組織切片内生体小分子の迅速イメージング、及び組成解析

○西原達哉・塚目莉加・鈴木我空・菅原優美佳・西田光輝・田邊一仁（青学大院理工）

Rapid imaging and composition analysis of small molecules in the frozen tissue slice (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) NISHIHARA, Tatsuya; TSUKAME, Rika; SUZUKI, Gaku; SUGAWARA, Yumika; NISHIDA, Koki; TANABE Kazuhito

組織内に含まれる代謝物や金属イオンなどの小分子は、領域ごとに含まれている種類、及び量が厳密に制御されている。一方で、疾病の罹患に伴い、これら生体小分子の量的バランスは大きく変動する。そのため、組織内における小分子の分布イメージングは非常に重要な解析技術に位置付けられる。組織切片内の代謝物分布解析において、質量分析イメージング法 (MSI) は有力な方法である。実際に、MSI を用いることで、各種代謝物が、がん診断のバイオマーカーとして機能することも明らかになっている。しかしながら、MSI は、ピクセルごとの質量分析を前提とするため、1 スライスの画像取得に十数時間と膨大な時間を要する。また、MSI は定量性に乏しく、高価な装置の導入を必要とする。そのため、組織切片を用いた迅速診断への応用等を考えた場合、汎用的な解析手法となり難い。

以上を踏まえ、我々は、組織内に含まれる小分子を簡便に解析可能にする薄層クロマトグラフィー トレーシング (TLC トレーシング) 技術の構築に取り組んだ (Figure 1)。本方法論では、まず、解析対象分子に対するラベル化剤を塗布した薄層クロマトグラフィー (TLC) を作成する。次に、凍結組織切片を機能化 TLC に対して貼付する。

貼付時、組織切片内に含まれる解析対象分子は TLC へ移行し、その場で、ラベル化剤と反応が進行する。新たに得られる生成物由来のシグナルを選択的に検出することで、組織内に含まれる解析対象分子の分布が TLC に描出される。実際に、グルタチオン (GSH) のイメージングを可能にする第一世代の蛍光ラベル化剤の開発を進め、肝臓組織内の GSH 検出に成功した。また、蛍光顕微鏡観察画像をタイリングすることにより、従来法である MSI を上回る解像度のイメージングを数分以内に達成可能であることも示唆されている。

本研究では、第二世代型のラベル化剤として、GSH に対するライトアップ型の蛍光ラベル化剤の開発を進めた。GSH との反応、および光照射の 2 条件が揃った際に、蛍光が回復する物性を付与した。これにより、凍結組織切片の貼付、および光照射のみで、GSH 分布イメージングが実現する。実際に、食肉用豚レバーを用い、評価を行った結果、迅速に組織内 GSH イメージングが可能であることが示唆された。また、組成解析を指向し、多成分解析に有利となるラマン分光法を活用したラベル化剤の開発を進めた。標的分子として、フェロトシスと関連するグルタチオン、及び鉄イオンを選択した。解析対象ごとに、対応する波数にラマンシグナルを与えるラベル化剤を設計、合成した。以上により得られたラベル化剤カクテルを塗布した機能化 TLC を用い、2 成分の同時検出が可能であることを確かめた。また、本ラベル化剤を肝臓組織へ適用した結果、組織内におけるフェロトシスの進行を追跡可能であることが示唆された。

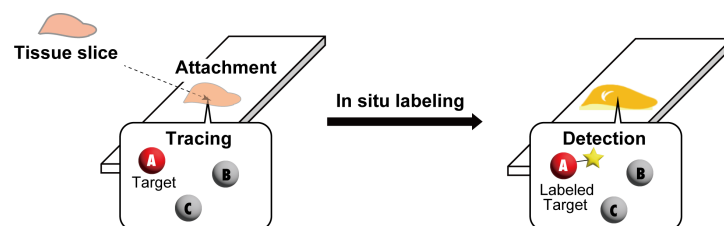


Figure 1. Outline of TLC tracing strategy for the target small molecule detection

一般口頭発表 | メディカルバイオ

メディカルバイオ

座長：蓑島 維文（大阪大学）

2024年9月12日(木) 16:40 ～ 17:40 C会場 (中会議室202)

[10C-12] Surface Modification of an Algal Cell with Elongated DNA Strands to Control Loading and Releasing of Cationic Materials

*YINGQI MU¹, Yuseke Yonamine², Hideyuki Mitomo², Kuniharu Ijiro² (1. Graduate School of Life Science, Hokkaido University, 2. Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University (RIES, Hokkaido Univ.))

16:40 ～ 17:00

[10C-13] 内在性アクロレインの[4+4]付加環化反応を利用したがん細胞内での無触媒ポリマー合成研究とがん検出への展開

*川口 慎司¹、石渡 明弘²、プラディプタ アンバラ¹、田中 克典^{1,2} (1. 東京工業大学物質理工学院、2. 理化学研究所開拓研究本部田中生体機能合成化学研究室)

17:00 ～ 17:20

[10C-14] ルテニウムポリピリジル錯体のトリプルネガティブ乳がんに対する暗所条件下における細胞毒性

*石田 齊¹、原 愛美¹、田中 宏一¹、小柳 恵理²、佐藤 伸一²、平田 佳之³ (1. 関西大学 化学生命工学部、2. 東北大学 学際科学フロンティア研究所、3. 大阪医科薬科大学 薬学部)

17:20 ～ 17:40

Surface Modification of an Algal Cell with Elongated DNA Strands to Control Loading and Releasing of Cationic Materials

(Graduate School of Life Science, Hokkaido Univ.¹, RIES, Hokkaido Univ.²)

○ MU, Yingqi¹; YONAMINE, Yusuke²; MITOMO, Hideyuki²; IJIRO, Kuniharu²

【Introduction】 Cell engineering has been utilized to alter cellular functions. However, it is still challenging to significantly enhance them by gene manipulation. Conversely, modifying natural cells with artificial materials can strikingly extend cellular functions. To produce “functionalized cells”, it is supportive to form a polymer layer on the cell surface that mediates adhesion between cells and functional materials in physiological conditions. DNA is a suitable polymer as it is biocompatible and can be extended even under cell culture conditions with enzymatic reactions. Furthermore, negatively charged phosphate groups of DNA can function as a scaffold for loading cationic materials. In this study, as a model cell for functionalization, a unicellular alga, *Chlamydomonas reinhardtii* (CR), was modified with a DNA primer. The immobilized DNA primers were then elongated with a DNA polymerase to cover the CR cells with long DNA chains. Cationic gold nanoparticles were loaded onto the DNA layer through electrostatic interaction for functionalization and released via degradation with an endonuclease to demonstrate the deprivation of the function and the potential for specific drug delivery.

【Results and Discussion】

A DNA primer (X-motif) was conjugated with an oligopeptide of 4-hydroxyproline (HYP₁₀) that binds tightly to the CR cell wall¹ and immobilized onto the CR cell surface. By adding a DNA polymerase, Klenow fragment exo (-) (KF), long double-stranded DNA chains with repeating sequences were elongated via slippage mechanism² to form a thick DNA layer on the cell surface (Figure 1). A gold nanorod (GNR) coated with a cationic ligand was further modified onto the surface of the elongated DNA-coated cells through electrostatic interaction. Moreover, the release of the modified GNRs was demonstrated by adding an endonuclease, DNase I, which degrades double- and single-stranded DNA (Figure 2). The results of dark-field microscopy (Figure 3) revealed cationic GNRs were successfully loaded onto CR cell surface and released through degradation of the outer DNA layer.

1) D. B Weibel *et al.*, *PNAS*, **2005**, *102*, 11963-11967.

2) A. B. Kotlyar *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, 525-535.

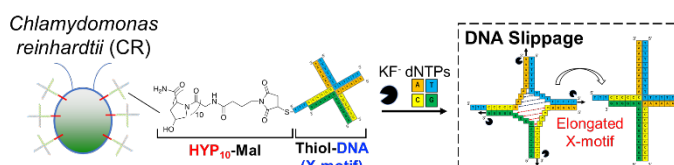


Figure 1. Elongation of DNA primers (X-motif) immobilized on CR cell surface with a DNA polymerase (KF).

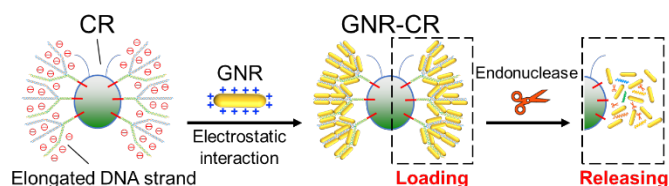


Figure 2. Loading of cationic GNRs on elongated DNA-coated CR cell surface through electrostatic interaction and releasing with an endonuclease (DNase I).

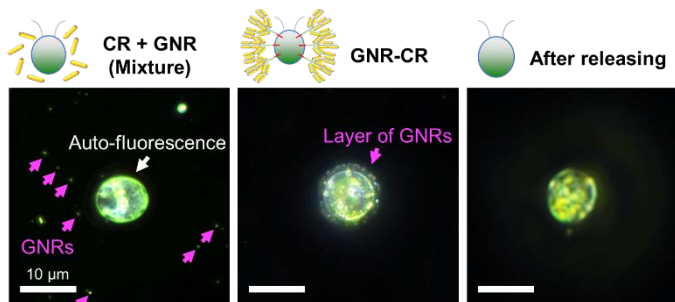


Figure 3. Dark-field microscope images of a natural CR cell incubated with cationic GNRs (Left) and GNRs-loaded CR cells before (Middle) and after (Right) releasing the GNRs.

内在性アクロレインの[4+4]付加環化反応を利用したがん細胞内での無触媒ポリマー合成研究とがん検出への展開

○川口 慎司¹・石渡 明弘²・Ambara R. Pradipta¹・田中 克典^{1,2} (¹ 東工大物質理工、² 理研 開拓研究本部 田中生体研)

Intracellular polymer synthesis utilizing [4+4] cycloaddition reaction with acrolein (School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology¹, RIKEN Biofunctional Synthetic Chemistry Laboratory, Cluster for Pioneering Research²) KAWAGUCHI, Shinji¹; ISHIWATA, Akihiro²; PRADIPTA, Ambara R.¹; TANAKA, Katsunori^{1,2}

我々の研究室では以前、正常細胞と比較して、前立腺や子宮頸部、肺などの様々な組織のがん細胞でアクロレインと呼ばれる小分子が高発現していることを見出した¹。また我々はこれまでに、フェニルグリシノールやアミノインダノールといったアミノアルコール類がアクロレインと反応し、共役イミン形成の後、[4+4]付加環化反応を経て8員環アルカロイド類を無触媒で速やかに与えることを見出した²。今回我々は、ビスアミノアルコール構造を有する誘導体を合成し、これをモノマーとしてがん細胞に内在するアクロレインと反応させることで、生体内で触媒なしに一挙に8員環ポリマーを合成することを検討した(図1)。

まずフラスコ内での重合を検討した結果、8員環構造が連なったポリマーの固体が得られることを確認した。さらに、重合反応を制御することでハイドロゲルを得られることを確認できた。続いてがん細胞内の内在性アクロレインと反応させ重合させた。リンカー部位に凝集誘起発光(Aggregation-Induced Emission; AIE) 特性蛍光基を付与させて、重合と共に AIE によって蛍光強度が変化するかを検討した。その結果、重合することで蛍光が増強する反応系を開拓した。これをがん細胞選択的な検出へと展開したので、これらの経緯について報告する。

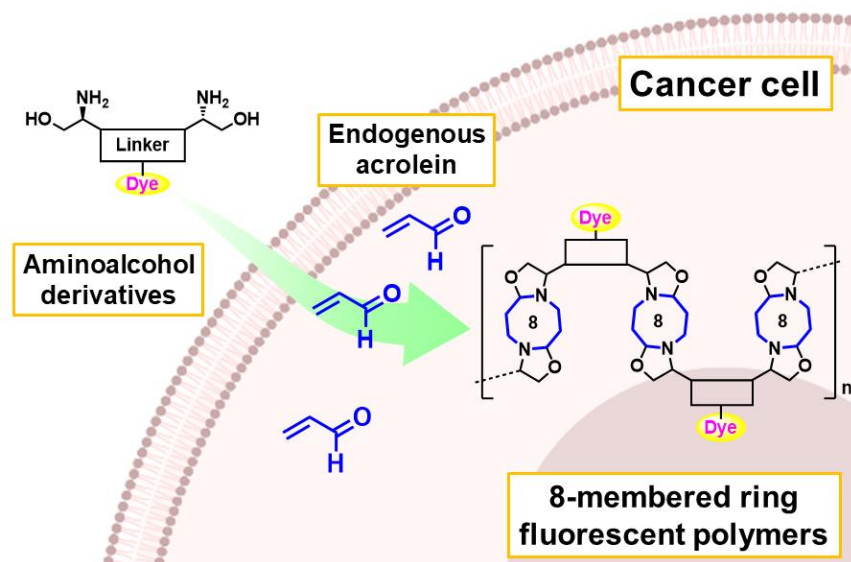


図 1. 本研究の概要

- (1) T. Tanei, A. R. Pradipta, K. Morimoto, M. Fujii, M. Arata, A. Ito, M. Yoshida, E. Saigitbatalova, A. Kurbanalieva, J. Ikeda, E. Morii, S. Noguchi, K. Tanaka, *Adv Sci.* **2019**, *6*, 1801479.
 (2) (a) K. Tanaka, R. Matsumoto, A. R. Pradipta, Y. Kitagawa, M. Okumura, Y. Manabe, K. Fukase, *Synlett* **2014**, 25, 1026. (b) A. Tsutsui, T. Zako, T. Bu, Y. Yamaguchi, M. Maeda, K. Tanaka, *Adv. Sci.* **2016**, *3*, 1600082.

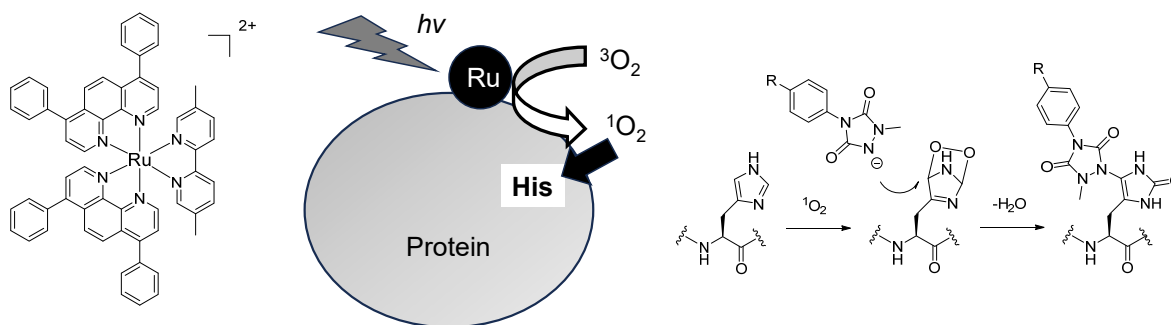
ルテニウムポリピリジル錯体のトリプルネガティブ乳がんに対する 暗所条件下における細胞毒性

○石田 齊¹・原 愛美¹・田中宏一¹・小柳恵理²・佐藤伸一²・平田佳之³

(¹関西大化学生命工、²東北大学際研、³大阪医薬大薬)

Cytotoxicity of Ruthenium Polypyridyl Complexes against Triple-Negative Breast Cancer under Dark Conditions (Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University¹, Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University², Faculty of Pharmacy, Osaka Medical and Pharmaceutical University³) ISHIDA, Hitoshi¹; HARA, Manami¹; TANAKA, Koichi¹; KOYANAGI Eri²; SATO Shinichi²; HIRATA, Yoshiyuki³

トリプルネガティブ乳がん(TNBC)は、他の種類の乳がんによく見られる3つの特異的受容体(エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、およびヒト上皮成長因子受容体2(HER2))が存在しない乳がんのサブタイプである。これらの受容体はがん細胞の増殖に重要な役割を果たしていることから、これらが存在しないTNBCの治療は困難であり、新しい抗がん剤の開発が望まれている。一方、現在、多くのがんに対して用いられている白金製剤は、副作用が強く、薬剤耐性を生じるなどの問題が指摘されており、白金以外の金属錯体製剤の探索が活発に行われている。金属錯体の抗がん活性は、加水分解あるいは配位子解離により生じた金属錯体の配位サイトが、DNAやタンパク質など生体分子に配位することにより発現すると考えられている。特にルテニウム錯体においては、長寿命の励起三重項状態からの光配位子解離を利用した光活性化化学療法(Photoactivated Chemotherapy, PACT)が活発に研究されている。ルテニウムポリピリジル錯体など、配位子を解離しない安定な錯体では、三重項励起状態から酸素分子へのエネルギー移動により生成する一重項酸素による細胞死を利用した光線力学的療法(Photodynamic Therapy, PDT)への応用が研究されている。我々は、トリプルネガティブ乳がん細胞株に対するPDT活性を検討する目的から、ビピリジンおよびフェナントロリン誘導体など様々なポリピリジル配位子を組み合わせたルテニウムトリス(キレート)錯体を系統的に合成した。その過程において、 $[\text{Ru}(47\text{dpphen})_2(5\text{dmbpy})]^{2+}$ (47dpphen: 4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン; 5dmbpy: 5,5'-ジメチル-2,2'-ビピリジン)およびその類縁体が、暗所条件下にかかわらず、トリプルネガティブ乳がん細胞に対して示すことを見出した(Figure)。¹⁾ 本研究では、マウスを用いた抗腫瘍効果試験、ルテニウム錯体の疎水性と細胞内移行、ルテニウム錯体が相互作用する生体分子を同定する目的から光エネルギー移動による一重項酸素生成を利用したヒスチジン残基の選択的化学修飾²⁾によるケミカルプルダウンによる検討について報告する。



1) Ishida, H.; Hara, M.; Hirata, Y., *Jpn Pat. Appl.*, **2023-086639**.

2) Nakane, K.; Sato, S.; Niwa, T.; Tsushima, M. Tomoshige, S.; Taguchi, H.; Ishikawa, M.; Nakamura, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, *143*, 7726-7731.