

2024年9月14日(土)

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：小松 徹（東京大学）

09:30 ~ 10:30 A会場 (大会議室101)

[30A-01] アデニル酸キナーゼの OPEN および  
CLOSED 構造に対するモノボディによる複合体形  
成と機能評価

\*松尾 貴史<sup>1</sup>、中村 伊武輝<sup>1</sup>、雨坂 心人<sup>2</sup>、原 瑞穂<sup>2</sup>、岡  
本 恵祐<sup>2</sup>、米澤 健人<sup>1,3</sup>、廣田 俊<sup>1</sup>、上久保 裕生<sup>1,3</sup>、田  
中 俊一<sup>2</sup>（1. 奈良先端大・物質創成、2. 京都府立大  
院・生命環境、3. 奈良先端大・CDG）

09:30 ~ 09:50

[30A-02] 細胞内チオール環境を光制御する分子ツールの開  
発

\*松尾 和哉<sup>1</sup>、岡井 翔輝<sup>1</sup>、和久 友則<sup>1</sup>、小堀 哲生<sup>1</sup>（1.  
京都工芸繊維大学）

09:50 ~ 10:10

[30A-03] データ駆動型抗体設計に向けたハイスループット  
タンパク質間相互作用解析および熱安定性解析シ  
ステムの構築

\*松長 遼<sup>1</sup>、伊藤 沙衣<sup>1</sup>、氏家 寛<sup>1</sup>、稲垣 万優子<sup>1</sup>、F  
ernández Pérez Jorge<sup>1</sup>、安田 佳生<sup>1</sup>、中木戸 誠<sup>1</sup>、三  
桝 信哉<sup>2</sup>、曾我 真司<sup>2</sup>、河村 大輔<sup>3</sup>、加藤 洋人<sup>3</sup>、石川  
俊平<sup>3</sup>、津本 浩平<sup>1,4</sup>（1. 東京大学大学院工学系研究  
科、2. アステラス製薬株式会社、3. 東京大学医学  
部、4. 東京大学医科学研究所）

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：野中 洋（京都大学）

10:40 ~ 12:00 A会場 (大会議室101)

[30A-04] Oxidoreductase の 1 分子酵素活性計測に基づく  
疾患診断技術の開発

\*小松 徹<sup>1</sup>、箕田 麻弥乃<sup>1</sup>、水野 忠快<sup>1</sup>、浦野 泰照<sup>1,2</sup>  
（1. 東大院薬、2. 東大院医）

10:40 ~ 11:00

[30A-05] 自己集合性 YKペプチドタグを用いた Nck1 と N-  
WASP による液滴の細胞内構築と機能評価

\*三木 卓幸<sup>1,2</sup>、橋本 匡浩<sup>2</sup>、高橋 広樹<sup>2</sup>、三原 久和<sup>2</sup>  
（1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 東京工業大学生  
命理工学院）

11:00 ~ 11:20

[30A-06] ラパマイシンによる FRB- FKBP 融合タンパク質  
のオリゴマー化

\*伊野部 智由<sup>1</sup>、坂口 瑠菜<sup>1</sup>、帯田 孝之<sup>2</sup>、向山 厚<sup>3</sup>、小  
池 誠一<sup>1</sup>、横山 武司<sup>2</sup>、水口 峰之<sup>2</sup>、秋山 修志<sup>3,4</sup>（1.  
富山大学 学術研究部 工学系、2. 富山大学 学術研究部  
薬学・和漢系、3. 分子科学研究所 協奏分子システム研  
究センター、4. 総合研究大学院大学 物理科学領域）

11:20 ~ 11:40

[30A-07] タンパク質化学合成と TRAPディスプレイを駆使  
した鏡像モノボディの創成

\*林 剛介<sup>1</sup>、内藤 俊紀<sup>1</sup>、三浦 清楓<sup>1</sup>、岩本 直也<sup>2</sup>、薄井  
友輔<sup>2</sup>、野中 元裕<sup>3</sup>、大石 真也<sup>4</sup>、村上 裕<sup>1,5</sup>（1. 名古屋  
大学大学院工学研究科、2. 京都大学大学院薬学研究  
科、3. 京都大学大学院医学研究科、4. 京都薬科大  
学、5. 名古屋大学ナノライフシステム研究所）

11:40 ~ 12:00

B会場

一般口頭発表 | 核酸関連

核酸関連

座長：木村 康明（名古屋大学）

09:30 ~ 10:30 B会場 (大会議室102)

[30B-01] RNA複製エラーを引き起こす非ワトソニック  
リック型塩基対形成

\*高橋 俊太郎<sup>1,2</sup>、建石 寿枝<sup>1,2</sup>、杉本 直己<sup>1</sup>（1. 甲南大  
学FIBER、2. 甲南大学FIRST）

09:30 ~ 09:50

[30B-02] Transcriptional regulation of TERRA by G-  
quadruplex-binding protein of EWS

\*Luthfi Lulul Ulum<sup>1</sup>、Wakana Matsudaira<sup>2</sup>、Maiko  
Yamanashi<sup>2</sup>、Akinori Ishihara<sup>2</sup>、Takanori Oyoshi<sup>1,2,3</sup>  
（1. Graduate School of Science and Technology,  
Shizuoka University、2. Graduate School of  
Integrated Science and Technology, Shizuoka  
University、3. Research Institute of Green Science  
and Technology, Shizuoka University）

09:50 ~ 10:10

[30B-03] グアニン四重らせん構造によって誘起される液液  
相分離に対するエピジェネティック修飾の影響

\*鶴田 充生<sup>1</sup>、川内 敬子<sup>1</sup>、三好 大輔<sup>1</sup>（1. 甲南大F  
IRST）

10:10 ~ 10:30

一般口頭発表 | 核酸関連

核酸関連

座長：勝田 陽介（熊本大学）

10:40 ~ 12:00 B会場 (大会議室102)

## [3OB-04] 結合能・蛍光増大能を指標として選択した新規蛍光 RNA アプタマーの解析

\*田山 智嵩<sup>1</sup>、伊藤 敬佑<sup>1</sup>、上村 想太郎<sup>1</sup>、飯塚 怜<sup>1</sup> (1. 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻)

10:40 ~ 11:00

## [3OB-05] 非環状型人工核酸の導入による Gapmer型アンチセンス核酸の毒性軽減と機序解析

\*有吉 純平<sup>1</sup>、樋口 昌也<sup>2</sup>、大塚 彩乃<sup>1</sup>、奥野 未央佳<sup>1</sup>、谷川 望<sup>1</sup>、南川 綾香<sup>1</sup>、山岡 愛佳<sup>1</sup>、大山 浩之<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>2</sup>、神谷 由紀子<sup>1,2</sup> (1. 神戸薬大、2. 名大院工)

11:00 ~ 11:20

## [3OB-06] 擬似細胞システムを使った細胞内の四重らせん構造の解析

\*建石 寿枝<sup>1,2</sup>、高橋 俊太郎<sup>1,2</sup>、川内 敬子<sup>2</sup>、Chen Kun<sup>1</sup>、凌 一葦<sup>3</sup>、奥田 修二郎<sup>3</sup>、遠藤 玉樹<sup>1,2</sup>、杉本直己<sup>1</sup> (1. 甲南大学 先端生命工学研究所 (FIBER)、2. 甲南大学 フロンティアサイエンス研究科(FIRST)、3. 新潟大学医学部)

11:20 ~ 11:40

## [3OB-07] 哺乳動物初期胚への光による時空間特異的な RNA 導入

\*大槻 高史<sup>1</sup>、井川 優風<sup>1</sup>、若井 拓哉<sup>2</sup>、舟橋 弘晃<sup>2</sup>、渡邊 和則<sup>1</sup> (1. 岡山大学院統合科学、2. 岡山大学院環境生命)

11:40 ~ 12:00

## C会場

一般口頭発表 | 分子認識・超分子・モデル系

## 分子認識・超分子・モデル系

座長：多喜 正泰 (名古屋大学)

09:30 ~ 10:30 C会場 (中会議室202)

## [3OC-01] 金属が誘起する平行および逆平行型の最小βヘリックス二重鎖形成

\*遠藤 祐生<sup>1</sup>、吉沢 道人<sup>1</sup>、澤田 知久<sup>1,2</sup> (1. 東工大・化生研、2. JSTさきがけ)

09:30 ~ 09:50

## [3OC-02] オリゴプロリンを用いた分子ケージの構築とプロリン残基数に依存したケージ形成能の違い

\*井上 綸<sup>1</sup>、稲井 嘉人<sup>1</sup>、樋口 真弘<sup>1</sup>、松原 翔吾<sup>1</sup> (1. 名古屋工業大学大学院工学研究科)

09:50 ~ 10:10

## [3OC-03] タンパク質と相互作用ペプチドの探索のための OPOBライブラリーの構築とスクリーニングされたビーズ上のペプチド配列解析法

\*軒原 清史<sup>1</sup> (1. 株式会社ハイペップ研究所)

10:10 ~ 10:30

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：古谷 俊介 (産業技術総合研究所)

10:40 ~ 12:00 C会場 (中会議室202)

## [3OC-04] 水晶振動子質量センサー上での等温 PCR のリアルタイム検出

\*熊谷 英度<sup>1</sup>、古澤 宏幸<sup>1,2</sup> (1. 山形大学大学院有機材料システム研究科、2. 山形大学教育推進機構)

10:40 ~ 11:00

## [3OC-05] 凝集性制御に基づく加水分解酵素活性検出ラマンプローブの開発

\*河谷 稔<sup>1,2</sup>、沖中 桃子<sup>3</sup>、藤岡 礼任<sup>1</sup>、Spratt Spencer<sup>4</sup>、浦野 泰照<sup>3,5</sup>、小関 泰之<sup>4</sup>、神谷 真子<sup>1,6</sup> (1. 東京工業大学生命理工学院、2. JST ACT-X、3. 東京大学大学院薬学系研究科、4. 東京大学先端科学技術研究センター、5. 東京大学大学院医学系研究科、6. 東京工業大学自律システム材料学研究センター)

11:00 ~ 11:20

## [3OC-06] プラズモニクナノワイヤー単一細胞内視鏡法を用いた細胞核内における薬剤-DNA相互作用検出

\*猪瀬 朋子<sup>1,2,3</sup>、Ricci Monica<sup>4</sup>、FortuniBeatrice<sup>4</sup>、雲林院 宏<sup>4,5</sup> (1. 京都大学白眉セン

ター、2. 京都大学iCeMS、3. JSTさきがけ、4. ルーバン大学、5. 北海道大学電子科学研究所)

11:20 ~ 11:40

## [3OC-07] 生細胞1分子観察を通じた不均一な細胞膜分子運動の解析

\*吉村 英哲<sup>1</sup>、小澤 岳昌<sup>1</sup> (1. 東京大学)

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：小松 徹（東京大学）

2024年9月14日(土) 09:30 ~ 10:30 A会場 (大会議室101)

### [3OA-01] アデニル酸キナーゼの OPEN および CLOSED 構造に対するモノボディによる複合体形成と機能評価

\*松尾 貴史<sup>1</sup>、中村 伊武輝<sup>1</sup>、雨坂 心人<sup>2</sup>、原 瑞穂<sup>2</sup>、岡本 恵祐<sup>2</sup>、米澤 健人<sup>1,3</sup>、廣田 俊<sup>1</sup>、上久保 裕生<sup>1,3</sup>、田中 俊一<sup>2</sup>（1. 奈良先端大・物質創成、2. 京都府立大院・生命環境、3. 奈良先端大・CDG）

09:30 ~ 09:50

### [3OA-02] 細胞内チオール環境を光制御する分子ツールの開発

\*松尾 和哉<sup>1</sup>、岡井 翔輝<sup>1</sup>、和久 友則<sup>1</sup>、小堀 哲生<sup>1</sup>（1. 京都工芸繊維大学）

09:50 ~ 10:10

### [3OA-03] データ駆動型抗体設計に向けたハイスループットタンパク質間相互作用解析および熱安定性解析システムの構築

\*松長 遼<sup>1</sup>、伊藤 沙衣<sup>1</sup>、氏家 寛<sup>1</sup>、稲垣 万優子<sup>1</sup>、Fernández Pérez Jorge<sup>1</sup>、安田 佳生<sup>1</sup>、中木戸 誠<sup>1</sup>、三桟 信哉<sup>2</sup>、曾我 真司<sup>2</sup>、河村 大輔<sup>3</sup>、加藤 洋人<sup>3</sup>、石川 俊平<sup>3</sup>、津本 浩平<sup>1,4</sup>（1. 東京大学大学院工学系研究科、2. アステラス製薬株式会社、3. 東京大学医学部、4. 東京大学医科学研究所）

10:10 ~ 10:30

## アデニル酸キナーゼの OPEN および CLOSED 構造に対するモノボディによる複合体形成と機能評価

○松尾貴史<sup>1</sup>、中村伊武輝<sup>1</sup>、雨坂心人<sup>2</sup>、原瑞穂<sup>2</sup>、岡本恵祐<sup>2</sup>、米澤健人<sup>1,3</sup>、  
廣田俊<sup>1</sup>、上久保裕生<sup>1,3</sup>、田中俊一<sup>2</sup> (<sup>1</sup>奈良先端大・物質創成、<sup>2</sup>京都府立大院・  
生命環境、<sup>3</sup>奈良先端大・CDG)

**Construction of OPEN/CLOSED-form adenylate kinase-monobody complexes and investigation on their structures and functions** (Div. Mater. Sci. Nara Inst. Sci. Tech.<sup>1</sup>, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Pref.<sup>2</sup>, Center of Digital Green-innovation, Nara Inst. Sci. Tech.<sup>3</sup>) MATSUO, Takashi<sup>1</sup>; NAKAMURA, Ibuki<sup>1</sup>; AMESAKA, Hiroshi<sup>2</sup>; HARA, Mizuho<sup>2</sup>; OKAMOTO, Keisuke<sup>2</sup>; YONEZAWA, Kento<sup>1,3</sup>; HIROTA, Shun<sup>1</sup>; KAMIKUBO, Hironari<sup>1,3</sup>; TANAKA, Shun-ichi<sup>2</sup>

アデニル酸キナーゼ (Adk) は、OPEN/CLOSED の 2 つの構造変換を伴いながらリン酸基転移反応 ( $2 \text{ ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$ ) を触媒し、細胞のエネルギー恒常性維持に関与することから、創薬を指向した活性制御の標的ともなり得る酵素である<sup>1)</sup>。しかし、溶液中で大きな構造変化を起こすことから、活性制御のためには OPEN/CLOSED それぞれの構造状態をトラップする手法を確立する必要がある。我々は、これまでに、人工結合タンパク質の 1 つであるモノボディ (Mb) を基盤として、ファージディスプレイ法により、大腸菌由来 Adk の OPEN/CLOSED それぞれの状態を認識するモノボディを 4 種類 (CL-1: CLOSED 構造特異的、OP-2, -3, -4: OPEN 構造特異的) 得ている<sup>2)</sup>。そこで、本研究では、OPEN 構造を認識する Mb のうち、結合力が最も大きく Adk の酵素活性を阻害する OP-4 と、CLOSED 構造を認識する CL-1 について、複合体構造および Adk 機能に対する効果について検証した。

OP-4 との複合体構造をゲルろ過クロマトグラフィー/X 線小角散乱測定 (SEC-SAXS) によって観測したところ、OP-4 は、活性部位ではなく Adk の活性部位の外側のヒンジ部分を含む領域に結合し、Adk の OPEN 構造の特徴である V 字型構造は維持されていることが示唆された (図 1)。次に、<sup>31</sup>P-NMR スペクトルによる基質 ATP の結合挙動の評価を試みた。通常、Adk 存在下での ATP の <sup>31</sup>P-NMR シグナルは、ATP の Adk への結合に伴って広幅化する。この広幅化は、OP-4 存在下でも観測された。以上のことから、OP-4 は Adk の基質結合経路でなくヒンジ領域への結合によって、構造変化過程に摂動を与えて Adk 活性を阻害していると考えられる。

次に、Adk に対する遷移状態アナログである Ap<sub>5</sub>A の結合挙動を、Adk にピレンを 2 分子修飾した修飾 Adk を用いて評価した。この系では、Ap<sub>5</sub>A 結合に伴う CLOSED 構造の形成に伴い、ピレンが Adk 表面で接近しエキシマー蛍光が観測される。実験の結果、OP-4 存在下ではエキシマー蛍光が観測されなかった。このことは、CLOSED 構造が形成されていないことを意味しており上記の結果と一致する。一方、CL-1 存在下の Ap<sub>5</sub>A の解離定数は  $K_d = 0.035 \mu\text{M}$  であり、CL-1 非存在下での値 ( $K_d = 0.15 \mu\text{M}$ ) よりも小さかった。つまり、CL-1 は CLOSED 構造状態をより安定化させていることを示している。さらに、CL-1-Adk 複合体の X 線結晶構造解析により、CL-1 は Adk の LID ドメインの外側に結合していることがわかった。

以上より、Mb が、タンパク質間相互作用により Adk の活性をアロステリックに制御できるツールとして機能することが明らかとなった。

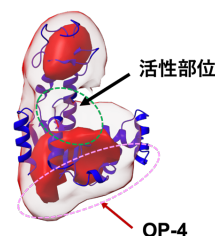


図 1. SEC-SAXS 測定結果を DENSS プログラムによって解析した OP-4-Adk 複合体の溶液構造

1) Klepinin, A.; Dzeja, P. *et al. Front. Oncol.* 10, 660 (2020).

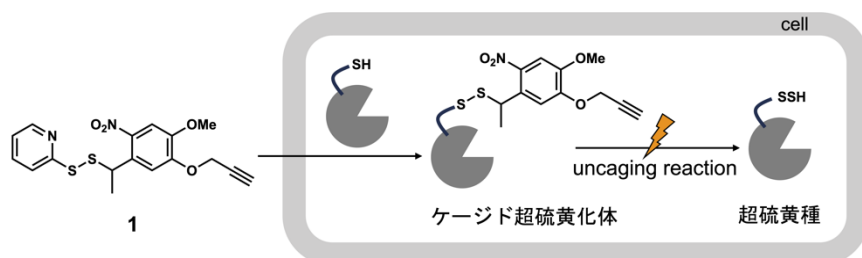
2) Nakamura, I.; Amesaka, H.; Kamikubo, H.; Tanaka, S.-I.; Matsuo, T. *et al. Protein Sci.* 32, e4813 (2023)

## 細胞内チオール環境を光制御する分子ツールの開発

○松尾和哉<sup>1</sup>・岡井翔輝<sup>1</sup>・和久友則<sup>1</sup>・小堀哲生<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京工繊大)Development of photoresponsive reagents for the control of thiol environments in cells (Kyoto Institute of Technology<sup>1</sup>) MATSUO, Kazuya<sup>1</sup>; OKAI, Shoki<sup>1</sup>; WAKU, Tomonori<sup>1</sup>; KOBORI, Akio<sup>1</sup>

近年の生体解析技術の進歩に伴い、細胞における多彩な硫黄 (S) の役割が明らかとなってきた。超硫黄種 ( $R-S_n-H$ ,  $n \geq 2$ ) は、サルフェン硫黄 ( $S^0$ ) を含む硫黄種のことであり、硫黄原子が直鎖上にカテナションした構造をとる。このような超硫黄種が哺乳類細胞内で生合成されていること<sup>(1)</sup>が報告されて以降、レドックス環境の制御や抗酸化機能、シグナル伝達など超硫黄種の多彩な機能が次々と明らかにされている。しかし、超硫黄種は求核性と求電子性を併せ持ち、化学的に極めて不安定であることから、その機能を制御・解析するためのツールの開発が急務の課題である。既存の超硫黄化法として、 $Na_2S_n$  などのポリスルフィドを細胞に投与する方法が挙げられるが、時空間制御能に欠ける点および様々な超硫黄種 ( $R-SSH$ ,  $R-SSSH$ ,  $R-SSS-R'$  など) が同時に発生する点などから、超硫黄種による複雑なシグナルが発生してしまう。これらの課題を克服するため、本研究では、細胞内のチオール種をケージド超硫黄化し、任意の時空間において、超硫黄種 (特に hydropersulfide;  $R-SSH$ ) を自在に発生させる分子ツールの開発を目指した。

光制御型超硫黄化ツールとして、チオール基特異的なバイオコンジュゲーションの反応基である 2-pyridyl sulfide と光分解性保護基である 2-nitrobenzyl 誘導体を連結した化合物 **1** を設計・合成した (Scheme 1)。**1** は、チオール基を有する還元型グルタチオン (GSH) と反応すると、ケージド超硫黄化体を与え、これに光照射することで速やかにアンケーシングされ、超硫黄種である  $GSSH$  を放出すると期待される。実際に、**1** の GSH との反応速度  $k_2$  を求めたところ、 $5.9 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$  程度と穏和な反応性でケージド超硫黄化体を形成し、それに 405 nm の光を照射すると、速やかなアンケーシング反応 ( $t_{1/2} = 0.72 \text{ min}$ ) が確認された。さらに、超硫黄種特異的な蛍光プローブである  $SSP4^{(2)}$  を用いて、光照射依存的に超硫黄種が発生することを確認した。また、精製タンパク質 BSA (bovine serum albumin) に対し、**1** を作用させたところ、BSA 中の Cys 34 に対し、ほぼ定量的にケージド超硫黄化でき、光照射によって超硫黄化体を得ることができた。以上から、**1** を用いた低分子およびタンパク質レベルでの超硫黄化に成功した。次に、細胞系での超硫黄化を検討した。**1** を HeLa 細胞に作用させた後、アルキン部位に蛍光団あるいはビオチン分子をクリック反応を介して導入し、SDS-PAGE 解析および質量分析によるプロテオミクス解析によって超硫黄化しているタンパク質を解析した結果、超硫黄化されるタンパク質が 600 種類程度同定された。本発表では、光に応答して細胞内でチオール環境を制御する分子ツールの詳細に関して報告し、議論する。

Scheme 1. Chemical strategy of caged supersulfidation with **1**.

## 【References】

- (1) T. Akaike, T. Ida, F. Y. Wei, *et al. Nat. Commun.* **2017**, 8, 1177.  
 (2) W. Chen, C. Liu, B. Peng, Y. Zhao, A. Pacheco, M. Xian, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 2892–2896.

## データ駆動型抗体設計に向けたハイスループットタンパク質間相互作用解析および熱安定性解析システムの構築

○松長遼<sup>1</sup>・伊藤沙衣<sup>1</sup>・氏家寛<sup>1</sup>・稲垣万優子<sup>1</sup>・Jorge Fernández Pérez<sup>1</sup>・  
安田佳生<sup>1</sup>・中木戸誠<sup>1</sup>・三桝信哉<sup>2</sup>・曾我真司<sup>2</sup>・河村大輔<sup>3</sup>・加藤洋人<sup>3</sup>・  
石川俊平<sup>3</sup>・津本浩平<sup>1,4</sup> (1 東大院工、2 アステラス製薬、3 東大医、4 東大医科研)

**High-throughput protein-protein interaction analysis and thermal stability analysis system for data-driven antibody design** (Sch. of Eng., Univ. of Tokyo<sup>1</sup>, Astellas Pharma Inc.<sup>2</sup>, Sch. of Med., Univ. of Tokyo<sup>3</sup>, Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo<sup>4</sup>) MATSUNAGA, Ryo<sup>1</sup>; ITO, Sae<sup>1</sup>; UJIIE, Kan<sup>1</sup>; INAGAKI, Mayuko<sup>1</sup>; Fernández Pérez, Jorge<sup>1</sup>; YASUDA, Yoshiki<sup>1</sup>; NAKAKIDO, Makoto<sup>1</sup>; MIMASU, Shinya<sup>1</sup>; SOGA, Shinji<sup>1</sup>; KOMURA, Daisuke<sup>1</sup>; KATO, Hiroto<sup>1</sup>; ISHIKAWA, Shumpei<sup>1</sup>; TSUMOTO, Kouhei<sup>1,4</sup>

従来の抗体開発では、抗体産生細胞の単離、配列解析、スクリーニングなど、煩雑な手順を踏む必要があり、リード候補の同定に多大な時間を要する。さらに、望ましい特性を有する抗体配列を効率的に見つけるためには、膨大な配列や構造の多様性を検証する必要があり、従来の実験技術では限界があった。特に、抗原認識、親和性、特異性などの特性評価は低スループットな実験のアッセイに依存し、配列空間の効率的な探索が困難だった。加えて、製造や治療応用に不可欠な物理化学的安定性や製剤安定性の評価には多大な実験的労力を要し、経験的な試行錯誤的なアプローチでは、これらの開発のボトルネックを解消することが困難だった。

本発表では我々が開発した、ハイスループットに抗体を発現し、抗原に対する親和性および熱安定性を測定できる系を紹介する。本系では、グラム陽性菌であるブレヴィバチルスを用いて 96 ウェルプレートで Fab 抗体の分泌発現を行い、遠心分離により得られた培地上清を用いて抗体の解析を行う。各ウェルの抗体遺伝子配列の効率的な解析のため、ナノポアシーケンサーによる 1152 サンプルの並列シーケンス解析手法を確立した。

これらの技術をもとに、培養上清に分泌された抗体をハイスループットに解析するシステムとして、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いたハイスループット相互作用解析系「BreviA」<sup>1)</sup>と、示差走査蛍光測定 (DSF) を用いたハイスループット熱安定性解析系「Brevity」<sup>2)</sup>を開発した。

BreviA では、硫安沈殿処理後にポリヒスチジンタグによりセンサーチップ上に抗体を特異的に固定化し、抗原溶液を添加することで、抗原-抗体間相互作用における結合速度定数 ( $k_{on}$ )、解離速度定数 ( $k_{off}$ )、解離平衡定数 ( $K_D$ ) を測定する。384 種類の相互作用を同時測定できるハイスループット SPR 装置を利用することで、数百クロンの抗体変異体の親和性を 1 回の測定で評価することができる。Brevity では、培地上清を 96 ウェルプレートで金属キレートアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) による精製後に、DSF 測定を行うことで、タンパク質の変性中点温度 ( $T_m$ ) をハイスループットに測定する。

これらのシステムを用いることで、従来では困難であった抗体の親和性・特異性・熱安定性のハイスループット評価が可能となり、データ駆動による抗体デザインを加速させることができる。本発表では本システムを用いた抗体設計の例を紹介する。

- 1) Matsunaga R, Ujiie K, Inagaki M, Fernández Pérez J, Yasuda Y, Mimasu S, Soga S, Tsumoto K. High-throughput analysis system of interaction kinetics for data-driven antibody design. *Sci Rep.* 2023 21;13(1):19417.
- 2) Ito S, Matsunaga R, Nakakido M, Komura D, Katoh H, Ishikawa S, Tsumoto K. High-throughput system for the thermostability analysis of proteins. *Protein Sci.* 2024;33(6):e5029.

---

一般口頭発表 | タンパク質・酵素

## タンパク質・酵素

座長：野中 洋（京都大学）

2024年9月14日(土) 10:40 ~ 12:00 A会場 (大会議室101)

---

### [3OA-04] Oxidoreductase の 1 分子酵素活性計測に基づく疾患診断技術の開発

\*小松 徹<sup>1</sup>、箕田 麻弥乃<sup>1</sup>、水野 忠快<sup>1</sup>、浦野 泰照<sup>1,2</sup>（1. 東大院薬、2. 東大院医）

10:40 ~ 11:00

### [3OA-05] 自己集合性 YKペプチドタグを用いた Nck1 と N-WASP による液滴の細胞内構築と機能評価

\*三木 卓幸<sup>1,2</sup>、橋本 匡浩<sup>2</sup>、高橋 広樹<sup>2</sup>、三原 久和<sup>2</sup>（1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 東京工業大学生命理工学院）

11:00 ~ 11:20

### [3OA-06] ラパマイシンによる FRB-FKBP 融合タンパク質のオリゴマー化

\*伊野部 智由<sup>1</sup>、坂口 瑠菜<sup>1</sup>、帯田 孝之<sup>2</sup>、向山 厚<sup>3</sup>、小池 誠一<sup>1</sup>、横山 武司<sup>2</sup>、水口 峰之<sup>2</sup>、秋山 修志<sup>3,4</sup>（1. 富山大学 学術研究部 工学系、2. 富山大学 学術研究部 薬学・和漢系、3. 分子科学研究所 協奏分子システム研究センター、4. 総合研究大学院大学 物理科学領域）

11:20 ~ 11:40

### [3OA-07] タンパク質化学合成と TRAPディスプレイを駆使した鏡像モノボディの創成

\*林 剛介<sup>1</sup>、内藤 俊紀<sup>1</sup>、三浦 清楓<sup>1</sup>、岩本 直也<sup>2</sup>、薄井 友輔<sup>2</sup>、野中 元裕<sup>3</sup>、大石 真也<sup>4</sup>、村上 裕<sup>1,5</sup>（1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 京都大学大学院薬学研究科、3. 京都大学大学院医学研究科、4. 京都薬科大学、5. 名古屋大学ナノライフシステム研究所）

11:40 ~ 12:00

## Oxidoreductase の1分子酵素活性計測に基づく 疾患診断技術の開発

○小松徹<sup>1</sup>・箕田麻弥乃<sup>1</sup>・水野忠快<sup>1</sup>・浦野泰照<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> 東大院薬、<sup>2</sup> 東大院医)

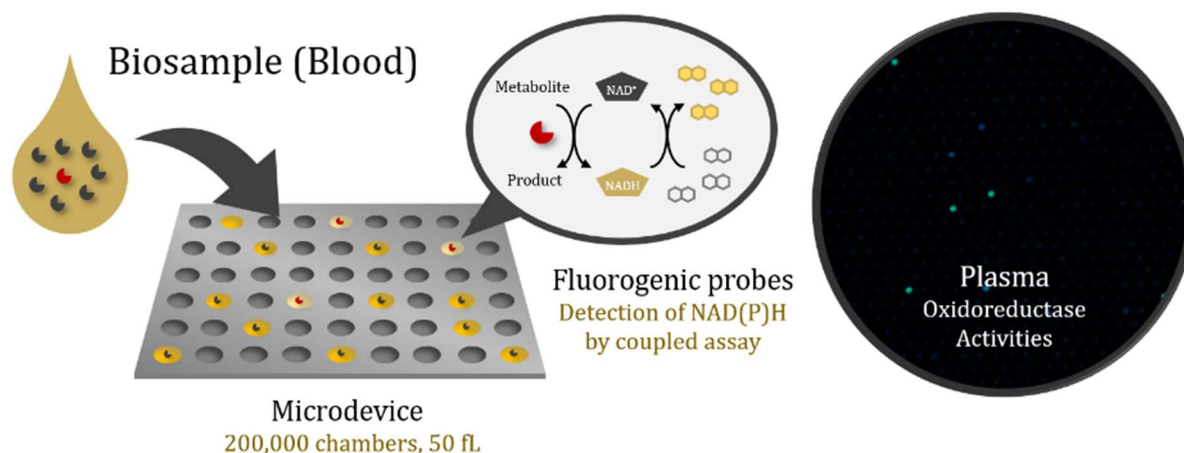
**Single-Molecule Oxidoreductase Activity Analysis: A Platform for Activity-Based Diagnosis based on Proteoform-Level Functional Alterations** (Grad. Sch. Pharm. Sci, Univ. Tokyo<sup>1</sup>, Grad. Sch. Med, Univ. Tokyo<sup>2</sup>)  
KOMATSU, Toru<sup>1</sup>; MINODA, Mayano<sup>1</sup>; MIZUNO, Tadahaya<sup>1</sup>; URANO, Yasuteru<sup>1,2</sup>

生体内には数千種類を超える酵素活性が存在し、これらの異常が疾患の成り立ちと関係している例が数多く知られており、疾患と関係する酵素活性の異常を検出することは疾患の診断やその成り立ちの理解に対する有用な知見を与えることが期待される。

これまでのタンパク質機能解析技術の多くは  $10^6$ - $10^9$  分子 (attomol-fmol) のタンパク質を集団として扱うものであったが、近年、生体サンプル中の酵素活性を1分子レベルで網羅的に解析する技術が開発され、血液中の酵素活性変化を高感度、高精度に検出することによる疾患診断の可能性が提唱されている<sup>1-4</sup>。

本技術は、数十 fL サイズの微小な反応容器が並列したマイクロデバイスに希釈した生体サンプルをロードすることで、確率的に0または1分子の標的酵素が反応容器に含まれる状態で酵素活性による蛍光性基質の代謝を検出することで1分子レベルの酵素活性計測をおこなう。個別の酵素分子に対して、酵素反応を検出することができる適切な蛍光性基質の開発が必要であることから、現在までに開発されている方法論の多くは glycosidase, phosphatase<sup>1</sup>, peptidase<sup>2,4</sup>, esterase<sup>3</sup> などの加水分解反応を標的としたものに限られ、基質の酸化還元を担う oxidoreductase に対する1分子酵素活性計測系は開発されていなかった。

本研究では、oxidoreductase が担う酵素反応の半数以上で補酵素として用いられる NAD(P)H に注目し、マイクロデバイスの反応容器内で NAD(P)H を選択的に検出する蛍光プローブを開発し、反応容器内の oxidoreductase による基質代謝によって副次的に生成する NAD(P)H を検出することにより1分子酵素活性を検出する系を開発した。これを用いて、90種類以上の代謝物を用いて血液中の oxidoreductase の1分子酵素活性計測を試み、血液中に存在する多様な oxidoreductase 活性の1分子計測をおこない、疾患と関わる活性変化を見出すことに成功した。



【参考文献】 1) S. Sakamoto et al. *Sci. Adv.* **2020**, 2) N. Nagano et al. *Chem. Sci.* **2023**, 3) T. Ukegawa et al. *Adv. Sci.* **2023**, 4) S. Sakamoto et al. *Cell Rep. Methods* **2024**

## 自己集合性 YK ペプチドタグを用いた Nck1 と N-WASP による液滴の細胞内構築と機能評価

○三木卓幸<sup>1, 2</sup>・橋本匡浩<sup>2</sup>・高橋広樹<sup>2</sup>・三原久和<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 東大院工、<sup>2</sup> 東工大生命)

**Intracellular construction and functional evaluation of droplets composed of Nck1 and N-WASP using self-assembling YK peptide tags** (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo<sup>1</sup>, School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology<sup>2</sup>) MIKI, Takayuki<sup>1, 2</sup>; HASHIMOTO, Masahiro<sup>2</sup>; TAKAHASHI, Hiroki<sup>2</sup>; MIHARA, Hisakazu<sup>2</sup>

細胞内でタンパク質や核酸が集積化して形成される液滴は、遺伝子発現制御・シグナル伝達・代謝反応などの様々な生理的イベントに関わる。物理的に脂質二重膜に閉ざされたオルガネラとは異なり、生体分子の集合・解離に伴って動的に構造が形成・崩壊する。また、アミロイド様の凝集体とも異なり、液滴は流動性をもち、更に構造体内外の生体分子の拡散および交換も早い。

しかし、相分離液滴の物理的性質とその生理的な役割を解析することは容易ではない。液滴形成や液滴の物性は溶媒環境（塩強度、pH、クラウディング環境、温度等）に大きく依存するため、試験管内で細胞本来の環境を模倣することは困難を極める。細胞内で人工的に物性の異なる液滴を作成し、その液滴の生理的機能を細胞内で評価する分子ツールが理想的である。

我々は、これまで細胞内で人工的に液滴を作製する「自己集合性 YK ペプチドタグ<sup>[1]</sup>」を開発してきた。YK ペプチドは疎水性のチロシン(Y)とカチオン性のリシン(K)を交互に繰り返したペプチドである。これまでの我々の検討で、YK ペプチドは細胞内に mM オーダーで存在するアデノシン三リン酸(ATP)と相互作用してアミロイド様な Thioflavin-T 陽性の集合体を形成することがわかっている。また、YK タグを緑色蛍光タンパク質(sfGFP)に融合し、細胞内で発現すると液滴が形成することを発見した。更に、液滴の流動性は YK 鎖長で調節でき、11、13、15 残基からなる YK11、YK13、YK15 ペプチドを融合すると徐々にその流動性が低下した。

本研究では、アクチン重合に関わる Nck1 と N-WASP タンパク質からなる多成分の液滴に着目し、その液滴の流動性とアクチン重合の関連を調べることにした。まず、Nck1 に異なる鎖長の YK タグを融合させ、YK タグのない N-WASP と共発現した。その結果、YK9、YK11、YK13 を Nck1 に融合した場合において、N-WASP と共集合した sub $\mu$ m スケールの液滴が形成された。また、FRAP 解析を行ったところ、鎖長依存的に Nck1 の流動性が低下したことが確認できた。一方で、Nck1 に融合した YK タグの鎖長によらず、YK タグ融合のない N-WASP は 1 sec 程度で速やかに蛍光回復が見られた。そこで、N-WASP にも YK タグを融合し YK9 融合 Nck1 と共に発現した。その結果、液滴のサイズが増加し、N-WASP の流動性も大きく低下した。次に、重合アクチンに結合する蛍光標識 phalloidin を用いて、重合アクチン量を評価したところ、N-WASP の流動性が著しく低下した条件(YK9 融合 Nck1 と YK9/YK11 融合 N-WASP の共発現)において、極端に重合アクチン量が増加したことが判明した。N-WASP の流動性がアクチン重合に大きく影響を与えることを示唆する結果となった。

### [参考文献]

- 1) T. Miki, M. Hashimoto, H. Takahashi, M. Shimizu, S. Nakayama, T. Furuta & H. Mihara, *ChemRxiv* (2024)  
DOI: 10.26434/chemrxiv-2024-gmrj6

## ラパマイシンによる FRB-FKBP 融合タンパク質のオリゴマー化

○伊野部智由<sup>1</sup>・坂口瑠菜<sup>1</sup>・帯田孝之<sup>2</sup>・向山厚<sup>3,4</sup>・小池誠一<sup>1</sup>・横山武司<sup>2</sup>・水口峰之<sup>2</sup>・秋山修志<sup>3,4</sup> (<sup>1</sup>富山大工、<sup>2</sup>富山大薬、<sup>3</sup>分子研協奏分子、<sup>4</sup>総研大物理)

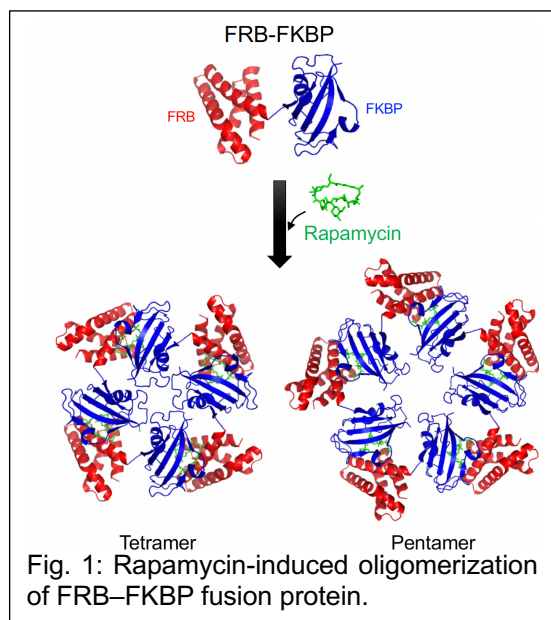
**Rapamycin-induced oligomerization of FRB-FKBP fusion protein** (Grad. Sch. Sci. Eng., Univ. Toyama<sup>1</sup> Fac. Pharm. Sci., Univ. Toyama<sup>2</sup>, CIMoS, Inst. Mol. Sci., NINS<sup>3</sup>, Mol. Sci. Prog., Grad. Inst. Adv. Stud., SOKENDAI<sup>4</sup>)  
INOBE Tomonao<sup>1</sup>; SAKAGUCHI Runa<sup>1</sup>; OBITA Takayuki<sup>2</sup>, MUKAIYAMA Atushi<sup>3, 4</sup>; KOIKE Seiichi<sup>1</sup>; YOKOYAMA Takeshi<sup>2</sup>; MIZUGUCHI Mineyuki<sup>2</sup>; AKIYAMA Shuji<sup>3,4</sup>

多くのタンパク質は複合体を形成することにより、様々な生命現象に関わっている。そのため、タンパク質の多量体形成を人工的に制御することで、生体機能を制御することが可能である。これまでに、小分子ラパマイシン依存的な FRB と FKBP の二量体化システムなどの誘導型二量体形成システムが確立されており、細胞機能を操作できるケミカルバイオロジーツールとして広く用いられている。しかし、多くの細胞内タンパク質は二量体以上のオリゴマーを形成して、その機能を発揮する。我々は、FRB と FKBP を融合した二価融合タンパク質を構築し、それら融合タンパク質がラパマイシンにより大きなオリゴマーを形成することを見出した<sup>1</sup>。さらに、それらのオリゴマー構造を解明し、細胞機能の制御に応用できたので、ここに報告する。

我々は、二量体以上の大きな多量体形成システムの開発を目指し、FRB と FKBP を融合して二価性を持たせたタンパク質を構築した。FRB ドメインと FKBP ドメインの相対位置を調整することにより創出した FRB-FKBP 融合タンパク質は、ラパマイシン依存的に四量体ほどの多量体を形成する。この FRB-FKBP 融合タンパク質多量体の立体構造解析を行った。結晶構造解析の結果、FRB-FKBP 融合タンパク質はラパマイシンを介して三量体を形成していた。この結晶構造の正確性を検証するために、X 線溶液小角散乱や化学架橋法を用いて FRB-FKBP 融合タンパク質の溶液中での多量体構造を解析した。その結果、FRB-FKBP 融合タンパク質多量体の結晶構造と溶液構造には違いがあり、溶液中で結晶構造より大きな四～五量体を形成していた (図 1)。しかし、溶液中の四～五量体においても、結晶構造で見出された三量体としてのサブユニット間配置を基本的に維持していた。このような FRB-FKBP のオリゴマー構造の形成は、細胞内でも観察された。

目的タンパク質を FRB-FKBP と融合することにより、目的タンパク質の多量体化を制御でき、細胞内での機能制御が可能になる。我々は、ガン抑制タンパク質 p53 の C 末端四量体化ドメインを FRB-FKBP に置き換えた融合タンパク質 (p53N-FRB-FKBP) を構築した。この p53N-FRB-FKBP は、細胞内においてもラパマイシン依存的に多量体化し、p53 様の腫瘍抑制転写活性を示した<sup>2</sup>。以上より、FRB-FKBP システムは、オリゴマータンパク質が関与する多くの細胞機能を制御するためのユニークで有用なツールになると期待される。

1. T. Inobe & N. Nukina, *J Biosci Bioeng* 122, 40–6 (2016)
2. T. Inobe, M. Nozaki, & N. Nukina, *Biochem Biophys Res Commun* 467, 322–7 (2015)



## タンパク質化学合成と TRAP ディスプレイを駆使した鏡像モノボ ディの創成

○林剛介<sup>1</sup>・内藤俊紀<sup>1</sup>・三浦清楓<sup>1</sup>・岩本直也<sup>2</sup>・薄井友輔<sup>2</sup>・野中元裕<sup>3</sup>・大石真也<sup>4</sup>・村上裕<sup>1,5</sup> (<sup>1</sup>名大院工、<sup>2</sup>京大院薬、<sup>3</sup>京大院医、<sup>4</sup>京薬大、<sup>5</sup>名大ナノライフ研)

**Development of Mirror Image Monobody via Chemical Protein Synthesis and TRAP Display** (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.<sup>1</sup>, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ.<sup>2</sup>, Graduate School of Medicine, Kyoto Univ.<sup>2</sup>, Kyoto Pharmaceutical Univ.<sup>4</sup>, Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya Univ.<sup>4</sup>)  
HAYASHI Gosuke<sup>1</sup>; NAITO Toshinori<sup>1</sup>; MIURA Sayaka<sup>1</sup>; IWAMOTO Naoya<sup>2</sup>; USUI Yusuke<sup>2</sup>; NONAKA Motohiro<sup>3</sup>; OISHI Shinya<sup>4</sup>; MURAKAMI Hiroshi<sup>1,5</sup>

D 体アミノ酸から構成される鏡像タンパク質は、プロテアーゼなど天然のタンパク質群に認識されにくく、生体環境での安定性が高いため、免疫原性も低く抑えられる。そのため、標的分子に選択的かつ高親和性で結合する「鏡像タンパク質抗体」は、新たな医薬品候補分子として期待されている。鏡像タンパク質抗体を取得する方法として、Peter Kim らは 1996 年にミラーイメージファージディスプレイ法<sup>1</sup>の概念を提唱・実証した。この方法ではまず、標的タンパク質の鏡像異性体 (D 体) を化学合成で作製し、この鏡像タンパク質に結合するペプチド・タンパク質 (L 体) をファージディスプレイなどの *in vitro* セレクション法により取得する。次に、取得したペプチド・タンパク質の鏡像異性体を D 体アミノ酸を用いて化学合成して作製することで、標的タンパク質 (L 体) に結合する「鏡像ペプチド・タンパク質抗体 (D 体)」を得る。これまでに 10 種類以上の標的タンパク質に対して鏡像ペプチド・タンパク質抗体が取得されてきたが、標的に対する結合能が低く (多くは解離定数が  $\mu\text{M}$  オーダー、強いものでも 2 桁 nM 程度)、医薬品として使用するには不十分であった。

そこで我々は、1) 抗体となるタンパク質抗体の骨格にモノボディを使用する、2) *in vitro* セレクション法にライブラリサイズの大きい「TRAP ディスプレイ法」を使用する、という工夫を施すことで結合能の高い鏡像タンパク質抗体の取得を目指した。「TRAP ディスプレイ法」は、mRNA ディスプレイ法を改良した方法であり、我々のグループでは  $10^{13}$  程度の多様性を持つライブラリから多様な標的タンパク質に対して nM 前後の解離定数で結合するモノボディ配列を複数取得した実績がある<sup>2</sup>。本発表では、慢性炎症などに関わる MCP-1 を標的タンパク質とした「鏡像モノボディ」の取得および解析結果について述べる。まず、ペプチド固相合成と Native Chemical Ligation<sup>3</sup>によるタンパク質化学合成法によって作製した鏡像 MCP-1 に結合するモノボディクローンを TRAP ディスプレイによる取得を試みたところ、解離定数が 300 nM 程度のクローンが取得された。得られたクローンの親和性を向上させるために、モノボディの結合ループ領域に飽和変異を導入したライブラリを作製し、親和性成熟を行うことでクローンの結合能を 1 nM 程度に引き上げることに成功した。同様の配列をもつ鏡像モノボディをタンパク質化学合成により作製し、その機能を評価したところ、A) MCP-1 (L 体) に一桁 nM の解離定数で結合すること、B) プロテアーゼ耐性を持ち免疫原性が極めて低いこと、C) MCP-1 とそのレセプターである CCR2 との相互作用を阻害すること、が明らかとなった。

- 1) P.S Kim, *et al. Science*, **271**, 5257 (1996)
- 2) T. Kondo, *et al. Sci. Adv.*, **6**, eabd3916 (2020)
- 3) P.E. Dawson, *et al. Science*, **266**, 5186 (1994)

---

一般口頭発表 | 核酸関連

## 核酸関連

座長：木村 康明（名古屋大学）

2024年9月14日(土) 09:30 ～ 10:30 B会場 (大会議室102)

---

### [3OB-01] RNA複製エラーを引き起こす非ワトソン-クリック型塩基対形成

\*高橋 俊太郎<sup>1,2</sup>、建石 寿枝<sup>1,2</sup>、杉本 直己<sup>1</sup>（1. 甲南大学FIBER、2. 甲南大学FIRST）

09:30 ～ 09:50

### [3OB-02] Transcriptional regulation of TERRA by G-quadruplex-binding protein of EWS

\*Luthfi Lulul Ulum<sup>1</sup>, Wakana Matsudaira<sup>2</sup>, Maiko Yamanashi<sup>2</sup>, Akinori Ishihara<sup>2</sup>, Takanori Oyoshi<sup>1,2,3</sup>（1. Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, 2. Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, 3. Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University）

09:50 ～ 10:10

### [3OB-03] グアニン四重らせん構造によって誘起される液液相分離に対するエピジェネティック修飾の影響

\*鶴田 充生<sup>1</sup>、川内 敬子<sup>1</sup>、三好 大輔<sup>1</sup>（1. 甲南大FIRST）

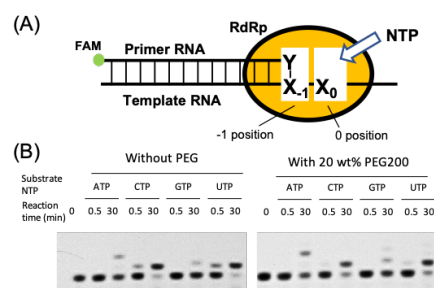
10:10 ～ 10:30

## RNA 複製エラーを引き起こす非ワトソン-クリック型塩基対形成

○高橋俊太郎<sup>1,2</sup>・建石寿枝<sup>1,2</sup>・杉本直己<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 甲南大 FIRST、<sup>2</sup> 甲南大 FIBER)Formation of non-Watson-Crick base pairing causing RNA replication errors (Konan Univ., FIRST<sup>1</sup>, Konan Univ., FIBER<sup>2</sup>) TAKAHASHI, Shuntaro<sup>1,2</sup>; TATEISHI-KARIMATA, Hisae<sup>1,2</sup>; SUGIMOTO, Naoki<sup>2</sup>

ゲノム変異は、遺伝子の複製時にワトソン-クリック (WC) 型塩基対のルールから逸脱した時、すなわち非 WC 塩基対として複製されたときに生じる。このような変異は複製時にランダムに起こると考えられてきたが、近年、化学物質に影響を受けた細胞内環境によって変異のパターンに偏りが生じることが示されはじめています。そのため、複製途中で形成される非 WC 型塩基対の安定性を定量的に解析し、複製エラーの分子機構を明らかにすることで、生じる遺伝子変異を配列から予測できるエネルギーパラメータの必要性が高まっている。我々は最近、T7 RNA ポリメラーゼによる RNA 複製において分子クラウディング環境によって複製のエラーが誘発されることを報告した(1,2)。WC 型塩基対の安定性は個々の最近接塩基対と分子クラウディング等の溶液環境によって影響を受ける(3)。そのため、ゲノム複製時に生じる変異も、鋳型の配列と溶液環境に関連していると考えられる。

そこで本研究では、複製酵素として SARS-CoV-2 の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを用い、蛍光標識したプライマーからの 1 塩基伸長反応を検討した (図 1A)。反応後 30 分における基質のヌクレオチド三リン酸 (NTP) の誤取り込みを解析したところ (図 1B: 例として C と A を X<sub>-1</sub>、X<sub>0</sub> 塩基とした鋳型を示す)、複製エラーの明らかな傾向として、同じプリンまたはピリミジン部位を持つ NTP の取り込み (例えば、A を 0 位に持つ鋳型に CTP が取り込まれる) が最も多く観察された。実際 SARS-CoV-2 で発生している過去の変異からもその傾向が認められた。一方、NTP 取り込みサイト直前の最近接塩基対の組成を系統的に変化させたところ、誤取り込みの効率が大きく変化した。さらに、ポリエチレングリコール 200 を用いた分子クラウディング環境では、正しい NTP 取り込み効率と比較して、誤取り込みが増加する傾向にあった (図 1B)。これらの結果から、水和や誘電率の変化によって、塩基配列依存的に安定化された非 WC 型塩基対の形成によってゲノム変異が生じることが示唆された。本発表ではリボザイム型 RNA ポリメラーゼについて検討した内容についても合わせて報告する。



**Figure 1.** (A) Schematic illustration of primer extension by SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase. (B) PAGE result of the replication using template having C and A as X<sub>-1</sub> and X<sub>+1</sub> bases in the absence and presence of 20wt% PEG200. Y is a complementary base to X<sub>-1</sub>. The cognate NTP is UTP in this case. The reaction was carried out with 2  $\mu$ M RNAs, 2  $\mu$ M RdRp, 2.5 mM NTPs, in Tris-HCl pH7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 15 mM KCl at 37 °C.

## 【参考文献】

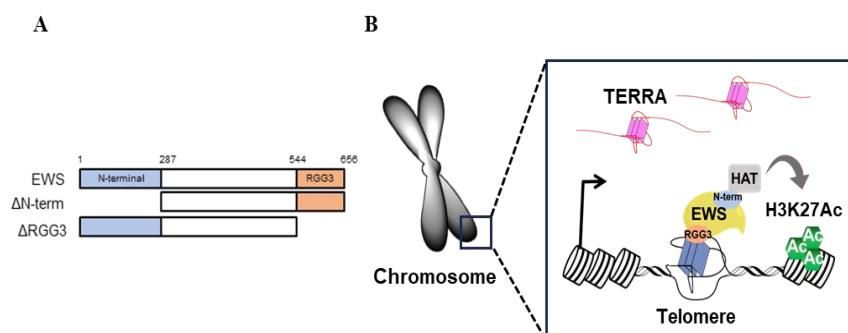
- 1) S. Takahashi, H. Okura, P. Chilika, S. Ghosh, and N. Sugimoto, *RSC Adv.*, **10**, 33052 (2020).
- 2) S. Takahashi, S. Matsumoto, P. Chilka, S. Ghosh, H. Okura, and N. Sugimoto, *Sci. Rep.*, **12**, 1149 (2021).
- 3) S. Ghosh, S. Takahashi, D. Banerjee, T. Ohyama, T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 4101 (2023).

### Transcriptional regulation of TERRA by G-quadruplex-binding protein of EWS

(Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University<sup>1</sup>, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University<sup>2</sup>, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University<sup>3</sup>) Luthfi Lulul Ulum<sup>1</sup>; MATSUDAIRA, Wakana<sup>2</sup>; YAMANSAHI, Maiko<sup>2</sup>; ISHIHARA, Akinori<sup>2</sup>; OYOSHI, Takanori<sup>1,2,3</sup>.

Telomeres are found at the ends of chromosomes, and telomere length correlates with cancer development. Telomeres are extended by telomerase and the alternative lengthening of telomeres pathway in cancer cells.<sup>1</sup> Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) is transcribed from telomeres and affects both modes of telomere extension. Telomere DNA and TERRA form the G-quadruplex (G4).<sup>2</sup> The correlation between these noncanonical nucleic acid structures and the transcriptional regulation of TERRA is unclear. The purpose of this study is to elucidate the G4-binding protein of EWS on the TERRA transcription in the telomere region.

We previously reported that EWS binds G4 DNA and RNA through the Arg–Gly–Gly (RGG) domain at the C-terminal region, namely RGG3, of EWS. We found that EWS binds G4 structures of telomere DNA and TERRA with  $K_d$  values of  $34 \pm 5$  nM and  $35 \pm 4$  nM, respectively and competitively binding *in vitro*. We evaluated whether EWS interact with the telomere through the RGG3 domain *in vivo* by DNA CHIP assay using EWS and EWS mutants ( $\Delta$ N-term and  $\Delta$ RGG3, **Fig. 1A**)-overexpressed in HeLa cells. These results showed that EWS and  $\Delta$ N-term bound to telomere, but  $\Delta$ RGG3 did not bind. These findings revealed that the binding of EWS to telomeres depends on the RGG3 domain. We identified the function of the N-terminal region of EWS to alter histone modification in the telomere region. The results showed that H3K27Ac histone modification significantly increased at the telomeres in cells overexpressing EWS, but not  $\Delta$ N-term or  $\Delta$ RGG3. These findings suggest that EWS recruits HATs to modify H3K27 acetylation through its N-terminal domain. Previous studies have shown that euchromatin activates TERRA transcription. To investigate the role of EWS in regulating TERRA transcription, we used RT-qPCR to quantify the amount of TERRA in the overexpression of EWS or EWS mutants. EWS promoted TERRA transcription; however, an  $\Delta$ N-term or  $\Delta$ RGG3 did not. These indicated that the G4-binding protein, EWS, promotes the transcription of TERRA via H3K27Ac acceleration. This study showed that EWS binds to G4 through the RGG3 domain in telomeres and promotes H3K27 acetylation, which is mediated by HAT binding through the N-terminal region (**Fig. 1B**).



**Figure 1.** (A) Schematic illustration of EWS and EWS mutants ( $\Delta$ N-term and  $\Delta$ RGG3). (B) Model of the proposed role of EWS for TERRA transcription in the telomere region.

1. J. Zhang and L. Zou. Cell Biosci. 10, 30, 1-9 (2020).
2. D. Varshney, *et. al.* Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 21, 8, 459-474 (2020).

## グアニン四重らせん構造によって誘起される液液相分離に対するエピジェネティック修飾の影響

○鶴田充生・川内敬子・三好大輔（甲南大 FIRST）

**Effect of epigenetic modification on liquid-liquid phase separation induced by g-quadruplex** (Faculty of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University) TSURUTA, Mitsuki; KAWAUCHI, Keiko; MIYOSHI, Daisuke

細胞内で誘起される生体分子の液液相分離現象（Liquid-liquid phase separation: LLPS）は、生体高分子間の多点で弱い相互作用により誘起される[1]。LLPS を介して形成される液滴は、転写や RNA スプライシング、翻訳などの遺伝子発現の各プロセスを制御することで、細胞内反応を制御している。代表的な液滴である核小体やストレス顆粒内には、核酸の非標準的な二次構造であるグアニン四重らせん構造（G-quadruplex: G4）が豊富に存在している。さらに、G4 によって誘起される異常な LLPS は、筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic lateral sclerosis: ALS）や前頭側頭型認知症（Front temporal dementia: FTD）の発症原因となることも知られている。ALS と FTD では、*C9orf72* に存在する反復拡張された GGGGCC 配列が G4 を形成し、周囲のタンパク質と相互作用することで LLPS を誘起する。このような LLPS における G4 の重要性から、我々は、G4 の LLPS を試験管内で再現できるモデルシステムを開発した[2]。このモデルシステムでは、G4 とタンパク質のカチオン性の天然変性領域を由来とするペプチドを混合することで LLPS が誘起される。

タンパク質の LLPS は、タンパク質の化学修飾であるメチル化やリン酸化、アセチル化によって促進・抑制されることが知られている。一方で核酸の LLPS に対する化学修飾（エピジェネティック修飾）の影響はほとんど報告例がない。興味深いことに、反復拡張された GGGGCC DNA 配列は、高頻度にシトシンのメチル化修飾（Cytosine methylation: mC）を受けることも知られている[3]。そのため mC によって GGGGCC の LLPS も変化すると考えられる。そこで本研究では、系統的に mC の導入数を変化させた GGGGCC DNA を使用して、mC による LLPS への影響を検討した。各 DNA の LLPS の誘起しやすさは、モデルシステムを利用して評価した。その結果、mC は GGGGCC の LLPS を抑制することが示された（Fig. 1）。GGGGCC が形成する二次構造に対する mC の影響は、UV 融解曲線と円偏光二色性スペクトルを得ることで評価した。それらの測定の結果、mC は GGGGCC が形成する G4 のトポロジーを変化させることが示された。これらのことから、mC は G4 のトポロジーを変化させることで、GGGGCC の LLPS を抑制したことが明らかとなった。

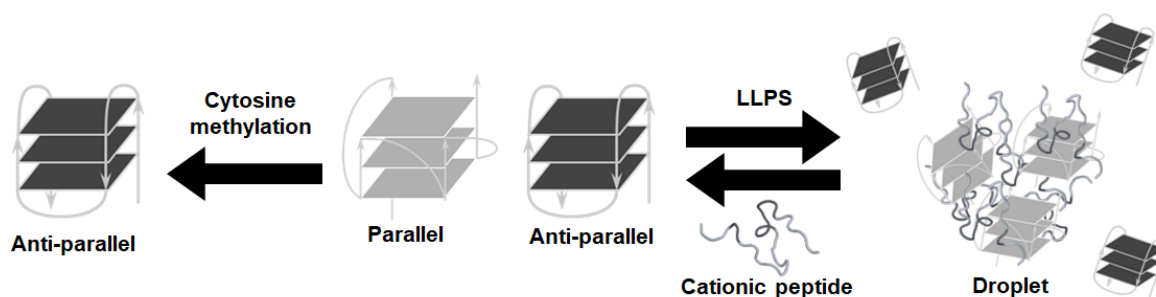


Fig. 1 LLPS of G4 DNA w/ or w/ cytosine methylation.

### Reference

- [1] K. Kohata and D. Miyoshi, *Biophys. Rev.* **2020**, *12*, 669. [2] M. Tsuruta *et al.*, *Chem, Commun.* **2022**, *58*, 12931. [3] J. Wang *et al.*, *elife* **2014**, *3*, e04591.

---

一般口頭発表 | 核酸関連

## 核酸関連

座長：勝田 陽介（熊本大学）

2024年9月14日(土) 10:40 ~ 12:00 B会場 (大会議室102)

---

### [3OB-04] 結合能・蛍光増大能を指標として選択した新規蛍光 RNAアプタマーの解析

\*田山 智嵩<sup>1</sup>、伊藤 敬佑<sup>1</sup>、上村 想太郎<sup>1</sup>、飯塚 怜<sup>1</sup>（1. 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻）

10:40 ~ 11:00

### [3OB-05] 非環状型人工核酸の導入による Gapmer型アンチセンス核酸の毒性軽減と機序解析

\*有吉 純平<sup>1</sup>、樋口 昌也<sup>2</sup>、大塚 彩乃<sup>1</sup>、奥野 未央佳<sup>1</sup>、谷川 望<sup>1</sup>、南川 綾香<sup>1</sup>、山岡 愛佳<sup>1</sup>、大山 浩之<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>2</sup>、神谷 由紀子<sup>1,2</sup>（1. 神戸薬大、2. 名大院工）

11:00 ~ 11:20

### [3OB-06] 擬似細胞システムを使った細胞内の四重らせん構造の解析

\*建石 寿枝<sup>1,2</sup>、高橋 俊太郎<sup>1,2</sup>、川内 敬子<sup>2</sup>、Chen Kun<sup>1</sup>、凌 一葦<sup>3</sup>、奥田 修二郎<sup>3</sup>、遠藤 玉樹<sup>1,2</sup>、杉本 直己<sup>1</sup>（1. 甲南大学 先端生命工学研究所（FIBER）、2. 甲南大学 フロンティアサイエンス研究科（FIRST）、3. 新潟大学医学部）

11:20 ~ 11:40

### [3OB-07] 哺乳動物初期胚への光による時空間特異的な RNA導入

\*大槻 高史<sup>1</sup>、井川 優風<sup>1</sup>、若井 拓哉<sup>2</sup>、舟橋 弘晃<sup>2</sup>、渡邊 和則<sup>1</sup>（1. 岡山大学院統合科学、2. 岡山大学院環境生命）

11:40 ~ 12:00

## 結合能・蛍光増大能を指標として選択した新規蛍光 RNA アプタマーの解析

○田山 智嵩<sup>1</sup>, 伊藤 敬佑<sup>1</sup>, 上村 想太郎<sup>1</sup>, 飯塚 怜<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻)

**Analysis of novel fluorogenic RNA aptamers selected based on their binding affinity and fluorescence enhancement** (Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., The Univ. Tokyo<sup>1</sup>) Tomotaka Tayama<sup>1</sup>, Keisuke Ito<sup>1</sup>, Sotaro Uemura<sup>1</sup>, and Ryo Iizuka<sup>1</sup>

蛍光 RNA アプタマーは、遊離状態ではほぼ無蛍光の色素と結合し、その蛍光を劇的に増大させる RNA であり、ライブセル RNA イメージングなどに利用されている。しかしバックグラウンドとの識別などの課題も多く、従来報告されている蛍光 RNA アプタマーより高い蛍光増大能を示す蛍光 RNA アプタマーの開発が望まれている。

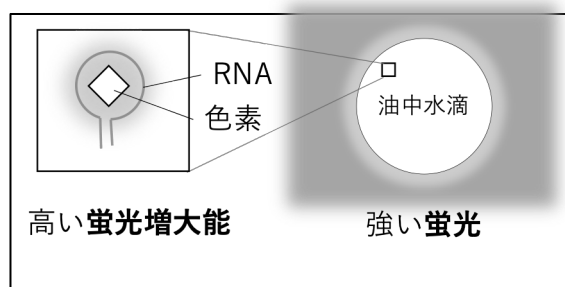


図 蛍光増大能を指標とした選別

我々は標的色素との結合親和性に基づく選別法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX) 法) と油中水滴を用いた蛍光増大能に基づく選別法 (図) を組み合わせ、高い蛍光増大能を持つ多様な蛍光 RNA アプタマーを取得する実験系を確立し、新規アプタマーを複数取得している。本研究では、蛍光増大能を高めるために必要な特徴を明らかにするため、これらのアプタマーに対する解析を行った。

アプタマーの選別においては、まず Mango I の構造を参考にし、9 nt のステムに挟まれた 23 nt のランダム領域を持つライブラリ DNA を用意した。このライブラリを転写し、色素 TO1-B をリガンドとした SELEX 法を 8 ラウンド行った。5 ラウンド後と 8 ラウンド後の産物 (以後 R5、R8 と表記) を新たなライブラリとして蛍光増大能に基づく選別を行った。R5 あるいは R8 の DNA を TO1-B とともに油中水滴に封入し、その内部で RNA を転写した。その後、蛍光の強い油中水滴を回収し、内包される DNA を得た。得られた DNA の配列を決定するとともに、その転写産物と TO1-B を混合して蛍光スペクトルを測定し、蛍光増大能を示すアプタマーを特定した。さらに、イオン要求性についての解析や、AlphaFold3 を用いた構造予測を行った。

解析の結果、高い蛍光増大能を示すアプタマーはいずれもグアニンリッチであり、その増大能はカリウムイオンの存在に依存することが分かった。これらの結果から、グアニン四重鎖構造が蛍光増大に重要であることが強く示唆された。さらに構造予測からも、多くのアプタマーがグアニン四重鎖構造を形成することが支持された。現在、得られたアプタマーがどのように色素と結合しているのかを明らかにすべく、アプタマー-色素複合体の立体構造解析を進めている。また、アプタマーとしての性質をより詳細に調べるため、結合定数の測定なども行っている。これらの解析結果をもとに、より高い蛍光増大能を示す蛍光 RNA アプタマーの設計を目指す。

## 非環状型人工核酸の導入による Gapmer 型アンチセンス核酸の 毒性軽減と機序解析

○有吉純平<sup>1</sup>・樋口昌也<sup>2</sup>・大塚彩乃<sup>1</sup>・奥野未央佳<sup>1</sup>・谷川望<sup>1</sup>・南川綾香<sup>1</sup>・  
山岡愛佳<sup>1</sup>・大山浩之<sup>1</sup>・浅沼浩之<sup>2</sup>・神谷由紀子<sup>1,2</sup> (神戸薬大<sup>1</sup>・名大院工<sup>2</sup>)

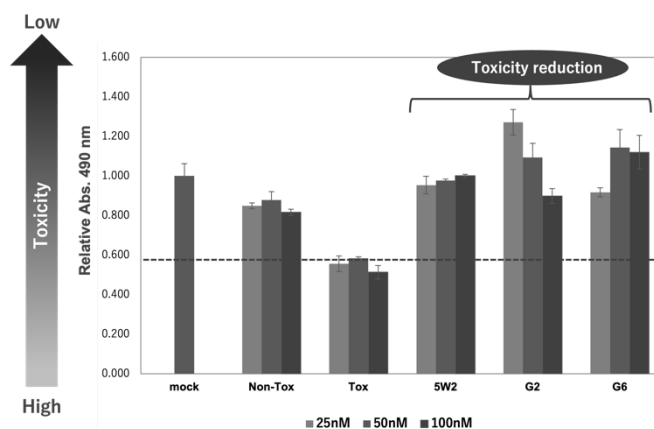
**Reducing Toxicity in Gapmer Antisense Oligonucleotides Using Acyclic Nucleic Acid Substitution.** (Kobe Pharmaceutical University<sup>1</sup>, Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>2</sup>), Jumpei Ariyoshi<sup>1</sup>, Masaya Higuchi<sup>2</sup>, Ayano Otsuka<sup>1</sup>, Mioka Okuno<sup>1</sup>, Nozomi Tanigawa<sup>1</sup>, Ayaka Minamikawa<sup>1</sup>, Manaka Yamaoka<sup>1</sup>, Hiroyuki Oyama<sup>1</sup>, Hiroyuki Asanuma<sup>2</sup>, Yukiko Kamiya<sup>1,2</sup>

核酸医薬品の一種であるギャップマー型アンチセンス核酸 (Gapmer-ASOs) は、次世代の医薬品として実用化が期待されているが、化学修飾に起因した細胞毒性の懸念が浮上している。特に、ホスホロチオエート (PS) とリボース型の人工核酸修飾は細胞毒性の一因とされており、毒性の低い Gapmer-ASO の設計が求められている。そこで本研究は、非環状型人工核酸である Serinol Nucleic Acid (SNA)<sup>1</sup> や L-Threoninol nucleic acid (L-*a*TNA)<sup>2</sup> を用いることによって、Gapmer-ASO の細胞毒性を軽減する新しい設計に取り組んだ。我々は以前、Gap 領域の 5'末端から 2 番目の位置 (G2) に SNA または L-*a*TNA を置換すると Gapmer-ASO の毒性が低下することを見出している。そこで、Gapmer-ASO の様々な位置に SNA と L-*a*TNA を置換した Gapmer-ASO を設計し (Table 1)、毒性軽減における非環状型人工核酸の有用性を検討した。これらの Gapmer-ASO の細胞毒性は、MTS アッセイを用いて評価した (Figure 1)。その結果、Gap 領域、5'末端領域の特定位置のヌクレオチドを SNA に置換することで、Gapmer-ASO の毒性を効果的に低減できることが示された。さらに、これらの SNA 置換は Gapmer-ASO の活性にも影響し、5'末端領域の置換はアンチセンス活性を高めることを見出した。また、RNaseH による標的 RNA 切断の解析から、Gapmer-ASO の SNA および L-*a*TNA 置換は Gapmer-ASO 上の RNaseH 結合部位に制限を与えることが明らかとなった。また、Gapmer-ASO の毒性発現に関与するパラスペクトルタンパク質 p54nrb の核小体へ誤局在について、Gapmer-ASO の SNA および L-*a*TNA 置換に対する影響を解析した。その結果、Gapmer-ASO の毒性低減と p54nrb の誤局在抑制は相関することが明らかとなった。これらの結果より、Gapmer-ASO 上の特定の部位が SNA および L-*a*TNA によって置換されることで、Gapmer-ASO と毒性関連タンパク質との相互作用が抑制され、Gapmer-ASO の毒性が低減したと考察する。

**Table 1. Sequence of Gapmer-ASOs**

| Name                  | 5'- Sequence -3'               | T <sub>m</sub> (°C) |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------|
| Nontoxic Gapmer       | A <sup>m</sup> CATCTTCAGATCATT | 52.1                |
| Toxic Gapmer (Parent) | G <sup>m</sup> CATGTTCTCACATTA | 57.7                |
| Toxic Gapmer 5w2      | GCATGTTCTCACATTA               | 49.1                |
| Toxic Gapmer G2       | G <sup>m</sup> CATGTTCTCACATTA | 52.2                |
| Toxic Gapmer G6       | G <sup>m</sup> CATGTTCTCACATTA | 53.3                |

DNA, LNA(**bold**), SNA (underline), mC: 5-methyl Cytosine  
100 mM NaCl, 10 mM phosphate (pH 7.0), [ON]= 2.0 μM



**Figure 1. Cell viability analyses of the modified Gapmer-ASOs by MTS assay.**

1. H. Kashida, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 1285, (2011)
2. K. Murayama, *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **19**, 14151 (2013)

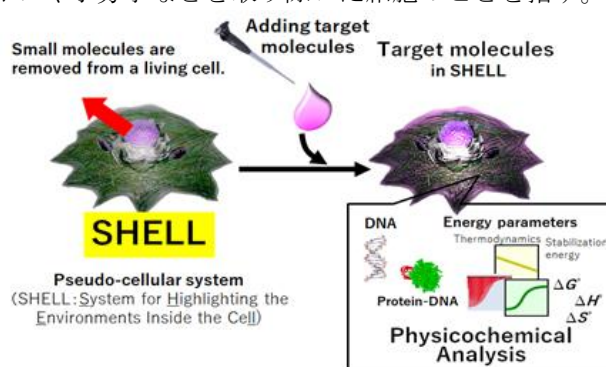
## 擬似細胞システムを使った細胞内の四重らせん構造の解析

○建石寿枝<sup>1,2</sup>・高橋俊太郎<sup>1,2</sup>・川内敬子<sup>2</sup>・Kun Chen<sup>1</sup>・凌一葦<sup>3</sup>・奥田修二郎<sup>3</sup>・  
遠藤玉樹<sup>1,2</sup>・杉本直己<sup>1</sup> (<sup>1</sup>甲南大 FIBER、<sup>2</sup>甲南大 FIRST、<sup>3</sup>新潟大学医学部)

**Analysis of quadruplex formations depending on cell type using a pseudo-cellular system** (<sup>1</sup>Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research (FIBER), <sup>2</sup> Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University,, <sup>3</sup>Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University) TATEISHI-KARIMATA, Hisae<sup>1,2</sup>; TAKAHASHI, Shuntaro<sup>1,2</sup>; KAWAUCHI, Keiko<sup>2</sup>; CHEN, Kun.<sup>1</sup>; LING, Yiwei<sup>3</sup>; OKUDA, Shujiro<sup>3</sup>; ENDOH, Tamaki<sup>1,2</sup>; SUGIMOTO, Naoki<sup>1,4</sup>

細胞内での非二重らせん構造（例えば、三重らせん構造や四重らせん構造）が形成されると遺伝子発現が抑制されることが見出され、疾患と非二重らせん構造の関連が注目されている (1)。細胞内は細胞小器官、タンパク質や核酸などの生体分子で混み立った分子クラウド環境下にある。このような環境は核酸構造に大きく影響を及ぼす。近年、我々は試験管内において中性高分子などで分子クラウド環境を構築し、遺伝子発現に重要な RNA/DNA ハイブリッド構造の形成を予測するエネルギーパラメータを構築し、開発したパラメータによって細胞内のゲノム編集やアンチセンス核酸による遺伝子発現の抑制効率を予測できることを見出した (2)。このような予測は、生化学実験の標準的な溶液環境（100 mM KCl を含む中性水溶液）で開発された既存のパラメータでは、困難であったことから、核酸の構造や機能発現には溶液環境が非常に重要であることが推察される。しかしながら開発されたパラメータでは、非二重らせん構造の形成予測までは困難であった。本研究では、細胞内での核酸構造形成や遺伝子発現に関わる生体反応をより定量的に解析するため、細胞内分子環境評価系を開発することを試みた。

細胞の分子空間を使って細胞内における核酸の構造を簡便に解析するために、実細胞を用いて試験管内で細胞内の分子環境を再現できる細胞内分子環境評価系、SHELL (System for highlighting the environments inside the cell) を開発した (図 1)。SHELL とは、細胞内部に存在するタンパク質や核酸分子などの存在量や空間的配置を維持しつつ、イオンや小分子などを取り除いた細胞のことを指す。ヒト細胞を用いて SHELL を構築し、G-四重らせん構造をモデルとして解析した結果、試験管内での G-四重らせんの挙動は細胞内での挙動と異なった。一方、SHELL 内での G-四重らせん構造の挙動は、細胞内での挙動と一致した (3)。講演では、細胞の種類による分子環境の変化が、核酸構造や遺伝子発現に及ぼす影響について議論する。



**Fig.1.** Schematic illustration of the construction of a pseudo-cellular system (SHELL).

### 【参考文献】

- 1) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 642 (2018)
- 2) D. Banerjee, H. Tateishi-Karimata, M. Toplishek, T. Ohyama, S. Ghosh, S. Takahashi, M. Trajkovski, J. Plavec, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **145**, 23503-23518 (2023)
- 3) H. Tateishi-Karimata, K. Kawauchi, S. Takahashi, and N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **146**, 8005–8012 (2024)

## 哺乳動物初期胚への光による時空間特異的な RNA 導入

○大槻高史<sup>1</sup>, 井川優風<sup>1</sup>, 若井拓哉<sup>2</sup>, 舟橋弘晃<sup>2</sup>, 渡邊和則<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>岡山大学院統合科学, <sup>2</sup>岡山大学院環境生命)

**Photo-dependent spatiotemporal specific RNA transfection in a mammalian embryo.** (Dept. Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama Univ.<sup>1</sup>, Dept. Animal Science, Okayama Univ.<sup>2</sup>) OHTSUKI Takashi<sup>1</sup>; IKAWA Yuka<sup>1</sup>; WAKAI Takuya<sup>2</sup>; FUNAHASHI Hiroaki<sup>2</sup>; WATANABE Kazunori<sup>1</sup>

哺乳動物の受精卵は、2～8 細胞期、桑実胚期、胚盤胞期などの初期胚の時期を経て成体へと成長する。初期胚の発生過程には、多くの生体分子の時空間特異的な働きが関与すると考えられているが、その詳細は不明な点が多い。生体分子の時空間特異的な発現と初期胚発生との関係を調べるには、胚の中の狙った 1 細胞にのみ生体分子を導入する方法が有用だと考えられる。そこで本研究では、マウス胚に対する時空間特異的な光依存的 RNA 導入法の確立を目指した。

具体的には、以下の取り組みを行った。RNA を光依存的に細胞内に導入するために、光増感剤を付加した RNA キャリアタンパク質を作製した。この光増感剤修飾 RNA キャリアタンパク質と RNA を、透明帯を除去したマウス胚に投与し、2、4、8 細胞期など各時期において 1 細胞を狙ってレーザー光で照射することで、局所的な RNA 導入を行った。導入された RNA は、フルオレセイン標識した RNA を用いることで蛍光顕微鏡により観測した。RNA 導入後のマウス胚の発生の様子は、DIC 像により経過観察した。RNAi については EGFP のノックダウンを指標に、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、2、4、8 細胞期のマウス胚において、光増感剤修飾 RNA キャリアタンパク質の細胞内への侵入および光照射による RNA の細胞質移行が観察できた。つまり、光依存的かつ時空間特異的な RNA 導入に成功した。さらに、光依存的な RNA 導入を行ったマウス胚が、胚盤胞期まで発生が進むことを確認した。また、光照射部位特異的な RNAi にも成功した。

このように、マウス胚において、光照射した時期に、光で狙った細胞に対して（つまり時空間特異的に）RNA を導入する方法を確立した。この方法は、初期発生の機構解明や、受精卵～初期胚を対象とする生殖補助医療の基盤研究などに役立つことが期待される。

Reference: Ikawa Y, Wakai T, Funahashi H, Soe TH, Watanabe K, Ohtsuki T, *Scientific Reports*, 13, 13050 (2023)

---

一般口頭発表 | 分子認識・超分子・モデル系

## 分子認識・超分子・モデル系

座長：多喜 正泰（名古屋大学）

2024年9月14日(土) 09:30 ～ 10:30 C会場 (中会議室202)

---

### [3OC-01] 金属が誘起する平行および逆平行型の最小 $\beta$ ヘリックス二重鎖形成

\*遠藤 祐生<sup>1</sup>、吉沢 道人<sup>1</sup>、澤田 知久<sup>1,2</sup>（1. 東工大・化生研、2. JSTさきがけ）

09:30 ～ 09:50

### [3OC-02] オリゴプロリンを用いた分子ケージの構築とプロリン残基数に依存したケージ形成能の違い

\*井上 綸<sup>1</sup>、稲井 嘉人<sup>1</sup>、樋口 真弘<sup>1</sup>、松原 翔吾<sup>1</sup>（1. 名古屋工業大学大学院工学研究科）

09:50 ～ 10:10

### [3OC-03] タンパク質と相互作用ペプチドの探索のための OPOBライブラリーの構築とスクリーニングされたビーズ上のペプチド配列解析法

\*軒原 清史<sup>1</sup>（1. 株式会社ハイペップ研究所）

10:10 ～ 10:30

# 金属が誘起する平行および逆平行型の最小 $\beta$ ヘリックス二重鎖形成

○遠藤祐生<sup>1</sup>・吉沢道人<sup>1</sup>・澤田知久<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>東工大化生研、<sup>2</sup>JST さきがけ)

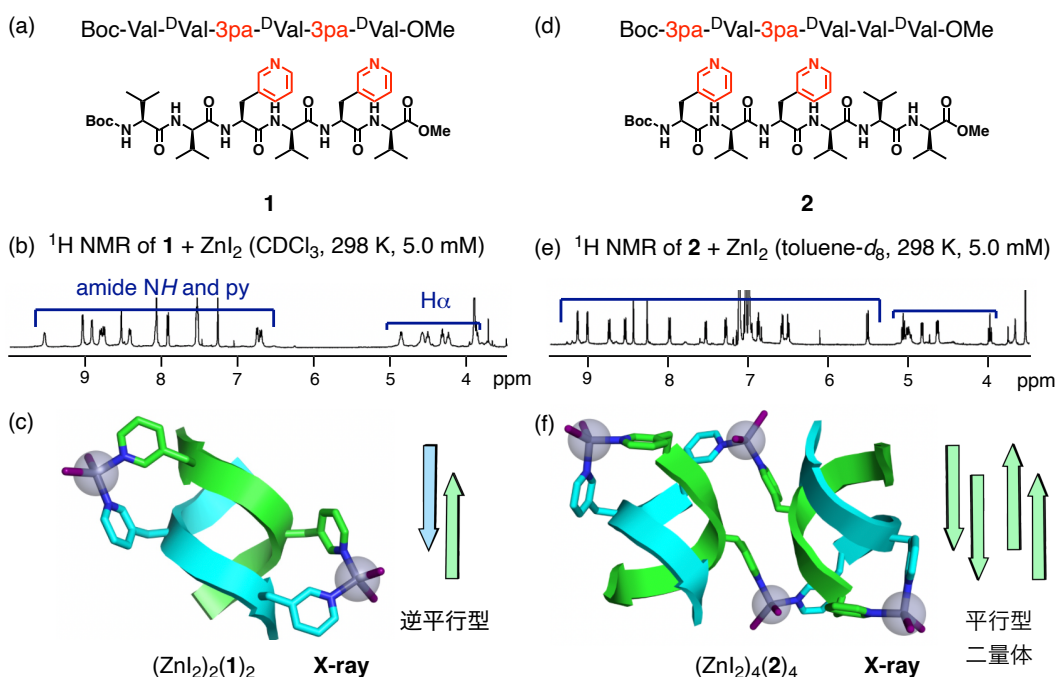
## Metal-induced formation of minimal double-stranded $\beta$ -helices with parallel and anti-parallel fashion

(Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech<sup>1</sup>, JST PRESTO<sup>2</sup>) ENDO, Masaki<sup>1</sup>; YOSHIZAWA, Michito<sup>1</sup>; SAWADA, Tomohisa<sup>1,2</sup>

DNAに見られるように、二重らせん構造は、柔軟な分子鎖から秩序立った構造を構築するための優れた構造単位である。ペプチドにおいても、L-およびD-アミノ酸の交互配列から形成する $\beta$ ヘリックス二重らせん構造が古くから知られているが、その活用は未開拓である。本研究では、その活用に向けて、高効率な $\beta$ ヘリックス二重らせんの構築方法を検討した。これまでに、 $\beta$ ヘリックス二重らせんを溶液中で動的に形成する(L,D)-オクタバリン<sup>[1]</sup>に着目し、これに金属配位性残基の $\beta$ -(3-ピリジル)-L-アラニン(3pa)を2ヶ所導入し、ZnI<sub>2</sub>による側鎖の金属架橋を施すことで一義な二重らせん形成を行った<sup>[2]</sup>。今回、本手法をわずか6残基のペプチド配列に適用し、最小の $\beta$ ヘリックス二重らせん構造の形成を達成したので報告する。

ヘキサペプチド配列として、N末端から3,5残基目に3paを導入したペプチド**1**を設計し、Boc液相法により合成した(図a)。クロロホルム中で**1**とZnI<sub>2</sub>の錯形成を行ったところ、<sup>1</sup>H NMRスペクトルにおいて、芳香族およびアミドシグナルが幅広く分散したシグナルパターンが得られた。COSYおよびROESY測定により各シグナルの帰属を行い、単一の二重鎖構造の形成が確認された(図b)。さらに結晶化にも成功し、逆平行型の $\beta$ ヘリックス構造であることを明らかにした(図c)。次に、N末端から1,3残基目に3paを導入したペプチド**2**を合成し(図d)、同様にZnI<sub>2</sub>との錯形成を行った。**2**の錯形成後の<sup>1</sup>H NMR測定では、トルエン中において単一の二重鎖構造の形成が確認され(図e)、クロロホルムおよびクロロホルム/アセトン=1/1(v/v)の溶液中ではそのシグナルが非対称化した。クロロホルム/アセトン混合溶媒からの結晶化に成功し、平行型の $\beta$ ヘリックスの二量体構造であることを明らかにした(図f)。以上、本研究では、6残基からなる最小の $\beta$ ヘリックス二重らせん構造を金属架橋によって精密構築することに成功し、架橋位置に応じた平行型/逆平行型の制御も実現した。

[1] G. P. Lorenzi *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1728. [2] T. Sawada *et al.* *Nat Sci.* **2021**, *1*, e10008.

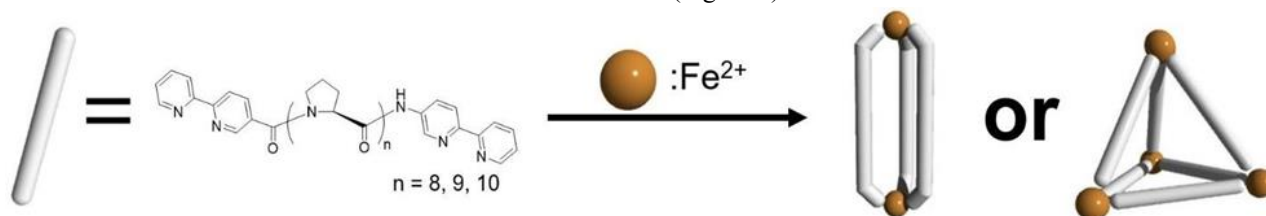


## オリゴプロリンを用いた分子ケージの構築とプロリン残基数に依存したケージ形成能の違い

○井上 綸・稲井 嘉人・樋口 真弘・松原 翔吾（名工大院工）

Construction of the supramolecular oligoproline cages and their cage forming ability dependent on proline residues  
Rin Inoue, Yoshihito Inai, Masahiro Higuchi, and Shogo Matsubara (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

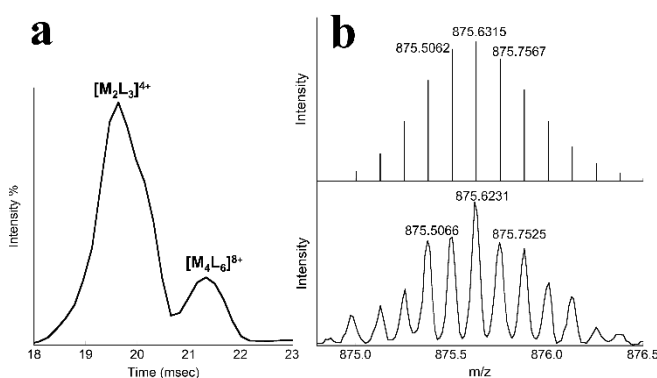
超分子ケージは分子認識能およびケージ内への物質内包機能を持っており、この機能を活用することでドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用が期待される。一方で、従来の超分子ケージは芳香族分子を主とした剛直な分子でケージ構築を行うのが一般的であるため<sup>[1]</sup>、DDS キャリアのような生体材料としての応用は難しい。そこで、我々は高い生体適合性を有するペプチドの一種であり、ポリプロリンⅡヘリックスと呼ばれる棒状の二次構造を有するオリゴプロリンに着目した。分子内水素結合を形成しないため、独立した一本の棒状分子として扱うことが可能であり<sup>[2]</sup>、本研究ではオリゴプロリンの両末端に配位部位としてビピリジル基を導入したオリゴプロリン誘導体を合成し、それらを錯形成させることによって超分子ケージの構築を試みた(Figure 1)。



**Figure 1.** Schematic model of oligoproline nanocages via complexation of  $\text{Fe}^{2+}$  and OP-X (X = 8, 9 and 10).

ケージ構造の骨格となるリガンドとして、両末端に配位部位であるビピリジル基を有するオリゴプロリン誘導体OP-8を設計・合成した。水中でOP-8を六配位型金属イオンである $\text{Fe}^{2+}$ と反応させることによって、超分子錯体が形成していることを紫外可視吸収、円二色性スペクトル測定で確認し、ESI-TOF-MS測定やサイズ排除クロマトグラフ分析およびイオンモビリティ質量分析により $\text{Fe}^{2+}(\text{M})$ とリガンド(L)から構成される $\text{M}_2\text{L}_3$ 型と $\text{M}_4\text{L}_6$ 型の超分子ケージの二種類が混在していることが判明した(Figure 2)。

オリゴプロリンは3残基で一回転する性質から、プロリン残基数の違いによりケージ形成能に変化が生まれると考え、プロリン残基数の異なるオリゴプロリン誘導体OP-9/10を合成し、それらがどのような超分子ケージを形成するかについて詳細な構造解析を行ったので報告する。



**Figure 2.** (a) Arrival time distributions of the oligoproline nanocages consisting of OP-8 and  $\text{Fe}^{2+}$ . (b) Comparison between experimental (lower) and simulated (upper) ESI-TOF-MS spectra of oligoproline cage  $[\text{M}_4\text{L}_6]^{8+}$ .

[1] E. G. Percástegui, T. K. Ronson, and J. R. Nitschke, *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 13480–13544.

[2] Y. Okamoto, M. Higuchi, and S. Matsubara, *Langmuir* **2024**, *40*, 12802–12809.

## タンパク質と相互作用ペプチドの探索のための OPOB ライブラリーの構築とスクリーニングされたビーズ上のペプチド配列解析法

○軒原清史・北川篤・富永裕希・笠間健嗣・佐々木亨（ハイペップ研究所）

**Discovery of interacting peptides by construction of OPOB-libraries and high-throughput sequencing of the screened bead** (HiPep Laboratories) NOKIHARA, Kiyoshi; KITAGAWA, Atsushi; TOMINAGA, Yuki; KASAMA, Takeshi; SASAKI Toru

一つの環状ペプチドだけが一つのビーズ上に固定化されたライブラリー (OPOB) は、タンパク質等の生体分子を捕捉することが可能であるため、タンパク質相互作用 (PPI) に基づくペプチドの探索や創薬開発に有用である。演者らは PPI における探索や創薬候補化合物の探索を目的とし、2 種類の OPOB ライブラリーを構築した。それらは CP24OB、19 の天然アミノ酸と 5 つの非タンパク質構成アミノ酸および 2 つの D-Cys を含む 24 のビルディングブロックからなる、約 2 億種の多様性を有する[1]、および、各構成物がドラッグ様の構造となるよう、主に非タンパク質構成アミノ酸をビルディングユニットとして選別した約 300 万種類の多様性を有する CP12FD である。後者は化学的開裂のために Met 残基を含み、ジスルフィドあるいはチオエーテルで環状化したライブラリーである[2]。ディスプレイ法の欠点を克服する事に注力し、過去のペプチド創薬データに基づいてビルディングユニットを選別した。探索を成功させる鍵はライブラリーの純度と均一性である。スクリーニングによって選別されたビーズ上のペプチドの配列決定は、しばしば探索プロセスのボトルネックである。これまで、エドマン分解や部分加水分解[1]を駆使したが、いずれも制約があり、時として二次ライブラリーの増加を引き起こし、スループットと経済性で問題を提起した。そこで、2-nitro-5-thiocyanatobenzoic acid (NTCB)を用いる cyanidation[3]により、シングルビーズから標的ペプチドをワンポット反応で化学的に遊離させ、アミノ酸配列を決定する方法を開発した(図 1)。オフラインのナノ LC に続き MALDI-TOF-MS/MS を用いることで、単一ビーズ上の配列を迅速に決定することができた[4]。

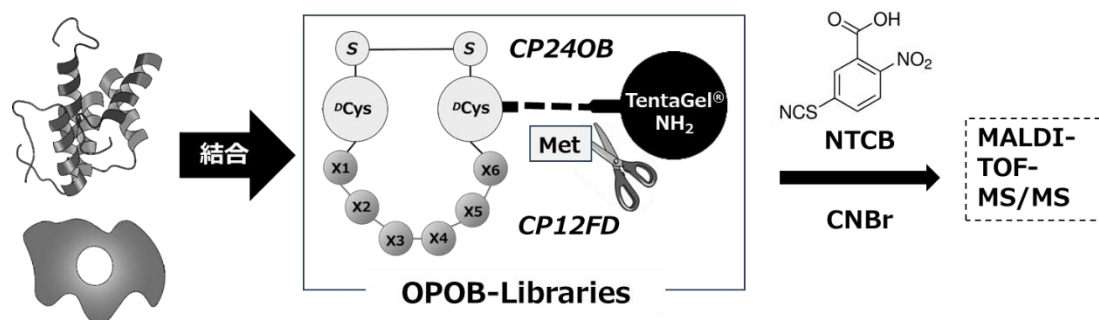


図 1. ペプチド搭載ビーズが相互作用するペプチドの配列解析スキーム。MALDI-TOF を用いたのは高エネルギーCIDにより、構造異性体(例えば Leu/Ile や Val/Nva)の区別をするためである。

[1] Nokihara, K., Kasama, T., Tominaga, Y., Kitagawa, A., Hirata, A., Ohya, T. and Yazawa, I. Amino Acids, 48, 2491-2499 (2016).

[2] Sasaki, T., Kasama, T. and Nokihara, K. Chem. Biol. Drug Des, 102, 1327-1335 (2023).

[3] Degani, Y. and Patchornik A. Biochemistry 13, 1-11 (1974).

[4] Kasama, T. and Nokihara, K. Analytical Sciences (2024) *in press*.

---

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：古谷 俊介（産業技術総合研究所）

2024年9月14日(土) 10:40 ～ 12:00 C会場（中会議室202）

---

### [3OC-04] 水晶振動子質量センサー上での等温 PCRのリアルタイム検出

\*熊谷 英度<sup>1</sup>、古澤 宏幸<sup>1,2</sup>（1. 山形大学大学院有機材料システム研究科、2. 山形大学教育推進機構）

10:40 ～ 11:00

### [3OC-05] 凝集性制御に基づく加水分解酵素活性検出ラマンプローブの開発

\*河谷 稔<sup>1,2</sup>、沖中 桃子<sup>3</sup>、藤岡 礼任<sup>1</sup>、Spratt Spencer<sup>4</sup>、浦野 泰照<sup>3,5</sup>、小関 泰之<sup>4</sup>、神谷 真子<sup>1,6</sup>  
（1. 東京工業大学生命理工学院、2. JST ACT-X、3. 東京大学大学院薬学系研究科、4. 東京大学先端科学技術研究センター、5. 東京大学大学院医学系研究科、6. 東京工業大学自律システム材料学研究センター）

11:00 ～ 11:20

### [3OC-06] プラズモニックナノワイヤー単一細胞内視鏡法を用いた細胞核内における薬剤-DNA相互作用検出

\*猪瀬 朋子<sup>1,2,3</sup>、Ricci Monica<sup>4</sup>、Fortuni Beatrice<sup>4</sup>、雲林院 宏<sup>4,5</sup>（1. 京都大学白眉センター、2. 京都大学iCeMS、3. JSTさきがけ、4. ルーバン大学、5. 北海道大学電子科学研究所）

11:20 ～ 11:40

### [3OC-07] 生細胞1分子観察を通じた不均一な細胞膜分子運動の解析

\*吉村 英哲<sup>1</sup>、小澤 岳昌<sup>1</sup>（1. 東京大学）

11:40 ～ 12:00

## 水晶振動子質量センサー上での等温 PCR のリアルタイム検出

○熊谷英度<sup>1</sup>・古澤宏幸<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>山形大院有機材料システム、<sup>2</sup>山形大教育推進機構)

**Real-time detection of isothermal PCR on Quartz Crystal Microbalance.** (Graduate School of Organic Materials Science, Yamagata Univ.<sup>1</sup>, IPGE, Yamagata Univ.<sup>2</sup>) KUMAGAI Hideto<sup>1</sup>; FURUSAWA, Hiroyuki<sup>1,2</sup>

【はじめに】 PCR は特定の DNA 配列を指数関数的に増幅することのできる手法であり、ウイルス検出など生物の特定等の遺伝子検出に応用されている。特に簡易な PCR デバイスは、場所に依存せず利用できることからフィールドでの利用など注目されている。しかしながら、これまでの PCR では 55～95℃ 程度の高温下で反応を行う必要があり、小型化は難しかった。近年、新たな手法として RPA (Recombinase Polymerase Amplification)法が開発された。RPA 法ではリコンビナーゼを用いることでプライマー-DNA を 2 本鎖 DNA に挿入でき、反応温度 22-45℃という低温かつ一定の定温条件下で増幅が可能であることから、簡易な PCR デバイスを普及させる上で興味深い。水晶振動子マイクロバランズ (QCM) 法は質量を観察できる手法の一種である。その原理は水晶の逆圧電効果を利用し水晶を規則正しく振動させ、水晶基板表面に質量を持ったものが吸着し振動に負荷がかかると振動数が減少するという質量センサーである。本研究では、小型 QCM での DNA 検出へ応用することを見据え、QCM 法を用いて質量として RPA 反応を経時観察できるか検討を行った。

【実験】 水晶振動子のセンサー表面にアビジン-ビオチン法を用いて 2 本のプライマー-DNA 鎖の片方を固定し、センサーセルを RPA 法の DNA 増幅溶液の 1/2 希釈液で満たした。トリガーとして反応に必須な  $Mg^{2+}$  を添加し反応を開始させ、その後の DNA 伸長の様子を振動数変化 ( $\Delta F$ ) として観察した。また、溶液にプライマーを入れずに反応を開始させたセンサーセルでも同様に観察した。

【結果・考察】 反応が生じるプライマーありの場合では、多段階のシグモイド様の曲線が観察され (図 1B(a))、反応が進行しないプライマーなしの場合 (図 1B(b)) では比較的变化量が小さく、1 段階のみの変化であった。DNA 増幅反応に伴って質量変化を引き起こしていることが確認できた。また、10 分以内にシグナル変化が終了していることから、迅速な DNA 検出の応用が期待できた。あわせて、DNA 検出におけるセンサー基板上での RPA 反応機構について検証を行い、プライマー-リコンビナーゼ-二本鎖 DNA の三元複合体形成が観察されていると結論付けた<sup>1</sup>。

[1] H. Kumagai and H. Furusawa, *Biosensors*, **14**, 155 (2024).

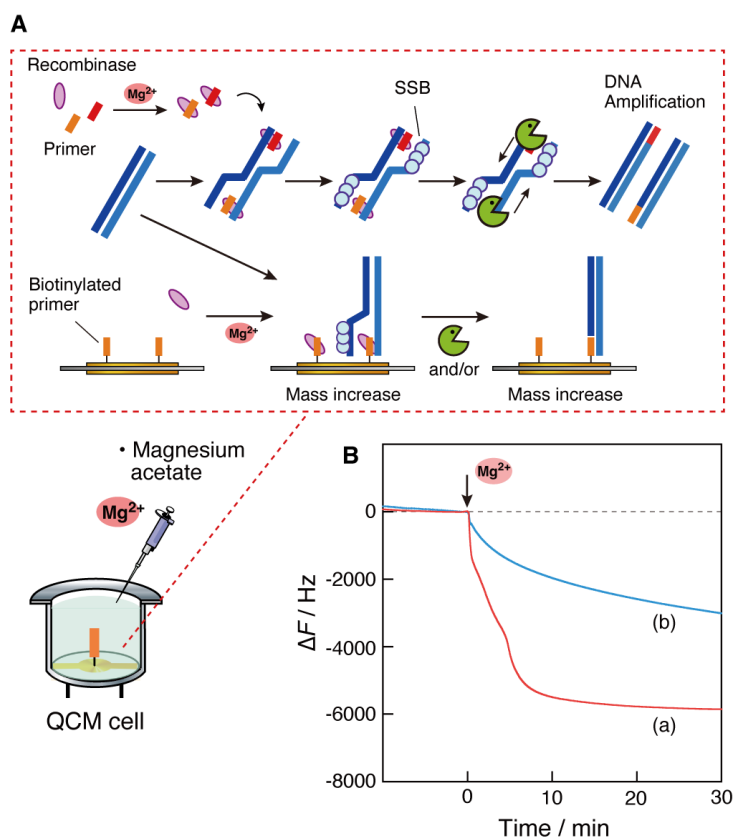


図1 (A)RPA 反応と水晶振動子基板上で生じる反応の模式図、及び(B)水晶振動子センサーセルに  $Mg^{2+}$  を添加したときの振動数変化:(a)プライマーあり、(b)プライマーなし。

条件 : [Primer] = 0.24  $\mu$ M, PCR Solution: 1/2 希釈、35℃

## 凝集性制御に基づく加水分解酵素活性検出ラマンプローブの開発

○河谷稔<sup>1,2</sup>・沖中桃子<sup>3</sup>・Spratt Spencer<sup>4</sup>・藤岡礼任<sup>1</sup>・浦野泰照<sup>3,5</sup>・小関泰之<sup>4</sup>・  
神谷真子<sup>1,6</sup> (1 東工大生命理工、2 JST ACT-X、3 東大院薬、4 東大先端研、5 東大院  
医、6 東工大 ASMat)

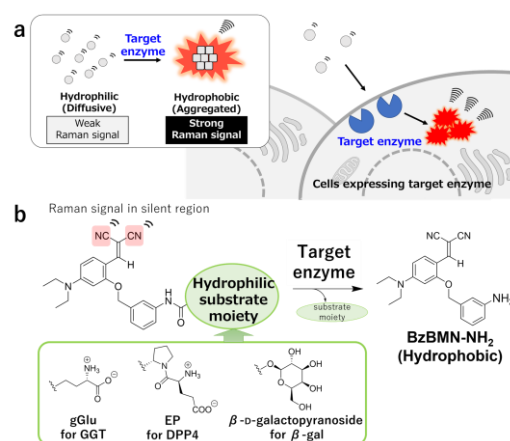
**Development of Raman probes for enzyme activity detection through aggregation control** (Sch. Life Sci. Technol. Tokyo Tech.<sup>1</sup>, ACT-X, JST<sup>2</sup>, Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo<sup>3</sup>, RCAST, The Univ. of Tokyo<sup>4</sup>, Grad. Sch. Med., The Univ. of Tokyo<sup>5</sup>, ASMat, Tokyo Tech<sup>6</sup>) KAWATANI, Minoru<sup>1,2</sup>; OKINAKA, Momoko<sup>3</sup>; SPRATT, Spencer<sup>4</sup>; FUJIOKA, Hiroyoshi<sup>1</sup>; URANO, Yasuteru<sup>3,5</sup>; OZEKI, Yasuyuki<sup>4</sup>; KAMIYA, Mako<sup>1,6</sup>

生体内では様々な加水分解酵素が協奏的に働いているが、がんなどの一部の疾患では特定の酵素活性に特徴的な変化が見られる。酵素活性検出蛍光プローブはがんイメージングなどに有用であるが、幅広い蛍光スペクトルの重なりが原因で同時に可視化できる酵素活性は2~3種類に限られている。近年我々は、ラマンスペクトルの狭帯域性に着目し、蛍光イメージングよりも多重検出能に優れたラマンイメージングで酵素活性を可視化できる **activatable** 型酵素活性検出ラマンプローブの開発に成功した<sup>1)</sup>。一方で、このプローブは分子設計の自由度が低く、さらなる多色化や高機能化に向けた構造展開が難しいという課題があった。

そこで我々は、化合物の局所濃度が高い凝集体から強いラマン信号が観察されることに着目し<sup>2)</sup>、酵素反応を凝集体として検出可能な新たな酵素活性検出ラマンプローブを開発した。具体的には、水溶液中で高い凝集性を示し、生体分子由来のバックグラウンドシグナルが低い波数領域にラマン信号を示すニトリル基を有する色素 **BzBMN-NH<sub>2</sub>** を母核とし、水溶性が高い標的酵素との反応部位を基質として組み込むことで、標的酵素との反応前は水溶性が高く分散しているためラマン信号が弱い、標的酵素との反応により水溶性が低下することで凝集体が生じ、局所濃度が高まることで強いラマン信号が得られる凝集誘導型のラマンプローブを開発した。 $\gamma$ -glutamyltranspeptidase (GGT)、 $\beta$ -galactosidase、

dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) を標的酵素とし、**BzBMN-NH<sub>2</sub>** にこれらの基質を組み込んだラマンプローブ **gGlu-BzBMN**、 **$\beta$ Gal-BzBMN**、**EP-BzBMN** を設計・合成した。それぞれ標的酵素とさせたところ、反応前の各プローブは水溶液中に分散しておりラマン信号は弱い、標的酵素と反応に伴ってそれぞれ凝集体が生成し、強いラマン信号が観察された。続いて、開発したプローブを GGT 高発現・DPP4 低発現細胞 (A549 細胞) 及び GGT 低発現・DPP4 高発現細胞 (H226 細胞)、または  $\beta$ -galactosidase 高発現細胞 (HEK-LacZ 細胞) 及び  $\beta$ -galactosidase 低発現細胞 (HEK293 細胞) に適用し、標的酵素活性の生細胞ラマンイメージングを行った。その結果、それぞれの細胞が有する酵素活性に応じた凝集体生成とラマン信号増強が観察された。さらに、**BzBMN-NH<sub>2</sub>** のニトリル基を同位体置換したプローブを合成したところ、凝集特性を有したまま同位体置換に応じてラマンシフト値が約 20 cm<sup>-1</sup> ずつ変化することが明らかとなった。そこで **BzBMN-NH<sub>2</sub>** のニトリル基の窒素原子を同位体置換した [<sup>15</sup>N]**gGlu-BzBMN** を合成し、**EP-BzBMN** と同時に A549 細胞及び H226 細胞に適用したところ、生細胞における GGT 活性、DPP4 活性の同時イメージングが可能であることが示された。

<Ref> 1) Fujioka et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 20701. 2) Fujioka et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145, 8871.



**Figure |** Schematic (a) and chemical structure (b) of aggregation-based Raman probes for enzyme activity.

## プラズモニックナノワイヤー単一細胞内視鏡法を用いた細胞核内における薬剤-DNA 相互作用検出

○猪瀬朋子<sup>1,2,3</sup>・Ricci Monica<sup>4</sup>・Fortuni Beatrice<sup>4</sup>・雲林院宏<sup>4,5</sup>（<sup>1</sup>京大白眉センター、<sup>2</sup>京大 iCeMS、<sup>3</sup>JST さきがけ、<sup>4</sup>ルーバン大学、<sup>5</sup>北大電子研）

**Investigation of the interaction between drug and DNA inside the nucleus of a living cell using plasmonic nanowire-based single live-cell endoscopy** (The Hakubi center, Kyoto Univ.<sup>1</sup>, iCeMS, Kyoto Univ.<sup>2</sup> JST PRESTO<sup>3</sup>, KU Leuven<sup>4</sup>, RIES, Hokkaido Univ.<sup>5</sup>) INOSE, Tomoko<sup>1,2,3</sup>; RICCI, Monica<sup>4</sup>; FORTUNI Beatrice<sup>4</sup>; UJI-I Hiroshi<sup>4,5</sup>

近年、副作用を抑えて効率良く抗がん剤をがん細胞へ届ける方法として、ナノ粒子を用いた薬輸送システム (DDS) が広く研究されている。ナノ粒子 DDS では、標的とするがん細胞を特異的にターゲットすることが可能な表面修飾をナノ粒子に施すことが可能である。このようなナノ粒子に抗がん剤を内包することで、標的がん細胞へと効率的に抗がん剤を届けることができ、副作用を抑制したがん化学療法への応用が期待されている。これまでに多くのナノ粒子 DDS が報告されているが、そのほとんどが実際の臨床応用には至っていない。

実用的なナノ粒子 DDS 設計のためには、新規材料開発とともに、細胞内での薬剤挙動を正しく理解するための評価手法が必要不可欠である。細胞内の薬剤挙動を観察するために広く用いられている方法の一つは蛍光顕微鏡であり、生きた細胞内の薬剤挙動をリアルタイムで経時追跡できる。一方蛍光顕微鏡では、標的試料が蛍光を示す必要があるため、蛍光を示さない物質や、蛍光ラベルによって材料の特性が変わってしまう物質に適用することができない。生きた細胞をその場観察可能な他の方法として、ラマン散乱顕微鏡法が挙げられる。ラマン散乱顕微鏡法では、試料の染色が必要ないため、細胞内に存在する分子そのものの振動情報を直接得ることができるが、生体関連試料を計測する場合、低感度であることがしばしば問題となる。

本研究では、プラズモニックナノワイヤー単一細胞内視鏡法<sup>1</sup>を用いることで、細胞内の任意の位置に存在する抗がん剤と細胞内物質の相互作用に由来するラマン信号を高感度検出することを目的とし実験を行った。プラズモニックナノワイヤー単一細胞内視鏡法では、ナノワイヤー表面上で起こるプラズモン現象を利用することで、従来のラマン散乱顕微鏡法で課題であった低感度の問題を克服し、生きた単一細胞内の任意の位置に存在する分子の振動情報を、任意のタイミングで得ることができる。本研究では、ナノ粒子 DDS を用いたがん細胞への抗がん剤輸送と、抗がん剤そのものをがん細胞へ投与した場合に、がん細胞内における抗がん剤の挙動にどのような違いがあるのか、プラズモニックナノワイヤー単一細胞内視鏡法を用いることで評価した。本研究では特に、投与された抗がん剤が、細胞核内の DNA と相互作用するまでのタイミングを、単一細胞内視鏡法を用いて詳しく調べることで、ナノ粒子 DDS を用いた場合と用いない場合にどのような違いが見られるのか、詳細を明らかにすることに成功した。<sup>2</sup>このような評価は従来法では困難であり、プラズモニックナノワイヤー単一細胞内視鏡法を用いることで初めて得られる情報である。本手法は今後、薬剤そのものの細胞内での挙動や、細胞内物質との相互作用を明らかにするために有用な手法になると期待される。

[1] G. Lu, H. De Keersmaecker, L. Su, B. Kenens, S. Rocha, E. Fron, C. Chen, P. Van Dorpe, H. Mizuno, J. Hofkens, J. A. Hutchison, H. Uji-i, *Adv. Mater.*, **2014**, 26, 5124

[2] M. Ricci, B. Fortuni, R. Vitale, Q. Zhang, Y.o Fujita, S. Toyouchi, G. Lu, S. Rocha, T. Inose, H. Uji-i, *Anal. Chem.* **2021**, 93, 5037

## 生細胞 1 分子観察を通じた不均一な細胞膜分子運動の解析

○吉村英哲・小澤岳昌（東大院理）

**Analysis of non-uniform molecular motility in the plasma membrane through single-molecule imaging of living cells** (Department of Chemistry, School of Science, The University of Tokyo) YOSHIMURA, Hideaki; OZAWA, Takeaki

細胞膜は細胞内外を分けるインターフェイスとして機能している。細胞膜上に存在する受容体分子はそれぞれに対応する細胞外の刺激を感知すると受容体オリゴマーを形成し、細胞内のシグナル伝達タンパク質にその刺激情報を伝達する。すなわち、受容体が細胞外刺激を感知すると、複数の受容体と細胞内シグナル伝達タンパク質からなる分子集合体が形成される。

細胞膜における受容体密度は 数分子/ $\mu\text{m}^2$  程度で、細胞内のシグナル伝達タンパク質濃度は  $1\mu\text{M}$  程度、また  $\text{EC}_{50}$  に当たるリガンド濃度は多くの受容体で数  $\text{nM}$  から数  $10\text{ nM}$  程度である。また、細胞膜および細胞質のタンパク質濃度は約 30%程度と言われ、極めて分子夾雑度の高い環境にある。このように、各要素が低濃度かつ夾雑度の高い環境で、外部刺激に対して速やかに複数の受容体とシグナル伝達タンパク質が集合し複合体を形成する過程は、溶液中の分子運動論からは説明がつかない。すなわち、受容体へのシグナル入力が起こってから細胞内にシグナル入力を起こす過程には、速やかなシグナル伝達分子複合体を形成するための特殊な分子運動が生じていると考えられる。しかしその過程並びに分子運動については解明されていない。

本研究では、生細胞 1 分子運動観察を通じてこの細胞内へのシグナル入力過程の理解を目指す。具体的には、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) を標的として、刺激入力からシグナル伝達反応が起こるまでの数分間にわたって GPCR の生細胞 1 分子追跡を行った。ただし、1 分子蛍光輝点は退色のため数分間連続追跡が困難である。そこで光活性型蛍光タンパク質 mEos を用いて、個々の輝点は退色しても新たな輝点が現れる sptPALM 法を利用した観察法を開発した。その結果、数分間にわたる連続的な生細胞 1 分子観察が実現し、1 細胞から合計数 10 万軌跡を取得することが可能となった。この観察から得られた軌跡情報を元に、粒子画像流速測定法を元にした運動空間分布解析を行ったところ、受容体分子の運動性が低下している領域や閉じ込め運動が生じる領域、受容体が 1 点に集中するような動きを示す領域などが一過的に形成・消失していることを見出した。すなわち、細胞膜上における時間・空間的に不均一な分子運動分布の様子が検出された。これら解析結果を元に、受容体とシグナル伝達タンパク質による速やかなシグナル応答が起こる原理について議論する。