

2024年9月13日(金)

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：佐藤 喬章（京都大学）

13:40 ~ 14:40 A会場 (大会議室101)

[2OA-01] 細胞内タンパク質結晶の分子設計による結晶格子変形

*菊池 幸祐¹、永間 美咲¹、Kong Haonan¹、田中 潤子¹、安部 聡²、上野 隆史^{1,3}（1. 東京工業大学生命理工学院、2. 京都府立大学大学院生命環境科学科、3. 東京工業大学科学技術創成研究院自律システム材料科学研究センター）

13:40 ~ 14:00

[2OA-02] 化学遺伝学を用いた長波長金属イオン蛍光センサーの開発

*程 大洲¹、寺井 琢也¹、キャンベル ロバート アール¹（1. 東大院理）

14:00 ~ 14:20

[2OA-03] Incorporation of three-dimensional structure information into machine learning models for the prediction of high-performance oxidases

*Christopher John Vavricka¹, Satoshi Yuzawa¹, Noriyuki Shioura¹（1. Faculty of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology）

14:20 ~ 14:40

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：田村 朋則（京都大学）

14:50 ~ 15:50 A会場 (大会議室101)

[2OA-04] 腸内乳酸菌における葉酸生成酵素の同定

*佐藤 喬章^{1,2}、加地 楓¹、長澤 舞奈¹、Cann Isaac^{3,4}、跡見 晴幸^{1,2}（1. 京都大学 大学院工学研究科、2. 京都大学 エネ研カーボンネガティブ、3. Dept. of Microbiol., Univ. of Illinois at Urbana-Champaign、4. Carl R. Woese Inst. for Genomic Biol., Univ. of Illinois Urbana-Champaign）

14:50 ~ 15:10

[2OA-05] 亜鉛フタロシアニン置換ミオグロビン-アルブミン融合タンパク質の合成と光線力学活性

*山田 大雅¹、小松 晃之¹（1. 中央大学理工学部）

15:10 ~ 15:30

[2OA-06] 新規蛍光標識リガンドによる中枢神経系におけるAMPA受容体の精密動態解析

*曾我 恭平¹、Hansel Adriel²、中川 満結¹、柴田 晃大¹、藤原 孝彰²、南後 恵理子^{2,3}、清中 茂樹¹（1. 名古屋大学大学院・工、2. 東北大学・多元研、3. 理研 SPring-8）

15:30 ~ 15:50

B会場

一般口頭発表 | ペプチド

ペプチド

座長：生長 幸之助（産業技術総合研究所）

13:40 ~ 14:40 B会場 (大会議室102)

[2OB-01] 肝臓ミトコンドリアに対する選択的膜透過糖ペプチドの開発

*野村 幸汰^{1,3}、大庭 誠²、沼田 圭司^{1,3}（1. 京都大学工学研究科、2. 京都府立医科大学医学研究科、3. 理化学研究所）

13:40 ~ 14:00

[2OB-02] 人工ペプチドによる細胞膜脂質運動の操作

*中尾 裕之¹、清水 裕道¹、木村 優介¹、柴崎 蒼太¹、池田 恵介¹、中野 実¹（1. 富山大学学術研究部薬学・和漢系）

14:00 ~ 14:20

[2OB-03] パラトーススを誘導するイリジウム(III)錯体-環状ペプチドハイブリッドの設計、合成及び作用メカニズムの検討

*成島 希海¹、東條 敏史¹、青木 伸^{1,2}（1. 東京理科大学薬学部、2. 東京理科大学総合研究院）

14:20 ~ 14:40

一般口頭発表 | 核酸関連

ペプチド・核酸関連

座長：岡村 秀紀（東北大学）

14:50 ~ 15:50 B会場 (大会議室102)

[2OB-04] インクジェット技術と膜透過性ペプチドを用いた細胞内導入評価

大村 美香¹、二宮 蒼平¹、藤原 大佑¹、道上 雅孝¹、藤井 郁雄¹、*中瀬 生彦¹（1. 大阪公立大学 大学院理学研究科）

14:50 ~ 15:10

[2OB-05] フタロシアニン系光増感剤による四重鎖核酸の分子認識および光分解

*百武 篤也¹、本間 詩織¹、小田原 祐介¹（1. 筑波大学 数理物質系 化学域）

15:10 ~ 15:30

[2OB-06] 非環状型人工核酸と人工塩基からなる抗 miR-21核酸の開発

*神谷 由紀子^{1,2}、佐藤 史経²、坂下 清佳²、劉 学瑩³、喜納 宏昭³、片岡 一則³、浅沼 浩之² (1. 神戸薬科大学、2. 名大院工、3. ナノ医療イノベーションセンター)
15:30 ~ 15:50

*森 英樹¹、井上 聖巴¹、鈴木 咲紀¹、原 正之¹ (1. 大阪公立大学大学院理学研究科)
15:30 ~ 15:50

C会場

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：吉村 英哲（東京大学）

13:40 ~ 14:40 C会場 (中会議室202)

[2OC-01] 迅速細菌同定を目指したサンガー法に基づく高速DNAシーケンス技術の開発

*古谷 俊介¹、古谷 のぞみ¹、永井 秀典¹ (1. 産業技術総合研究所 先端フォトンクス・バイオセンシングOIL)

13:40 ~ 14:00

[2OC-02] 不安定化変異はセンサ機能の進化を加速する

*木村 友紀¹、梅野 太輔¹ (1. 早稲田大学先進理工学部)

14:00 ~ 14:20

[2OC-03] 脂肪酸酸化の非侵襲的計測技術

*松岡 悠太¹、内之宮 祥平²、王子田 彰夫²、杉浦 悠毅¹ (1. 京都大学大学院医学研究科、2. 九州大学大学院薬学研究院)

14:20 ~ 14:40

一般口頭発表 | メディカルバイオ

分析・メディカルバイオ

座長：小和田 俊行（東北大学）

14:50 ~ 15:50 C会場 (中会議室202)

[2OC-04] 骨表面 pH計測に向けたレシオ型蛍光プローブの開発

*蓼島 維文¹、三木 初音¹、菊地 和也^{1,2} (1. 大阪大学工学研究科、2. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

14:50 ~ 15:10

[2OC-05] 抗原分解型 Trastuzumabの創製と免疫学的および生化学的性質

*一ノ三 恵美^{1,2}、辻田 萌¹、田口 博明³、宇田 泰三⁴ (1. 大分大学研究マネジメント機構、2. 大分大学グローバル感染症研究センター、3. 鈴鹿医療科学大学薬学部、4. 九州先端科学技術研究所)

15:10 ~ 15:30

[2OC-06] 線維化コラーゲンゲルの紫外線架橋に伴う血管内皮細胞の接着および増殖応答性の変化の解析

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：佐藤 喬章（京都大学）

2024年9月13日(金) 13:40 ～ 14:40 A会場 (大会議室101)

[2OA-01] 細胞内タンパク質結晶の分子設計による結晶格子変形

*菊池 幸祐¹、永間 美咲¹、Kong Haonan¹、田中 潤子¹、安部 聡²、上野 隆史^{1,3}（1. 東京工業大学生命理工学院、2. 京都府立大学大学院生命環境科学科、3. 東京工業大学科学技術創成研究院自律システム材料学研究センター）

13:40 ～ 14:00

[2OA-02] 化学遺伝学を用いた長波長金属イオン蛍光センサーの開発

*程 大洲¹、寺井 琢也¹、キャンベル ロバート アール¹（1. 東大院理）

14:00 ～ 14:20

[2OA-03] Incorporation of three-dimensional structure information into machine learning models for the prediction of high-performance oxidases

*Christopher John Vavricka¹, Satoshi Yuzawa¹, Noriyuki Shioura¹（1. Faculty of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology）

14:20 ～ 14:40

細胞内タンパク質結晶の分子設計による結晶格子変形

○菊池幸祐¹・永間美咲¹・Haonan Kong¹・田中潤子¹・安部聡²・上野隆史^{1,3}(¹東工大生命理工、²京都府大院生命環境科学、³東工大 IIR-ASMat)

Design of in-cell protein crystals for the crystalline lattice transformation (Sch. of Life Sci. and Tech., Tokyo Tech.,¹ Grad. Sch. of Life and Env. Sci., KPU,² IIR-ASMat, Tokyo Tech.³) KIKUCHI, Kosuke¹; NAGAMA, Misaki¹; KONG Haonan¹; TANAKA Junko¹; ABE Satoshi²; UENO, Takafumi^{1,2}

原子・分子が規則的に配向した固体結晶は、その秩序構造に固有の溶解性や安定性、多孔性等の化学的・物理的特性を発現する。固体結晶のなかには複数通りの分子配置が可能な、結晶多形を示すものも存在する。温度や外力に応じて結晶多形間を転移可能な合金やセラミック、有機小分子、コロイド粒子などもこれまでに多数見出され、形状記憶特性やゲスト分子放出等の応用が広く研究されてきた[1,2]。しかしながらタンパク質三次元結晶では結晶－結晶転移の分子設計は実現されていない。溶解・再結晶を伴うタンパク質の結晶多形制御は報告されているものの、液相を介さずに固相－固相転移を実現させる分子設計指針の確立は困難とされてきた。タンパク質による結晶格子変形が実現できれば、生体由来かつ高度に設計可能な、革新的変形材料を構築できるようになると期待できる。

そこで我々は、細胞内タンパク質結晶 CipB に着目した[3]。CipB は 100 残基からなるタンパク質であり、24 量化により中空のケージ構造を形成する [4]。CipB は細胞内にて発現されると自発的に自己集合し、体心立方格子を単位とする固体結晶を組み上げる

(Fig. 1)。我々は CipB ケージ間の相互作用に注目し、ケージ－ケージ界面の分子設計をおこなえば結晶多形の制御が可能になると考えた。そこで本研究では、ケージ間界面で最近接しているアミノ酸残基の置換設計をおこない、結晶格子を変形可能なタンパク質結晶の創出を目指した。細胞にて生成される結晶を光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡 (SEM)、小角 X 線散乱法 (SAXS) をはじめとする一連の物理化学的手法によって同定した。現在、詳細な分子構造とメカニズムについて研究を進めている。

参考文献

[1] Ahmed, E. *et al.*, *Nat. Commun.* **2019**, 10, 3723, [2] Lee, S. *et al.*, *Nature* **2022**, 610, 674-679, [3] Bintrim, S. B. & Ensign, J. C., *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 1261-1269, [4] Abe, S. *et al.*, *in preparation*

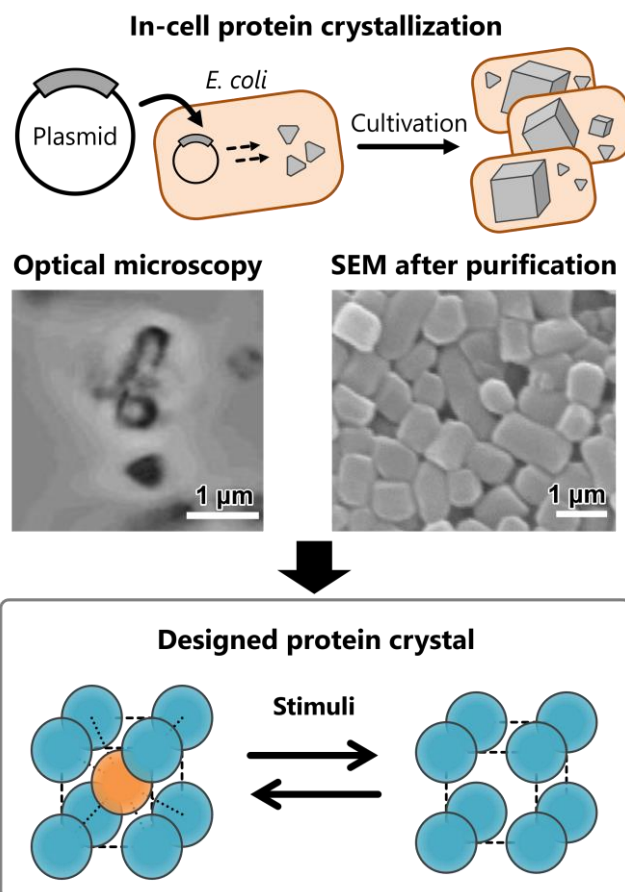


Fig 1. The engineering of in-cell protein crystals for lattice transformation. Proteins can spontaneously assemble into an ordered crystal in the cell, making the purification and the crystallization steps simple and rapid.

化学遺伝学を用いた長波長金属イオン蛍光センサーの開発

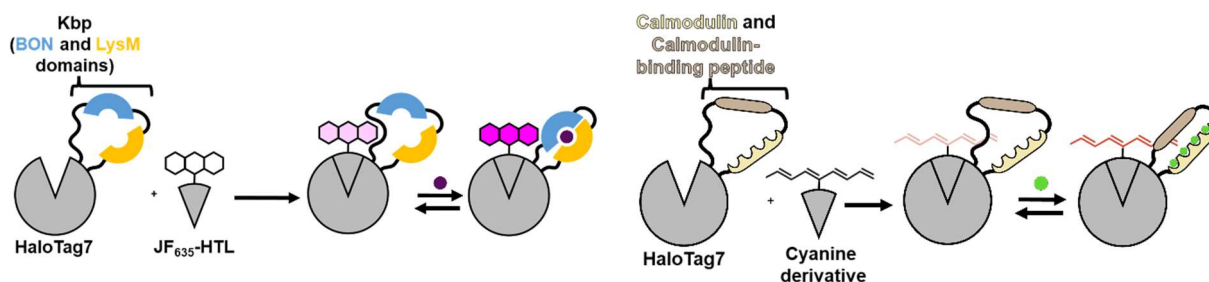
○程大洲¹・寺井琢也¹・ロバート・キャンベル・アール¹ (¹東大院理)

Development of chemigenetic far-red and near-infrared fluorescence indicators for metal ions (¹Graduate School of Science, The University of Tokyo) CHENG, Dazhou¹; TERAII, Takuya¹; CAMPBELL, Robert E.¹

蛍光センサーとは細胞内の標的物質と結合する事でその蛍光が変化する機能性分子であり、生きた細胞内あるいは生物個体中のイオン、代謝産物などの標的が、どのように分布、移動し、相互作用しているかを可視化できるツールである。これまで、合成低分子または蛍光タンパク質を用いたセンサーが多数開発されてきたが、近年では蛍光分子とタンパク質を併用する化学遺伝学 (chemigenetic) 蛍光センサーもいくつか開発されている。化学遺伝学センサーとは、蛍光分子とタンパク質が自己ラベル化タンパク質を介して特異的に結合したもので、標的分子の濃度に応じて蛍光強度が変化する。しかし、この手法は現在のところ限られた標的分子にしか適用されていない上、この種のセンサーの第一世代についてはタンパク質工学を用いた更なる最適化が必要である。さらに、現在の化学遺伝学蛍光センサーは 700 nm 以上の近赤外波長にはほとんど展開されていない。

本研究では HaloTag をタンパク質基本骨格として用い、生体内で重要な役割を果たすカリウムイオン (K^+) とカルシウムイオン (Ca^{2+}) の検出を目指した。一つめの研究ではまず、 K^+ の結合ドメインである Kbp ペプチドを HaloTag タンパク質中の 32 箇所にもペプチドリンカーを介して挿入した。そして赤色領域のセンサー開発を目指し、これらのタンパク質フレームワークに対して、HaloTag と選択的に結合できるローダミン誘導体赤色蛍光分子 (JF₆₃₅-HTL) を結合させ、 K^+ 依存性の蛍光変化を *in vitro* で評価した (図左)。続いて、一番高い蛍光応答を示すセンサーの変異体について、ペプチドリンカーへのアミノ酸付加とランダム変異導入を行ったライブラリーから最適な変異体を選択した。さらに、センサー全長にランダムな変異導入 (error-prone PCR) を行い、 K^+ による蛍光増加と親和性を増強するための指向性タンパク質進化を実施した。その結果得られた最新の三つの変異体 (HaloKbp1a-c) は、*in vitro* で K^+ 添加により 3000% の蛍光増加を示した。これら三つの変異体は、 K^+ に対してそれぞれ高い、中程度の、そして低い親和性を持ち、実験目的に応じて使い分ける事ができる。これらのセンサーは細胞内でも同様に K^+ 添加による蛍光応答を示した上、HaloKbp1a-c をヒト由来カリウムイオンチャンネル (BK チャンネル) に遺伝子的に融合発現させることで、BK チャンネルへの刺激に伴う細胞からの K^+ 流出も観察する事ができた。

また二つめの研究では、近赤外センサーの開発を目指し、 Ca^{2+} の結合ドメインである Calmodulin タンパク質とその結合ペプチドを、上記と同様に HaloTag タンパク質中の 20 箇所にもペプチドリンカーを介して挿入した。そして、シアニン誘導体である近赤外蛍光分子を結合させ、 Ca^{2+} 依存性の蛍光変化を *in vitro* で評価した (図右)。その結果、 Ca^{2+} 添加によって蛍光強度が 70% の減少を示すセンサーの変異体 (CyHaloCaMP0.1) を同定した。今後は、上の研究と同様にペプチドリンカーとセンサー全長に変異導入を行うことで変異体の最適化を行う。また、色素の標識効率や生理的な Ca^{2+} 濃度変化に対する応答を確認するため、細胞内とマウス体内での実験を実施する。将来的には、さらに他の標的分子の結合ドメインについても同様の方法を用いて近赤外化学遺伝学センサーを開発する予定である。



Incorporation of three-dimensional structure information into machine learning models for the prediction of high-performance oxidases

○ヴァヴリッカ クリストファー¹・湯沢 哲至¹・塩浦 徳幸¹ (¹ 東京農工大学工学部生命工学科)

Incorporation of three-dimensional structure information into machine learning models for the prediction of high-performance oxidases

(TUAT Dept. Biotechnol. Life Sci.¹)

VAVRICKA Christopher John¹; YUZAWA Satoshi¹; SHIOURA Noriyuki¹

Structure-based and machine learning-based methods were combined to discover and engineer various oxidase enzymes, especially pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent oxidases and cytochrome P450 (P450) monooxygenases. First, we applied structure-based rules to curate enzyme sequences into positive and negative groups for machine learning-based classifications. More recently, we have developed methods to incorporate large datasets of enzyme structures together with docking scores to train machine learning models for the prediction of substrate affinity and enzyme activity. These models are applied to the selection of optimal enzyme scaffolds, the rational design of enzyme variant libraries and the iterative process of machine learning-accelerated directed evolution. The resulting evolved oxidase variants can be applied to the biosynthesis of various target chemicals including artificial compounds

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

タンパク質・酵素

座長：田村 朋則（京都大学）

2024年9月13日(金) 14:50 ～ 15:50 A会場 (大会議室101)

[2OA-04] 腸内乳酸菌における葉酸生合成酵素の同定

*佐藤 喬章^{1,2}、加地 楓¹、長澤 舞奈¹、Cann Isaac^{3,4}、跡見 晴幸^{1,2}（1. 京都大学 大学院工学研究科、2. 京都大学 エネ研カーボンネガティブ、3. Dept. of Microbiol., Univ. of Illinois at Urbana-Champaign、4. Carl R. Woese Inst. for Genomic Biol., Univ. of Illinois Urbana-Champaign）

14:50 ～ 15:10

[2OA-05] 亜鉛フタロシアニン置換ミオグロビン-アルブミン融合タンパク質の合成と光線力学活性

*山田 大雅¹、小松 晃之¹（1. 中央大学理工学部）

15:10 ～ 15:30

[2OA-06] 新規蛍光標識リガンドによる中枢神経系における AMPA受容体の精密動態解析

*曾我 恭平¹、Hansel Adriel²、中川 満結¹、柴田 晃大¹、藤原 孝彰²、南後 恵理子^{2,3}、清中 茂樹¹（1. 名古屋大学大学院・工、2. 東北大学・多元研、3. 理研 SPring-8）

15:30 ～ 15:50

腸内乳酸菌における葉酸生合成酵素の同定

○佐藤喬章^{1,2}・加地楓¹・長澤舞奈¹・Isaac Cann^{3,4}・跡見晴幸^{1,2} (1京大院工、
2京大エネ研カーボンネガティブ、3イリノイ大アーバナ・シャンペーン校マイク
ロバイオロジー専攻、4イリノイ大アーバナ・シャンペーン校カール R. ウーズゲ
ノム生物学研究所)

Identification of an enzyme involved in folate biosynthesis in the intestinal lactic acid bacterium (Grad. Sch. of Eng., Kyoto Univ.¹, Integr. Res. Center for Carbon Negative Sci., Kyoto Univ.², Dept. of Microbiol., Univ. of Illinois at Urbana-Champaign³, Carl R. Woese Inst. for Genomic Biol., Univ. of Illinois Urbana-Champaign⁴)
SATO, Takaaki^{1,2}; KACHI, Kaede¹; NAGASAWA, Maina¹; CANN, Isaac^{3,4}; ATOMI, Haruyuki^{1,2}

ヒト腸内には多様かつ膨大な数の細菌が生息しており、腸内細菌叢を形成している。その構成は加齢や抗生物質の摂取などによって変化することが分かっているが、細菌叢のバランスを保つことがヒトの健康にとって良い影響を与えることが示唆されている。悪玉菌や善玉菌に特異的な代謝系や代謝酵素を同定できれば、悪玉菌の増殖のみを抑制する、もしくは善玉菌の増殖のみを活性化するなどして腸内細菌叢を制御できるようになる可能性がある。そこで、我々はまず個々の腸内細菌の代謝を理解することを目指して研究を進めている。

葉酸はビタミン B 群の一つで、その還元体であるテトラヒドロ葉酸は 1 単位の炭素を受け取り、それを様々な代謝中間体へ付加することによってアミノ酸や核酸の生合成に寄与している。葉酸の骨格の一部 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin diphosphate は GTP から 7,8-dihydroneopterin 3'-triphosphate (DHNTp)および 7,8-dihydroneopterin 3'-monophosphate (DHNMP)を経て生合成される。多くの細菌において DHNTp からピロリン酸を脱離して DHNMP を生成する DHNTp pyrophosphohydrolase (FolQ)は同定されていなかった。しかし 2005 年に乳酸菌 *Lactococcus lactis* において⁽¹⁾、また 2007 年には *Escherichia coli* ⁽²⁻³⁾においてそれぞれアミノ酸配列が異なる酵素が同定された（ここではそれぞれを FolQ1 および FolQ2 とする）。しかし、これらの遺伝子の分布は限定的であり、第三の DHNTp pyrophosphohydrolase が存在する可能性が示唆された。善玉菌とされる乳酸菌 *Limosilactobacillus reuteri* は既知の葉酸生合成遺伝子のほとんどをゲノム上に有しているにもかかわらず、FolQ1 および FolQ2 酵素のいずれのホモログも持たない。そこで、本研究では腸内乳酸菌 *L. reuteri* における DHNTp pyrophosphohydrolase の同定を目的とした。

候補遺伝子を選抜するためにゲノム情報を解析したところ、葉酸生合成遺伝子を含むオペロン内に Ham1 family protein や XTP/dITP diphosphohydrolase と推定されている機能不明な Lreu_1276 遺伝子を見出した。Lreu_1276 がコードする組換え型タンパク質を大腸菌で調製・精製し、精製酵素の解析を進めたところ、DHNTp pyrophosphohydrolase 活性を示すことが明らかとなった。興味深いことに、FolQ1 や FolQ2 は Mg²⁺イオンを利用するのに対し、本酵素は Mn²⁺イオンを最も好み、DHNTp に対する基質特異性も高いことが明らかとなった。Lreu_1276 遺伝子の分布は *folQ1* および *folQ2* の分布と全く重複しておらず、またそのアミノ配列や立体構造は FolQ1 および FolQ2 のものと似ていなかった。以上のことから、Lreu_1276 が *L. reuteri* における新規 DHNTp pyrophosphohydrolase であり、またその酵素やそのホモログが細菌における第三の DHNTp pyrophosphohydrolase (FolQ3)であることを明らかにできた⁽⁴⁾。

(1) S.M. Klaus, A. Wegkamp, *et al*, J. Biol. Chem. 280:5274-5280 (2005)

(2) Y. Suzuki, G.M. Brown., J. Biol. Chem. 249:2405-2410 (1974)

(3) S.B. Gabelli, M.A. Bianchet, *et al*, Structure 15:1014-1022 (2007)

(4) K. Kachi, T. Sato, M. Nagasawa, I. Cann, H. Atomi., Appl. Environ. Microbiol. e0081424, doi: 10.1128/aem.00814-24, Online ahead of print (2024)

亜鉛フタロシアニン置換ミオグロビン-アルブミン融合タンパク質の合成と光線力学活性

○山田大雅¹・小松晃之¹(¹中央大理工)

Synthesis and photodynamic activity of zinc-phthalocyanine substituted myoglobin-albumin fusion protein
(Chuo Univ. Faculty of Sci. and Eng.¹) YAMADA, Taiga¹; KOMATSU, Teruyuki¹

光線力学療法(Photodynamic therapy: PDT)は腫瘍に蓄積した光増感剤を励起し、酸素(O_2)へのエネルギー移動で生成する一重項酸素(1O_2)により細胞死を誘導するがん治療法である。光増感剤としては水溶性ポルフィリン類が用いられ、フタプリンやレザフィリンなどが認可されている。しかし、一般的なポルフィリン化合物は水中で凝集して光活性を失うため、PDT 用光増感剤として機能しない。もし、疎水性ポルフィリンを PDT に活用することができれば、治療薬の選択肢は大いに広がる。近年、ヘムタンパク質の鉄プロトポルフィリン IX (FeP: heme)を異種ポルフィリンで置換した再構成ヘムタンパク質を調製し、PDT に応用する研究が注目を集めている¹。我々は、ミオグロビン(Mb)にヒト血清アルブミン(HSA)を連結した Mb-HSA 融合タンパク質を合成し、その亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnP) 置換体(ZnMb-HSA)ががん細胞に対して PDT 活性を示すことを明らかにした²。本研究は、より優れた抗がん活性を発現させるために、亜鉛フタロシアニン(ZnPc)置換 Mb-HSA (ZnPcMb-HSA)を合成し(**Fig. 1A**)、その構造、光化学特性、細胞取込み、PDT 活性を明らかにすることを目的とした。

まず、ピキア酵母を用いて Mb-HSA を産生し、アフィニティークロマトグラフィーで精製した²。酸-ブタノン法により FeP を除去した後(apoMb-HSA)、ZnP を添加して ZnMb-HSA を得た。FITC で標識した ZnMb-HSA を用いて HeLa 細胞に対する取込み能を評価したところ、ZnP のみが細胞内に観測された。ZnPcMb-HSA から解離した ZnP が細胞内に取込まれ、タンパク質部分は取込まれないことが明らかとなった。ZnPcMb-HSA で処理した HeLa 細胞に白色 LED 光を 10 分間照射すると(400–700 nm, 25 mW/cm², 10 min)、ZnP 濃度依存的に細胞生存率が低下した(**Fig. 1B**)。IC₅₀は 5 μM であり、ZnPcMb-HSA (IC₅₀ = 4 μM)と同等であった。

次に、apoMb-HSA と ZnPc を混合し、ZnPcMb-HSA を合成した。ZnPcMb-HSA の UV-vis スペクトルおよび蛍光スペクトルは ZnPcMb と一致し、ZnPc が Mb 部位に結合していることがわかった。光照射による 1O_2 生成能は ZnPcMb と等しく、HSA が結合しても光化学特性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。ZnPcMb-HSA をがん細胞に加えると、ZnPc 同様 ZnPc のみが細胞内に取込まれた。ZnPcMb-HSA で処理した HeLa 細胞に赤色光を照射し(620–700 nm, 10 mW/cm², 10 min)、抗がん活性を評価した。IC₅₀は 0.14 μM であり、ZnPcMb-HSA の 1/36 に低下した。ZnPcMb-HSA は ZnPcMb-HSA に比べて、低濃度、長波長かつ弱い強度で、著しく高い PDT 活性を発現することがわかった。

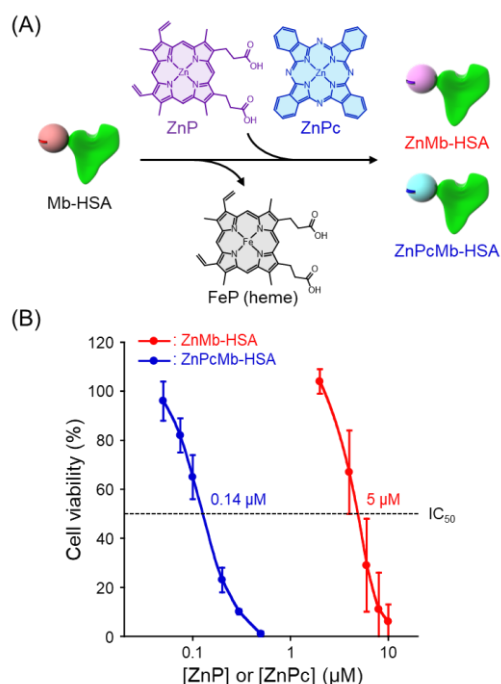


Fig. 1 (A) Synthetic illustration of ZnMb-HSA and ZnPcMb-HSA. (B) Cell viability of HeLa cells treated with ZnMb-HSA and ZnPcMb-HSA under light irradiation (ZnMb-HSA: 25 mW/cm², ZnPcMb-HSA: 10 mW/cm² for 10 min)

1) T. Yamada and T. Komatsu, *ChemMedChem*, **2023**, 18, e202300373, 2) T. Yamada and T. Komatsu et al., *Chem. Eur. J.* **2023**, 29, e202203952.

新規蛍光標識リガンドによる中枢神経系における AMPA 受容体の精密動態解析

○曾我恭平¹・Hansel Adriel²・中川満結¹・柴田晃大¹・藤原孝彰²・南後恵理子^{2,3}・清中茂樹¹ (¹名大院工、²東北大多元研、³理研 SPring-8)

Novel chemical probe to quantify the AMPA receptor trafficking in neurons (Grad. Sch. Eng. Nagoya Univ. ¹, IMRAM, Tohoku Univ.², RIKEN SPring-8³) SOGA, Kyohei¹; Hansel Adriel²; Nakagawa, Mayu¹; Shibata, Akihiro¹; Fujiwara, Takaaki²; Nango, Eriko^{2,3}; Kiyonaka, Shigeki¹

中枢神経系では、神経細胞どうしが神経伝達物質の授受を介して情報伝達を行っている。神経伝達は、外界からの種々のシグナルに応答して、その強度が強弱することが知られている。特に、神経伝達が亢進する機構は長期増強 (LTP) と呼ばれ、記憶・学習の分子基盤であることが知られている。LTP に関わる神経伝達物質受容体として、興奮性の神経伝達を担う AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) がある。LTP 時、シナプス膜上の AMPA 受容体発現量は増加し、情報伝達がさらに亢進することが知られている。しかし、発現量が増加する詳細なメカニズムは、未だ十分に理解されていない。

我々は過去に、AMPA 受容体を可視化するため、リガンド指向性化学とクリックケミストリーを組み合わせた二段階ラベル化法を開発した。この方法は、内在的に発現する受容体を共有結合的に色素修飾可能であるため、受容体の半減期といった経時的な変化解析に非常に有用であった。しかし、ラベル化に数時間以上を要するため、迅速な可視化が困難であることが問題点として挙げられた。また、一度細胞表層に出てきた成分しかラベル化できないため、LTP によって新たにエキソサイトosis してくるような成分のラベル化は不可能であった。

そのような問題点を克服するため、任意のタイミングで細胞表層の AMPA 受容体を瞬時に可視化できる蛍光標識リガンドの開発を行った。AMPA Receptor Fast Staining 488 (AMPA-FS488)と名付けたプローブは 10 秒以内というごく短時間で神経細胞に内在的に発現する AMPA 受容体の標識が可能であることがわかった。また、バッファーによる洗浄操作で容易に洗い流せることから、可逆的な標識も可能である。このような、迅速かつ可逆的な特徴を利用し、LTP 時の AMPA 受容体の発現量の増加を捉えることにも成功した。さらに、経時変化解析に強い手法である二段階ラベル化法と組み合わせることによって、従来不明であった、AMPA 受容体の発現量の増加メカニズムの解析にも成功した。

本発表では、蛍光標識リガンドの分子設計、培養神経細胞を用いた動態解析の詳細について報告する。

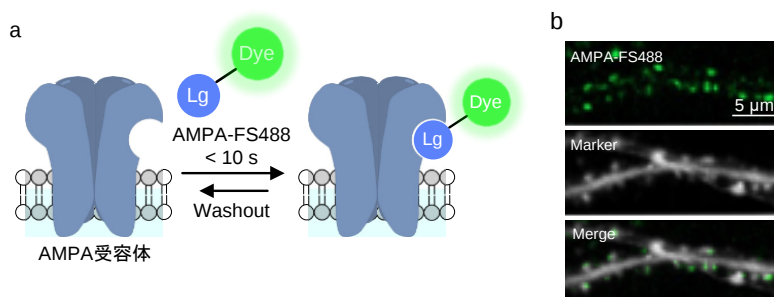


Fig. (a) Schematic illustration of AMPAR staining using AMPA-FS488. (b) Confocal live imaging of cultured hippocampal neurons stained with AMPA-FS488.

一般口頭発表 | ペプチド

ペプチド

座長：生長 幸之助（産業技術総合研究所）

2024年9月13日(金) 13:40 ～ 14:40 B会場 (大会議室102)

[2OB-01] 肝臓ミトコンドリアに対する選択的膜透過糖ペプチドの開発

*野村 幸汰^{1,3}、大庭 誠²、沼田 圭司^{1,3}（1. 京都大学工学研究科、2. 京都府立医科大学医学研究科、3. 理化学研究所）

13:40 ～ 14:00

[2OB-02] 人工ペプチドによる細胞膜脂質運動の操作

*中尾 裕之¹、清水 裕道¹、木村 優介¹、柴崎 蒼太¹、池田 恵介¹、中野 実¹（1. 富山大学学術研究部薬学・和漢系）

14:00 ～ 14:20

[2OB-03] パラトーシスを誘導するイリジウム(III)錯体-環状ペプチドハイブリッドの設計、合成及び作用メカニズムの検討

*成島 希海¹、東條 敏史¹、青木 伸^{1,2}（1. 東京理科大学薬学部、2. 東京理科大学総合研究院）

14:20 ～ 14:40

肝臓ミトコンドリアに対する選択的膜透過糖ペプチドの開発

○野村幸汰^{1,2}・大庭誠³・沼田圭司^{1,2} (¹京大院工、²理研、³京都府立医科大院医)

Chemical Design of Hepatic Mitochondria Targeting Glycopeptide and Analysis of Uptake Pathways

(Graduate school of Engineering, Kyoto university¹, RIKEN², Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine.³) NOMURA, Kota^{1,2}; OBA, Makoto³, NUMATA, Keiji^{1,2}

Cell penetrating peptides (CPPs) are small peptides that effectively penetrate cell membranes, delivering diverse substances including itself, enzymes, DNA, and drugs into the cells.¹ However existing CPPs face still two challenges: no cell selectivity and enzymatic rapid biodegradation.² To address these issues, cell and organelle selective penetrating glycopeptides were newly designed by modification of existing mitochondria targeting peptides (MTPs), which has no cell permeability by itself, and incorporation of N-acetyl galactosamine (GalNAc) as a sugar ligand for enhancing hepatic cellular uptake. GalNAc moieties can achieve enhanced hepatic cellular selective incorporation by specifically binding to asialoglycoprotein receptors (ASGPR) on cell membranes.³ Furthermore, the mitoNEET⁴ sequence as MTPs of the glycopeptide also facilitates their translocation to the mitochondria, thereby enabling hepatic mitochondrial selective drug delivery system. Some glycopeptide derivatives with different GalNAc positions were chemically synthesized using microwave-assisted solid-phase peptide synthesis and CuAAC (Copper-catalyzed azide-alkyne cycloadditions) with lutidine and tetrakis(copper hexafluorophosphate (Figure 1). All derivatives were incubated with various cancer cell lines (HeLa, HEK, HuH7, HepG2), and the cellular uptake was determined by flow cytometry and confocal microscopy. The results showed glycopeptide derivatives were taken up only by HepG2 liver cells, which express ASGPR on the cell surface, and colocalized in mitochondria. This time newly designed glycopeptide with GalNAc and mitoNEET sequence selectively penetrates the hepatic mitochondria (Figure 2). Endocytic inhibitor assays of cellular uptake showed the designed glycopeptides are taken up into cells by clathrin-mediated endocytic pathways using ASGPR. Moreover, circular dichroism (CD) and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that GalNAc motifs have no negative effects on the α -helix formation of mitoNEET peptides in the cell membrane and sugars inhibited biodegradation by some proteases, extending half-life in the biological system to make glycopeptides suitable for long-term delivery *in vivo*. Hepatic mitochondria-selective penetrating glycopeptides generated based on our module combination strategy (signaling peptides and sugar ligands) will overcome the limitations of existing CPPs and drug delivery system (DDS), providing efficient cell-selective therapy.

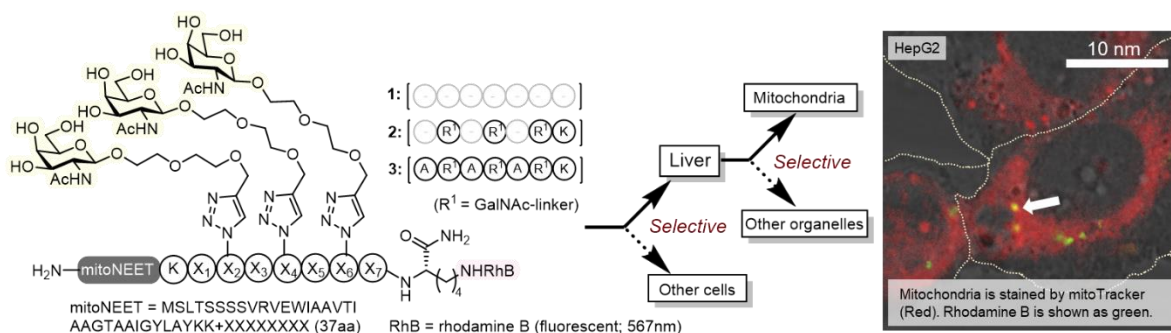


Figure 1. Hepatic mitochondria targeting glycopeptides and the pathway of incorporation. Figure 2. Colocalization in HepG2.

Reference; 1) Desale, K. et al. *Biomater. Sci.* **2021**, 9, 1153.; 2) Fominaya, J. et al. *Ther. Deliv.* **2015**, 6, 1171.; 3) Hu, J. et al. *Protein Pept. Lett.* **2014**, 21, 1025.; 4) Wang, Y. et al. *J. Biol. Chem.* **2017**, 292, 10061.

人工ペプチドによる細胞膜脂質運動の操作

○中尾裕之・清水裕道・木村優介・柴崎蒼太・池田恵介・中野実（富山大薬）

Manipulation of lipid motion in the plasma membrane by artificial peptides (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Univ. Toyama) NAKAO, Hiroyuki; SHIMIZU, Hiromichi; KIMURA Yusuke; SHIBASAKI, Sota; IKEDA, Keisuke; NAKANO, Minoru

真核生物の細胞膜は、通常、トランスポーターによるエネルギー依存的な一方の脂質輸送によって内外層で非対称な脂質組成が維持されている。外層にはホスファチジルコリン (PC) やスフィンゴミエリン、内層にはホスファチジルセリン (PS) やホスファチジルエタノールアミンが局在している。脂質非選択的に両方向の輸送を行うリン脂質スクランブラーゼが活性化されると、この非対称性が崩壊する。リン脂質スクランブラーゼの活性化は、マクロファージによる細胞貪食、血液凝固、細胞外小胞の放出など、様々な細胞機能の発現において見られる。したがって、スクランブラーゼの機能を模倣した人工分子によって細胞膜脂質非対称性の崩壊を誘導することができれば、細胞機能を制御することが可能になると考えた。我々は、モデル膜において脂質スクランブリング活性を発現する膜貫通ペプチドを開発してきた (1-3)。これらのペプチドは、膜貫通配列中に配置した親水性残基が脂質の極性頭部と相互作用することで脂質の膜を横切る移動を促進する。しかしながら、凝集を抑制する目的で両末端に荷電性残基を配置していたため、これらのペプチドを外部から脂質膜に挿入することは困難であった。本研究では、荷電性残基を N 末端のみに配置することで、疎水性の C 末端側から挿入されることを想定したペプチドを新たにデザインし (図 1 上)、モデル膜・培養細胞に添加したペプチドの脂質スクランブリング活性を評価した。

N 末端に Arg を 4 残基、Leu と Ala 残基からなる膜貫通配列に親水性残基を配置したペプチドを合成した (図 1 上)。モデル膜として主に PC からなる脂質ベシクルを用いた。CD スペクトル測定によりベシクルに添加したペプチドは α ヘリックス構造を形成することが示された。蛍光標識した PS を用いて脂質スクランブリング活性を評価すると、膜貫通領域に親水性残基を 2 残基配置した 4R2Q、4RRH の活性が高いことが明らかになった。

培養細胞として HEK293 を用いて、ペプチド添加による脂質非対称性の崩壊について検討した。通常内層に局在している PS の細胞表面への露出を非対称性崩壊の指標とした。蛍光標識した annexin V (PS に特異的に結合するタンパク質) を用いて、フローサイトメトリー・蛍光顕微鏡により PS 露出細胞を検出した。モデル膜と同様に、親水性残基を 2 残基有するペプチド 4R2Q、4RRH

を添加すると、PS 露出細胞の割合が大きく増大した (図 1 下)。蛍光顕微鏡観察により添加したペプチドは細胞膜に局在していることが示された。細胞膜のペプチド結合量と annexin V の結合量には正の相関がみられた。これらのことから、細胞膜に挿入されたペプチドが脂質スクランブリングを起こすことで、脂質非対称性を崩壊させることが示唆された。

1. M. Kaihara, H. Nakao, *et al.*, Chem. Phys. 419, 78-83 (2013)
2. H. Nakao, *et al.*, J. Phys. Chem. B 122, 4318-4324 (2018)
3. H. Nakao, *et al.* J. Phys. Chem. Lett. 11, 1662-1667 (2020)

4RL R₄ALALALALALWLLALALALA
4RQ R₄ALALALALALAQLWLLALALALA
4R2Q R₄ALALALQLAQLWLLALALALA
4RRH R₄ALALALRLAHLWLLALALALA

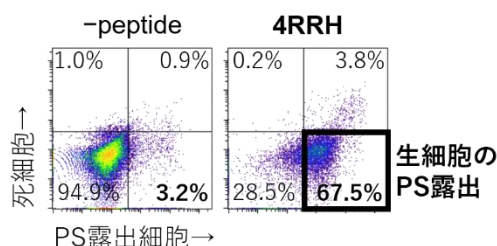


図 1. 脂質スクランブリングペプチドの配列とペプチド添加による PS 露出

パラトーシスを誘導するイリジウム(III)錯体-環状ペプチドハイブリッドの設計、合成及び作用メカニズムの検討

○成島希海¹・東條敏史¹・青木伸^{1,2} (¹東京理大薬、²東京理大総合研究院)

Design, synthesis and mechanism of action of iridium(III) complex-cyclic peptide hybrids inducing paraptosis (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science¹, Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science²) NARUSHIMA, Nozomi¹; TOJO, Toshifumi¹; AOKI, Shin^{1,2}

【背景・目的】

当研究室では、シクロメタレート型イリジウム(III) (Ir(III))錯体とカチオン性直鎖ペプチド H-Lys-Lys-Lys-Gly-Gly (H-KKKGG, K: lysine, G: glycine)のハイブリッド分子(iridium(III) complex-peptide hybrids as amphiphilic conjugates, IPH-ACs)がヒト白血病性がん細胞である Jurkat 細胞に対して選択的な細胞死誘導活性を示す($EC_{50} = 1.5 \mu M$)ことを報告した。これらの IPH-AC は小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入と小胞体とミトコンドリアの膜融合を伴って、プログラム細胞死の一つであるパラトーシスを誘導することが示唆されている。

一方、近年特殊ペプチドとして環状ペプチドが注目されている。生理活性ペプチドを環状化すると、一般的にコンホメーション固定、消化酵素による分解の抑制、脂溶性向上、細胞膜透過性の改善などが期待できる。そこで本研究では、より高い細胞死誘導活性と安定性を期待して、Ir(tpy)₃ の 5'位に環状ペプチドを導入した IPH-AC を合成し、そのがん細胞死誘導活性評価を行った。

【方法・結果】

IrCl₃・3H₂O と tpy (2-(4'-tolyl)pyridine)から Ir(tpy)₃ を合成した後、位置選択的ホルミル化と続く酸化反応によってカルボン酸体とし、C8 リンカーと縮合させた。一方、固相合成により得られた直鎖ペプチドから対応する環状ペプチドを合成し、Ir 錯体の C8 リンカー部と縮合して目的の化合物を得た。そのがん細胞死誘導活性を、蛍光顕微鏡による細胞形態変化観察と MTT アッセイで評価した。また IPH-ACs の発光機能を利用して、IPH-AC で処理した Jurkat 細胞について、細胞内 Ca^{2+} や細胞内小器官の蛍光プローブとの共染色を行い、IPH-AC によるパラトーシスの分子機構の解析を行った。本発表では、これらの結果について報告する予定である。

一般口頭発表 | 核酸関連

ペプチド・核酸関連

座長：岡村 秀紀（東北大学）

2024年9月13日(金) 14:50 ～ 15:50 B会場 (大会議室102)

[2OB-04] インクジェット技術と膜透過性ペプチドを用いた細胞内導入評価

大村 美香¹、二宮 蒼平¹、藤原 大佑¹、道上 雅孝¹、藤井 郁雄¹、*中瀬 生彦¹（1. 大阪公立大学 大学院理学研究科）

14:50 ～ 15:10

[2OB-05] フタロシアニン系光増感剤による四重鎖核酸の分子認識および光分解

*百武 篤也¹、本間 詩織¹、小田原 祐介¹（1. 筑波大学 数理物質系 化学域）

15:10 ～ 15:30

[2OB-06] 非環状型人工核酸と人工塩基からなる抗 miR-21核酸の開発

*神谷 由紀子^{1,2}、佐藤 史経²、坂下 清佳²、劉 学瑩³、喜納 宏昭³、片岡 一則³、浅沼 浩之²（1. 神戸薬科大学、2. 名大院工、3. ナノ医療イノベーションセンター）

15:30 ～ 15:50

インクジェット技術と膜透過性ペプチドを用いた細胞内導入評価

大村美香¹・二宮蒼平¹・藤原大佑¹・道上雅孝¹・藤井郁雄¹・〇中瀬生彦¹(¹ 阪公大院理)

Assessment of intracellular delivery by cell-penetrating peptides using inkjet-based technology (Graduate School of Science, Osaka Metropolitan Univ.¹) OMURA, Mika¹; NINOMIYA, Sohei¹; FUJIWARA, Daisuke¹; MICHIGAMI, Masataka¹; FUJII, Ikuo¹; NAKASE, Ikuhiko¹

細胞内導入法として、例えばマイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法が挙げられる。これらの方法は確実性が高く細胞内導入効率が高い一方で、作業効率が低く細胞生存率への影響が大きい。また、細胞内導入に特殊な機器が必要であり、実験技術が結果を大きく左右するといった問題点が存在する。本研究ではこれらの問題点を解決するために、インクジェット装置と膜透過性ペプチド (cell-penetrating peptide, CPP) を用いた新たな細胞内導入技術の開発 (Inkjet-CPP 法) を進めている。インクジェット装置により、液滴量と滴下速度、滴下位置を精密に制御することができ、加えて超微細インクジェットヘッドを併用することで微量の標的投与が可能となる (~20 pL/shot)。本装置を用いることで、より少ない薬物を狙った細胞内へ確実に届けることを目標にしている。また高い細胞膜透過機能を有する CPP は、通常なら細胞膜を透過できない高分子の薬物やナノ粒子を細胞内へ送達できることが明らかにされている¹。インクジェット装置での、CPP を用いた標的細胞への高い細胞内導入効率の達成と低い細胞毒性を目標に、特にサイトゾルへの効率的な薬物導入技術の構築を目指している²。

CPPの一種である蛍光標識FHV Coat (35-49)ペプチド³ を、超微細インクジェットヘッド (PulseInjector) を搭載したインクジェット装置 (クラスターテクノロジー社) により、ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞へ添加したところ、通常の細胞操作による添加時に比べて、低濃度かつ少量でのサイトゾル移行が可能であることを確認した。また、細胞死誘導配列ペプチド (PAD)^{4,5} について、FHV配列をPADに付加することで、インクジェット装置による本技術での細胞内導入、及び、顕著な細胞死誘導を確認することができた。さらに、CPPsとの組み合わせにより、タンパク質、エクソソーム、IgG抗体といった巨大分子の細胞内導入に成功した²。現在、インクジェットを用いた各CPPの細胞内移行性を検討し、オンデマンドな細胞内送達条件に適うようなシステム構築に向けた研究展開を行なっている。CPPの種類によって、インクジェット吐出による膜透過性効率、及び、その細胞群の移行範囲が異なることが確認されている。インクジェットヘッドのピエゾ素子の電圧制御による吐出速度コントロールで、ペプチドの細胞膜通過効率の増減を可能とし、さらに液滴の吐出回数制御で、移行範囲を変化させることができる。本手法は、細胞膜損傷を生じない細胞内への薬物導入技術として応用性が高いことが考えられ、今後さらに実用化を指向したInkjet-CPP法の技術構築を進める。

1. S. Futaki, I. Nakase, *Acc. Chem. Res.*, **50** (2017) 2449-2456
2. M. Omura, K. Morimoto, Y. Araki, H. Hirose, Y. Kawaguchi, Y. Kitayama, Y. Goto, A. Harada, I. Fujii, T. Takatani-Nakase, S. Futaki, I. Nakase, *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **15** (2023) 47855–47865
3. I. Nakase, H. Hirose, G. Tanaka, A. Tadokoro, S. Kobayashi, T. Takeuchi, S. Futaki, *Mol. Ther.*, **11** (2009) 1868-1876
4. H.M. Ellerby, W. Arap, L.M. Ellerby, R. Kain, R. Andrusiak, G.D. Rio, S. Krajewski, C.R. Lombardo, R. Rao, E. Ruoslahti, D.E. Bredesen, R. Pasqualini, *Nat. Med.*, **5** (1999) 1032-1038
5. I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J.C. Simpson, A.T. Jones, Y. Sugiura, S. Futaki, *Mol. Ther.*, **10** (2004) 1011-1022

フタロシアニン系光増感剤による四重鎖核酸の分子認識および光分解

○百武篤也・本間詩織・小田原祐介（筑波大数理物質系化学域）

Molecular Recognition and Photodegradation of G-Quadruplex Nucleic Acids by Phthalocyanine-Based Photosensitizers (Department of Chemistry, University of Tsukuba)MOMOTAKE, Atsuya; HOMMA, Shiori; ODAHARA, Yusuke

連続したグアニンが DNA 塩基配列中に豊富に存在すると、カリウムイオンなどのカチオンの存在下で、4 つのグアニン塩基が同一平面内に水素結合を介して環状に連結した G-カルテットを形成し、四重鎖 DNA となることがある (Fig. 1A)。¹ 四重鎖 DNA は遺伝子発現の調節や染色体の安定性に関与しており、抗癌薬のターゲットとして注目されていることから、四重鎖 DNA の構造と機能の解明は、遺伝子調節や病気の治療法開発において重要な意義を持つと考えられている。

水溶性フタロシアニンはその優れた色素特性や安定性から多くの用途で使用されているが、医療分野においては光線力学療法 (PDT) に有用な光増感剤として期待されている。本研究では、カチオン性およびアニオン性側鎖を持つ水溶性亜鉛フタロシアニン **1**² および **2** (Figs. 1B and 1C) と四重鎖 DNA との相互作用および複合体の構造解析さらに、水溶性フタロシアニン存在下における光照射による四重鎖 DNA の光分解反応を解析した。

カチオン性亜鉛フタロシアニン **1** は、d(TTAGGG) からなる四重鎖 DNA [d(TTAGGG)]₄(GQ) の G-カルテットの 5'-側に π - π スタッキング相互作用を通じて結合することが ¹H NMR による解析で明らかとなった。一方 **1** は二重鎖 DNA に対してはその側鎖に静電相互作用により結合する可能性が示唆された。**1** と GQ からなる複合体に赤色光 (680 nm) を照射したところ、照射時間とともに GQ のイミノプロトンシグナル強度が減少し、GQ の光分解が起こることが明らかになった。一方、二重鎖 DNA の場合は、ZnPc 存在下で赤色光照射しても、DNA の分解は起こらなかった。

アニオン性亜鉛フタロシアニン **2** を GQ と混合すると、G-カルテットの 3'-側に π - π スタッキング相互作用を通じて結合することが ¹H NMR による解析で明らかとなった。また **2** は二重鎖 DNA とは相互作用しなかった。**2** と GQ からなる複合体に赤色光 (680 nm) を照射したところ、GQ の分解が起こることが明らかになった。**2** は水溶液中で凝集するため、自己消光により失活するが、四重鎖 DNA に結合して複合体を形成すると、光照射下での一重項酸素やヒドロキシラジカルの発生量が顕著に増加した。**2** と複合体を形成しない DNA の場合は、光分解は認められなかった。光増感剤と四重鎖 DNA の相互作用と四重鎖 DNA の光分解反応の解明は、PDT の初期過程を分子レベルで理解するために有用であると考えられる。

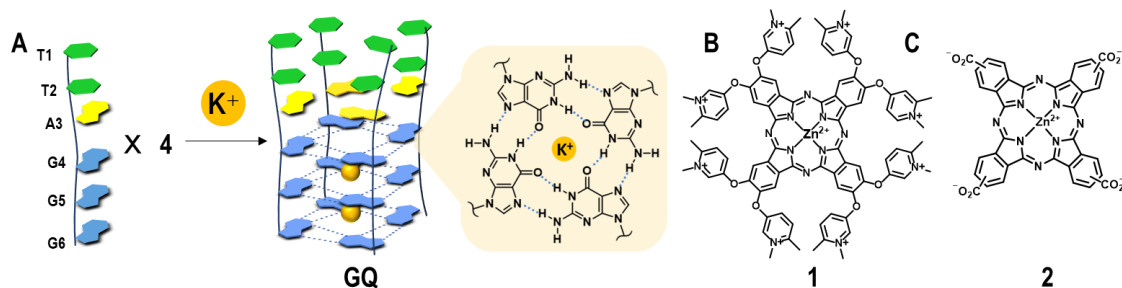


Figure 1. Schematic representation of all parallel-stranded G-quadruplex DNAs formed from d(TTAGGG)(GQ) and G-quartet (A). Molecular structures of cationic phthalocyanine **1** (B), and anionic phthalocyanine **2** (C).

- (1) Sen, D.; Gilbert, W. *Nature* **1998**, 334 (28), 364–366.
- (2) Uchiyama, M.; Momotake, A.; Ikeue, T.; Yamamoto, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2020**, 93 (12), 1504–1508.

非環状型人工核酸と人工塩基からなる抗 miR-21 核酸の開発

○神谷由紀子^{1,2}・佐藤史経²・坂下清佳²・劉 学瑩³・喜納宏昭³・片岡一則³・浅沼浩之² (¹神戸薬科大学、²名大院工、³ナノ医療イノベーションセンター)

Anti-miR21 designed by acyclic nucleic acid and artificial nucleobases (Kobe Pharmaceutical University¹, Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.², Innovation Center of NanoMedicine³) KAMIYA, Yukiko¹; SATO, Fuminori²; SAKASHITA, Kiyoka²; LIU, Xueying³; KINOH, Hiroaki³; KATAOKA, Kazunori³; ASANUMA, Hiroyuki²

酵素耐性能や RNA 親和性を向上させる人工核酸は核酸医薬への応用が期待されている。非環状型人工核酸 Serinol nucleic acid (SNA)および L-threoniol nucleic acid (L-*a*TNA)は、非常に高い酵素耐性を示すことから、核酸医薬品のプラットフォームとして有望である。そこで私たちは非環状型人工核酸を用いて、癌や線維症などの疾患組織において過剰発現する miR-21 を標的とした Anti-miRNA oligonucleotide(AMO21)の開発を進めている[1]。miR-21 は配列に自己相補領域を有する特徴的な miRNA である。非環状型人工核酸は自己親和性が高いために、miR-21 を標的とした場合、対応する自己相補領域を介した自身の相互作用によって、anti-miRNA 活性が低下してしまう問題が生じる。そこで本研究では、非環状型人工核酸の自己相互作用を抑制し、高い miR-21 阻害活性をもつ AMO21 の開発を目指した。

本研究の目的のために、まずは Pseudo-complementary 塩基対である 2,6-ジアミノプリン (D) と 2-チオウラシル (sU) の SNA および L-*a*TNA のアミダイトモノマーの合成法を確立した[2,3]。開発した手法を用いて、D, sU を導入した SNA-AMO21 を調製し miR-21 を発現する細胞を用いて性能評価を進めた。SNA-AMO21 の自己相互作用ならびに anti-miRNA 活性を評価した結果、D と sU を導入することにより、期待通りに SNA-AMO21 の二次構造形成の抑制、さらに miR-21 阻害活性の劇的な向上を達成した(Figure 1)。また、AMO21 の骨格を SNA よりも RNA 親和性の高い L-*a*TNA に置き換えることで、さらに活性を向上させることができた。そこで、D, sU を導入した非環状型人工核酸からなる AMO21 の *in vivo* 評価を実施した。一般に *In vivo* 評価にあたっては、血中滞留性および細胞内移行効率を向上させるために、アンチセンス核酸のホスホジエステル

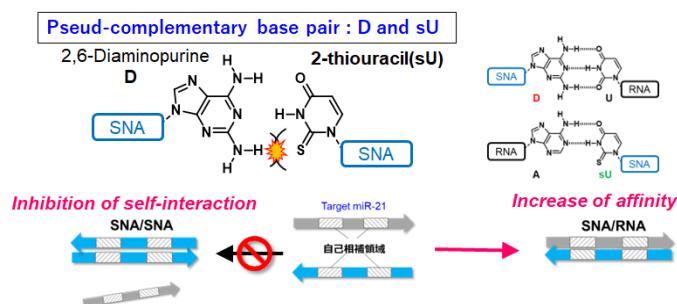


Figure 1 Schematic illustration of SNA-AMO21 having pseudo-complementary bases, 2,6-diaminopurine (D) and 2-thiouracil (sU).

(PO)部位をホスホロチオエート(PS)に置換したものを用いる。しかし、PS 化は RNA 親和性を低下させるため、血中滞留性・細胞内移行効率とアンチセンス活性はトレードオフの関係となる。そこで PO 体の L-*a*TNA-AMO21 を搭載したユニット型ポリイオンコンプレックスを作製し *in vivo* における AMO21 の活性評価を実施した。その結果、D, sU をもつ L-*a*TNA-AMO21(PO)を投与した担癌モデルマウスにおいて、顕著な抗腫瘍効果が得られた。また、特段の肝毒性や腎毒性は観察されなかった。以上より、非環状型人工核酸と人工塩基を用いることで、高活性で安全性の高い AMO21 の開発に成功した。

[1] Y. Kamiya, et al., ChemBioChem, 2017, 18, 1917-1922.

[2] Y. Kamiya, et al., Chem. Asian J., 2020, 15, 1266-1271.

[3] F. Sato, et al., J. Org. Chem., 2023, 88, 796-804.

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：吉村 英哲（東京大学）

2024年9月13日(金) 13:40 ~ 14:40 C会場 (中会議室202)

[2OC-01] 迅速細菌同定を目指したサンガー法に基づく高速 DNAシーケンス技術の開発

*古谷 俊介¹、古谷 のぞみ¹、永井 秀典¹（1. 産業技術総合研究所 先端フォトニクス・バイオセンシングOIL）

13:40 ~ 14:00

[2OC-02] 不安定化変異はセンサ機能の進化を加速する

*木村 友紀¹、梅野 太輔¹（1. 早稲田大学先進理工学部）

14:00 ~ 14:20

[2OC-03] 脂肪酸酸化の非侵襲的計測技術

*松岡 悠太¹、内之宮 祥平²、王子田 彰夫²、杉浦 悠毅¹（1. 京都大学大学院医学研究科、2. 九州大学大学院薬学研究院）

14:20 ~ 14:40

迅速細菌同定を目指したサンガー法に基づく高速 DNA シーケンス 技術の開発

○古谷俊介・古谷のぞみ・永井秀典（産総研先端フォトニクス・バイオセンシングオープンイノベーションラボラトリ）

Development of rapid DNA sequence technology based on the Sanger method aimed at identifying rapid bacteria (Advanced Photonics and Biosensing Open Innovation Laboratory, AIST) FURUTANI, Shunsuke; FURUTANI, Nozomi; NAGAI, Hidenori

敗血症は世界中で感染者数が 48.9 万人と非常に多く、世界の死亡者数の約 20%を占めていると報告されている。また、効果的な抗菌薬治療の開始の遅れと院内死亡率の間に強い相関があることも知られており、抗菌薬投与が 1 時間遅れるごとに 7.6%死亡率が上昇するとの報告もある。そのため、敗血症の治療には早期発見と 1 時間以内の適切な抗菌薬治療が重要である。一方、現在の敗血症における細菌検査のゴールドスタンダードは血液培養法であり、細菌の同定までに数日かかるため、初期の治療は医師の経験的投薬として広域抗菌薬の使用や、多剤併用治療が行われているのが現状である。

我々は、治療初期からエビデンスに基づいた抗菌薬治療を実現するために、サンガー法に基づく DNA シーケンスの高速化による迅速な細菌同定技術の開発を行っている。サンガー法は PCR、蛍光標識、電気泳動の 3 つの要素技術の組み合わせによって DNA 配列を解析する手法である。我々は、これまでに高速サーマルサイクル技術の開発を行っており、マイクロ流路を用いた高速 PCR を実現している¹。この高速サーマルサイクル技術によって、細菌同定に必要な 16S rDNA 配列の PCR および蛍光標識の高速化を行い、マイクロチップ電気泳動を用いた高速電気泳動と組み合わせることで、3 つの要素技術を合計 40 分程度で実現した。また、マイクロチップ電気泳動で得られた蛍光データは、それぞれの蛍光分子毎の移動度の違い及び相互の干渉を補正した配列解析用のアルゴリズムを作成することで配列解析を実現し、得られた DNA 配列を NCBI の Blast search によって細菌の種を同定可能であることを実証した。

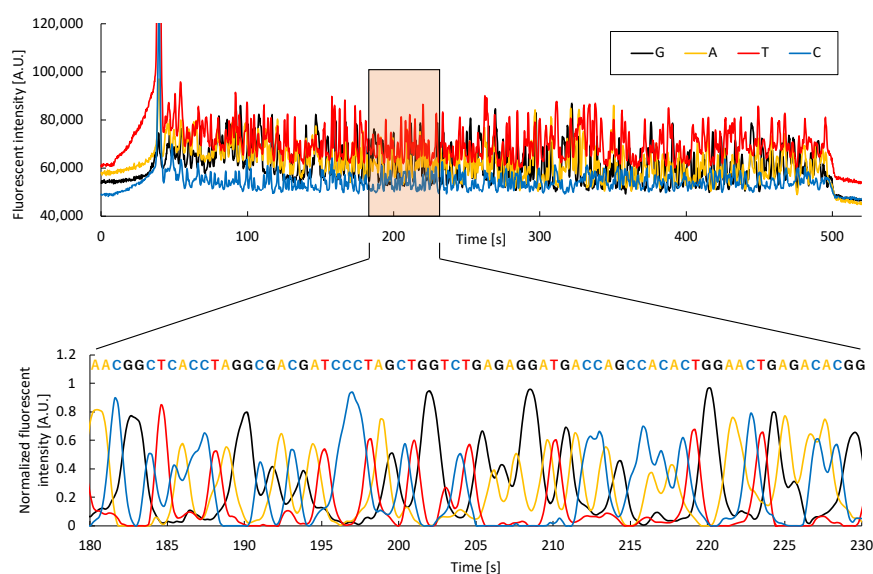


図1 マイクロチップ電気泳動結果と開発したアルゴリズムによる配列変換

1. S. Furutani, *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 5641-5649 (2016)
2. S. Furutani, *et al.*, *Sensors*, 22, 2130 (2022)

不安定化変異はセンサ機能の進化を加速する

○木村友紀・梅野太輔（早大院工）

Mutational destabilization accelerates the evolution of novel sensory functions. (Department of Applied Chemistry, Waseda Univ.) KIMURA, Yuki; UMEMO, Daisuke

我々は、任意の標的分子に対する転写因子型バイオセンサの進化工学技術の確立を目指している。本講演では、タンパク質工学において忌避されてきた「変異による不安定化」がバイオセンサ開発において意外な加速効果をもつことを見出したので、それを報告する。

転写因子型のバイオセンサは、標的分子との結合に伴う構造変化によってレポータ遺伝子（GFP など）の転写開始頻度を変化させる仕組みである。転写因子の構造変化能を温存しつつ、リガンド結合界面を再デザインすることによって、任意の化合物に应答する“バイオセンサ”を開発することができる。これまでに最も徹底的な再デザインが試みられた転写因子は、AraC というアラビノース应答性のものである。これまでに D/L-反転糖やサリチル酸などに应答する AraC 変異体が創出されている。これらはいずれも 4 から 5 個のアミノ酸の同時置換によって得られたものであり、 10^6 を超える多様性の中からスクリーニングによって運良く取得された極めて稀少な変異体である。

以前我々は、ランダム変異の導入によって、驚くほど高い頻度（全体の 10 から 20%）で転写因子の緊縮性（オフ条件での転写“漏れ”）が改善することがあることを発見した¹。これらの変異体は、いずれもその構造安定性が適度に低下しており、リガンドとの結合による安定化によって活性型構造を回復する。我々は、この「ligand-induced folding (LIF)」という現象を動作原理とする新規バイオセンサが、結合界面の作り変えと変異による安定化調節によって高確率で作出できることを見出した。

構造変化型（アロステリック型）と LIF 型のバイオセンサの進化能を比較するために、我々は 2 種類のプロモータを用意した。ひとつは天然のプロモータ（P_{BAD}）であり、应答するためには AraC が構造変化を起こす必要がある。もうひとつは最小化されたプロモータ（P_{BAD7}）で、AraC は構造変化を起こさずとも、リガンド結合による構造安定化さえ受ければ転写を亢進できる。

上の系を利用して、以前報告されたサリチル酸应答型の AraC 変異体（Sal4）² のもつ 5 変異の有無をすべての組み合わせで掛け合わせた $2^5 = 32$ 種類の変異体を作製し、大腸菌内における P_{BAD} と P_{BAD7} に対するサリチル酸应答性を比較した。その結果、アロステリック変化を要求する P_{BAD} 出力で 3 倍以上のオンオフ変化を示したものはわずか 3 個であったが、標的結合による安定化で駆動される P_{BAD7} では 15 個もの変異体が应答した（図 1、青）。つまり、 $15 - 3 = 12$ の変異体は、サリチル酸と結合はできるが、それに伴う構造変化ができないようである。

我々は、これら 12 個の変異体を混合し、araC 遺伝子全域にランダム変異を導入した。P_{BAD} にサリチル酸应答させる変異体を探索したところ、6 個の変異体を得られ（図 1、赤）、変異解析より 3 個の親から派生していることが分かった。これらはいずれも P_{BAD} 应答をわずかに残しており、かつ P_{BAD7} で高いスコアを示した（すなわち、サリチル酸によって強く安定化される）変異体であった。センサタンパク質は、LIF 現象の助けを借りれば構造変化能を犠牲にして新しい分子認識界面を高速に再構築できるうえ、続く構造変化能の回復によって成熟した新規アロステリック应答を獲得する。不安定化変異の出現頻度の高さを考えれば、LIF 現象は、自然界でも新規センサ発明に大きく寄与してきたのかもしれない。

1. Y. Kimura, et al., ACS Synth. Biol., 9, 567–575 (2020).
2. C. S. Frei, et al., Protein Eng. Des. Sel., 31, 213–220 (2018).

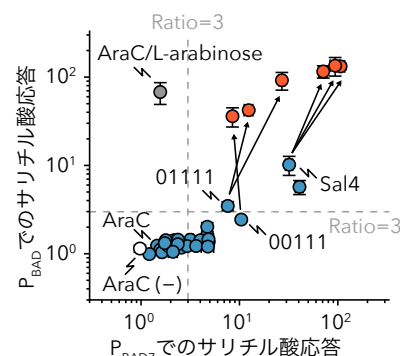


図1 P_{BAD}およびP_{BAD7}で評価したAraC変異体のサリチル酸应答。

青、野生型からSal4に至る全32種類の変異体；赤、ランダム変異導入によって得た変異体；白、AraC (-)。灰は、本来の基質に対する野生型の应答。

脂肪酸酸化の非侵襲的計測技術

○松岡悠太¹・内之宮祥平²・王子田彰夫²・杉浦悠毅¹

¹京大院医、²九大院薬

Non-invasive analysis of fatty acid oxidation *in vivo* (¹Graduate School of Medicine, Kyoto University, ¹Faculty of Pharmaceutical Sciences Kyushu University) **MATSUOKA, Yuta¹**; UCHINOMIYA, Shohei²; OJIDA, Akio²; SUGIURA, Yuki²

生体深部の代謝情報を、個体が生きた状態のまま検出することができれば、従来の破壊的手法では計測できなかった、新たな生命現象の発見や非侵襲的な疾患検査法の開発に繋がる。

脂肪酸酸化 (Fatty Acid Oxidation: FAO)は、脂肪酸を主にミトコンドリアにて異化し、アセチル CoA を産生する一連の代謝反応である。エネルギー産生に重要であり、様々な外因性・内因性ストレスに対して順応することで、個体の恒常性維持に寄与する。これら生体内における FAO 応答・制御を正しく理解するためには、「生きている個体」から、FAO を実測できる技術が必要となる。しかし、生体内の FAO を選択的かつ非侵襲的に計測可能な技術は、現状存在しない。

本研究で我々は、「揮発性ケミカルプローブ」と「生体ガス分析」を用いた生体内 FAO の非侵襲的計測法を開発した。「揮発性ケミカルプローブ」とは、生体内で特定の代謝反応を受けることで、揮発性レポーター分子を放出する小分子プローブを指す。組織内で産生したレポーター分子はその後、血液へと拡散し、最終的に生体ガスとして体外へと放出される。このため、生体ガス中レポーター量を算出することで、生体内の代謝反応を非侵襲的に計測できる (Figure 1)。

開発した揮発性ケミカルプローブを用いることで、培養細胞・実験動物レベルで細胞内・生体内の FAO を非破壊・非侵襲的に計測することに成功した。現在、休眠動物の代謝モニターに、本技術が応用可能か検証を進めており、本講演にて紹介する。

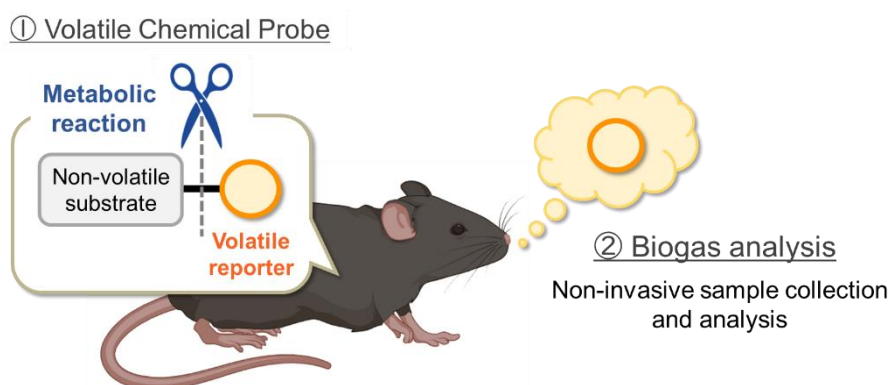


Figure 1. 揮発性ケミカルプローブ・生体ガス分析による生体内代謝反応の非侵襲的計測

一般口頭発表 | メディカルバイオ

分析・メディカルバイオ

座長：小和田 俊行（東北大学）

2024年9月13日(金) 14:50 ～ 15:50 C会場 (中会議室202)

[2OC-04] 骨表面 pH計測に向けたレシオ型蛍光プローブの開発

*蓑島 維文¹、三木 初音¹、菊地 和也^{1,2}（1. 大阪大学工学研究科、2. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター）

14:50 ～ 15:10

[2OC-05] 抗原分解型 Trastuzumabの創製と免疫学的および生化学的性質

*一二三 恵美^{1,2}、辻田 萌¹、田口 博明³、宇田 泰三⁴（1. 大分大学研究マネジメント機構、2. 大分大学グローバル感染症研究センター、3. 鈴鹿医療科学大学薬学部、4. 九州先端科学技術研究所）

15:10 ～ 15:30

[2OC-06] 線維化コラーゲンゲルの紫外線架橋に伴う血管内皮細胞の接着および増殖応答性の変化の解析

*森 英樹¹、井上 聖巴¹、鈴木 咲紀¹、原 正之¹（1. 大阪公立大学大学院理学研究科）

15:30 ～ 15:50

骨表面 pH 計測に向けたレシオ型蛍光プローブの開発

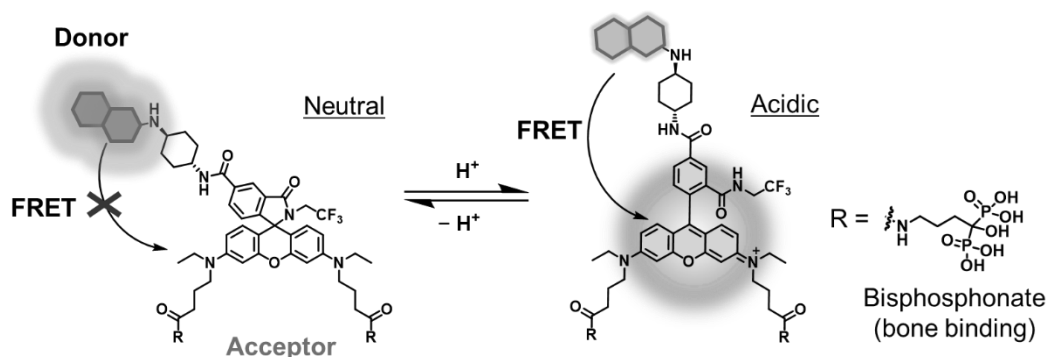
○ 菱島 維文¹・三木 初音¹・菊地 和也^{1,2} (¹ 阪大院工、² 阪大免フロ)

Development of Ratiometric Fluorescent Probe for Measuring pH of Bone Surface (Graduate School of Engineering, Osaka Univ.¹, Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ.²) MINOSHIMA, Masafumi¹; MIKI Hatsune¹, KIKUCHI Kazuya^{1,2}

骨組織では古い骨を溶解し新しい骨が形成される骨代謝が行われており、骨溶解は破骨細胞、骨形成は骨芽細胞がその役割を担っている¹。骨溶解と骨形成のバランスは骨の恒常性維持に深く関連しており、過剰な骨吸収は骨粗鬆症や関節リウマチなどの骨疾患の要因となる。破骨細胞は酸を放出して骨を溶解しており、骨表面局所の pH が低下する。そのため骨表面の pH を計測することは破骨細胞活性を調べるための指標として重要と考えられる。

我々のグループでは、破骨細胞活性を検出するための蛍光プローブ pHocas (pH-activatable probe for osteoclast activity sensing)を開発してきた^{2,3}。この蛍光プローブは骨溶解時の pH 低下により蛍光が上昇する色素を有しており、さらに骨組織への高い結合能を示すビスホスホネート基によって、マウス体内の骨組織へと能動的に送達される。実際にプローブを投与することで、マウス体内における破骨細胞の活性情報を取得することが可能となった。一方で、このような turn-on 型のプローブではプローブ分布に差が生じるため pH の定量的な計測はできないという課題があった。

そこで本研究では、骨表面 pH の正確な測定に向けて、pH の変化により蛍光波長が変化するレシオ型蛍光プローブ”Ratio-pHocas”の開発に取り組んだ。以前の研究で開発した pH によって吸収・蛍光が変化する色素に対し、pH に依存しない蛍光色素を連結することで、Förster 共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用したレシオ型蛍光プローブを設計した (下図)。中性 pH では FRET が起きずドナー側の色素由来の蛍光が現れ、酸性 pH では重なり積分の変化により FRET が起こりアクセプター側の色素由来の蛍光が現れ、蛍光波長が変化するものと期待した。設計したプローブを合成し pH 応答性を蛍光スペクトルで評価したところ、pH 変化に応じて FRET に由来する蛍光波長の変化が観察された。さらに、このプローブを投与したマウスを二光子励起イメージングで観察したところ、骨組織表面からドナー由来、アクセプター由来の蛍光シグナルを観察し、骨表面上の pH の差を可視化することができた。



1. R.C. Riddle and T.L. Clemens, *Physiol. Rev.* **2017**, 97, 667.
2. H. Maeda *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **2016**, 12, 579.
3. M. Minoshima *et al.*, *ACS Cent. Sci.* **2019**, 5, 1059.

抗原分解型 Trastuzumab の創製と免疫学のおよび生化学的性質

〇一二三恵美^{1,2}・辻田萌¹・田口博明³・宇田泰三^{1,4} (1 大分大・研究マネージメント機構, ²同・グローバル感染症研究センター, ³鈴鹿医療大・薬, ⁴九州先端研)

Preparation and biological features of Trastuzumab capable of degrading the antigen (Institute for Research Management, Oita University¹, Research Center for GLOBAL/LOCAL Infectious Diseases, Oita University², Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Science³, Institute of Systems, Information Technologies and Nanotechnologies⁴) HIFUMI, Emi^{1,2}; TSUJITA, Moe¹; TAGUCHI Hiroaki³; UDA, Taizo⁴

Trastuzumab (商品名 ; Herceptin, Tmb と略す)は **Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2 抗原)**に対するヒト化抗体で、1998 年に米国、本邦では 2001 年に承認された抗体医薬品である。乳がん に劇的に効く革新的なバイオ医薬品として上市され、現在でも治療に使われている。これ以降、多くの 抗体医薬品が開発され、世界的に熾烈な開発競争が現在でも繰り広げられている中で、既に「特許切れ」が始まっている。我々が取り組んでいる抗体の酵素化法は、「僅か 1~2 残基の変異導入によって、 既存の抗体が持つ潜在的な抗原分解能を発揮させる」という革新的な手法である¹⁻⁴。これを抗体医薬 品に適用すれば、抗体医薬をさらなる高性能分子として生まれ変わらせることが可能であり、奏効率 の向上に繋がると同時に「特許切れ問題」への対応策と成り得る。そこで、Tmb の酵素化を試み、作 製した抗原分解型 Tmb の各種性質を検討したので報告する。

1. 抗原分解型 Tmb の作製と化学的・免疫学的性質: 本研究で は、Tmb の scFv (Tmb-scFv)に加えて、既報に従って V_L の Pro95, Pro96 を欠失させた「Tmb-scFv-PPΔ」を作製し、Tmb とともに 生化学的及び免疫学的性質を調べた。Fig.1 には FRET 修飾し た Her2 peptide を基質に用いた抗原ペプチド分解試験の結果を 示す。Tmb や Tmb-scFv は、ほとんど Her2 peptide を分解しない のに対して、Tmb-scFv-PPΔ は高い分解性能を示した。さら に、これら 3 者の HER2 に対する免疫学的親和性(K_D)を求めた ところ、Tmb が 1.6nM, Tmb-scFv が 6.94nM, Tmb-scFv-PPΔ が 0.93nM となり、Tmb-scFv-PPΔ の親和性が最も高いことが判っ た。

2. 乳がん細胞に対する効果: ADCC 活性や CDC 活性が惹起しない無血清培地条件下で Her2 高発現の乳がん細胞株(BT-474 clone 5) に対する細胞傷害性試験を実施した。その 結果、Tmb では増殖抑制のみが認められた のに対して、Tmb-scFv-PPΔ では 48 h から細胞変性が起こり始め、培養時間ともに drastic に形態変化と細胞死が観察された (Fig.2 に 72 h の結果を示す)。WST assay による呼吸活性の測定と Apoptosis の有無を調べたところ、呼吸低下と 共に Apoptosis も生じていた。つまり、Tmb-scFv-PPΔ の細胞崩壊は Apoptosis により惹起していた。こ れは、Tmb と Tmb-scFv-PPΔ との細胞傷害メカニズムの違いを示唆するものであり、これらの結果は、 僅か 2 残基の変異導入により Tmb が高機能化し、免疫系の力を借りることなく直接、がん細胞に傷害 を与えていることを示している。

- 1) Hifumi *et al. Science Advances*, **6**(13), eaay6441(2020). 2) Hifumi *et al. Scientific Reports*, **12**, 19185 (2022)
3) Hifumi *et al. Proc. Jpn Academy, Ser B*, **99**, 155-172(2023). 4) Hifumi *et al. Scientific Reports*, **14**, 12184 (2024)

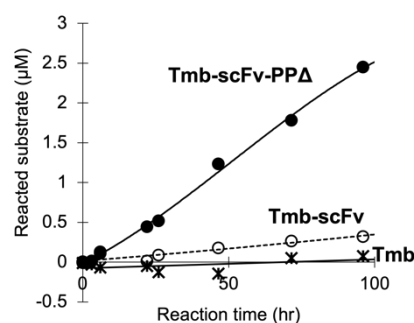


Fig.1 Time course of HER2 peptide degradation by antibodies

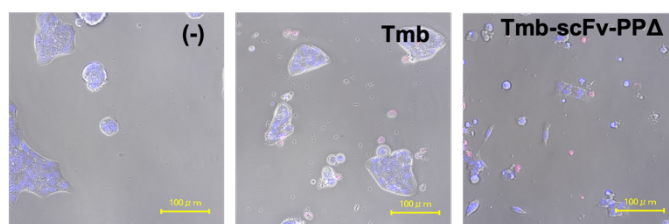


Fig.2 Cytotoxicity assay of Tmb and Tmb-scFv-PPΔ at 72 h of incubation.

線維化コラーゲンゲルの紫外線架橋に伴う血管内皮細胞の接着および増殖応答性の変化の解析

○森英樹¹・井上聖巴¹・鈴木咲紀¹・原正之¹（¹大阪公大院理）

Analysis of changes in adhesion and proliferative responsiveness of vascular endothelial cells upon UV cross-linking of fibrillated collagen gels (Graduate School of Science, Osaka Metropolitan Univ..¹) MORI, Hideki¹; INOUE, Seiha¹, SUZUKI, Saki¹, HARA, Masayuki¹

酸性条件で溶けた I 型コラーゲン溶液を中和すると形成する線維化コラーゲンゲルは、多くのバイオマテリアル研究に用いられる材料であるが、血液脳関門モデルの細胞として用いられるマウス脳毛細血管内皮細胞 (bEnd.3) の線維化コラーゲンゲルへの接着率は細胞培養用ディッシュに比べて低い。コラーゲンゲル表面に紫外線 (UV) 照射処理を施すことによって、接着する bEnd.3 の細胞数が増加した。UV 照射コラーゲンゲルが血液脳関門モデルの足場材料として適当かどうかを調べるために、UV 照射により架橋した I 型コラーゲンゲル上で bEnd.3 細胞を培養し、その接着や増殖、形態変化について調べた。15 分間の UV 照射で架橋した UV 架橋コラーゲンゲルは未架橋の線維化コラーゲンゲルと較べて外観に大きな変化はなかったが、約 2 倍の硬さ (ヤング率) を示した。UV 架橋コラーゲンゲル上では bEnd.3 細胞の接着率だけでなく、細胞増殖率も高かった。また、顕微鏡で経時的に観察したところ、UV 架橋コラーゲンゲル上で培養した細胞は速く増殖し、伸展することで培養 5 日目には細胞間に隙間のない単層状になるのに対して、未架橋の線維化コラーゲンゲル上では細胞数が少なく、細胞間に隙間があり細胞同士が集まって、網目状に繋がる形態を見せた。そこで細胞のコラーゲンゲルと血液脳関門の構造として重要な密着結合について調べるために、I 型コラーゲンに結合するインテグリンのサブユニット遺伝子と密着結合に必要な接着分子である ZO-1 の遺伝子 (Tjp1) の発現を qRT-PCR 法で調べた。Itga2 の発現は UV 架橋コラーゲンゲル上の細胞の方が未架橋の線維化コラーゲンゲル上の細胞より高かったが、Itgb1 の発現には有意差は見られなかった。Tjp1 の発現についても UV 架橋コラーゲンゲル上の細胞の方が未架橋の線維化コラーゲンゲル上の細胞より高かった。細胞間の密着結合の形成といった観点では、未架橋の線維化コラーゲンゲルの方が血液脳関門モデルの足場材料としては有利かもしれない。