

2024年9月12日(木)

ポスター会場

ポスター発表 | 1P-01~1P-109

ポスター発表

13:20 ~ 15:00 ポスター会場 (多目的ホール)

[1P-01] SARS-CoV-2感染細胞内における3CLプロテアーゼの活性制御・局在解明を目指した Activity-based probeの開発

*山内 勇輝¹、今野 翔²、大村 紀子¹、吉岡 成美²、Hingst Alexandra³、Gütschow Michael³、Müller Christa³、田口 晃弘²、谷口 敦彦²、川口 敦史⁴、林 良雄^{2,5} (1. 東京薬科大学 薬学研究科、2. 東京薬科大学 薬学部、3. University of Bonn、4. 筑波大学 医学医療系、5. 東京薬科大学 生命科学部)

[1P-02] eDHFRタグを基本骨格とする化学遺伝学 Ca²⁺センサーのタンパク質工学的改変

*迫井 謙良¹、寺井 琢也¹、Robert Campbell¹ (1. 東大院理)

[1P-03] ジスルフィド結合含有蛋白質のフォールディング反応中間体の検出

*阪田 菜奈¹、村上 友梨¹、芦田 織歌¹、廣嶋 杏菜¹、宮澤 光博²、島本 茂¹、日高 雄二¹ (1. 近畿大学大学院総合理工学研究科、2. (株)プリベンテック)

[1P-04] 全原子分子動力学計算によるファイバータンパク質 AtaAの構成ドメインの力学特性解析

*笹原 純¹、逸見 奎太¹、吉本 将悟¹、堀 克敏¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科)

[1P-05] FAD/ThDP依存性酵素の反応性を拡張した非生物学的光ラジカルアシル化反応の開発

*足立 柚斗¹、藤沢 修斗¹、加藤 俊介¹、林 高史¹ (1. 大阪大学大学院工学研究科)

[1P-06] シトクロム P450BM3による非天然基質の酸化を促進するジカルボン酸導入デコイ分子の開発

*石上 恵¹、有安 真也¹、笠井 千枝¹、愛場 雄一郎¹、杉本 宏²、荘司 長三¹ (1. 名古屋大学大学院理学研究科、2. 理研SPRING-8)

[1P-07] Development of Fluorescent Probes for Detection of Protein-protein Interaction Using a Reversible Labeling System

*Jiatong Li¹、Masafumi Minoshima¹、Kazuya Kikuchi^{1,2} (1. Graduate School of Engineering, Osaka University、2. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)

[1P-08] 野生型と一残基変異型サブユニットからなる二量体がん関連酵素の高純度精製方法の確立

*松本 夏弥¹、韓 叡佳¹、岡 智将¹、石場 智彬²、加藤 かざし²、原田 彩佳²、岩崎 憲治^{2,3} (1. 筑波大学理工情報生命学院数理物質科学研究学群化学プログラム、2. 筑波大学生存ダイナミクスセンター、3. 筑波大学量子情報生命科学研究センター)

[1P-09] 細胞内局所の粘度計測を可能にする FRET型粘性感受性蛍光プローブの開発

*笠井 柊杜¹、佐々木 栄太^{1,2}、榛葉 満理奈²、森 貴裕³、阿部 郁朗³、花岡 健二郎^{1,2} (1. 慶應義塾大学大学院薬学研究科、2. 慶應義塾大学薬学部、3. 東京大学大学院薬学系研究科)

[1P-10] 蛍光イメージングのための世界最小モノボディタグの創製

*宮崎 友輝¹、梅本 駿²、都築 成晃²、深谷 菜摘¹、キム チュン²、吉井 達之¹、吉川 優¹、藤野 公茂²、林 剛介²、村上 裕^{2,3}、築地 真也¹ (1. 名工大院・工、2. 名大院・工、3. 名大未来ナノ)

[1P-11] SLIPT-PMを用いた上皮成長因子受容体 (EGFR) の化学遺伝学活性操作

*大平 修也¹、田原 海¹、吉川 優¹、築地 真也¹ (1. 名工大院・工)

[1P-12] 翻訳後切断を指向した DNA結合タンパク質 Repの改変

*村山 瑞季¹、西田 慶¹、小島 英理¹、三重 正和¹ (1. 東京工業大学生命理工学院)

[1P-13] Refolding Large Denatured Proteins by 2D Assembled GroEL Immobilized on Silica Surface

*Tonmoy Ray¹、Takayuki Miki¹、Hideki Taguchi²、Tatsuya Niwa²、Takuzo Aida^{1,3} (1. The University of Tokyo、2. Tokyo Institute of Technology、Suzukakedai、3. Center for Emergent Matter Science, RIKEN)

[1P-14] 寛容にタンハ°ク質を認識するチオール化合物の酸化的フォールディング促進効果

*鈴木 光希¹、野尻 涼矢¹、齋尾 智英²、奥村 正樹³、村岡 貴博^{1,4} (1. 東京農工大学 大学院工学府、2. 徳島大学 先端酵素学研究所、3. 東北大学 学際科学フロンティア研究所、4. 神奈川県立産業技術総合研究所)

[1P-15] 抗 CLIC1モノクローナル抗体の結合特性とがん浸潤抑制効果

*今井 翔月^{1,2}、Mukherjee Samrat^{2,3}、飯嶋 益巳⁴、山岸 彩奈^{1,2,3}、中村 史^{1,2,3} (1. 東京農工大学工学部、2. 産業総合研究所細胞分子工学、3. 東京農工大学大学院工学研究院、4. 東京農業大学応用生物学部)

[1P-16] 生体直交反応による光薬理学リガンドのタンパク質内合成を基盤とした機能化 DNA encoded libraryへの展開

*瀬川 友香¹、藤原 壮汰²、松尾 和哉³、和久 友則³、小堀 哲生³ (1. 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科、2. 京都工芸繊維大学工芸科学部、3. 京都工芸繊維大学分子化学系)

[1P-17] 高濃度条件で“酸化タンパク質フォールディング”を促進する超分子材料の開発とその作用機序の理解

*喜多村 真衣¹、村岡 貴博^{1,2} (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 神奈川県立産業技術総合研究所)

[1P-18] Development of covalent monobody-tag based on proximity-induced reactivity

*CHUNG KIM NGUYEN¹, Tomoki MIYAZAKI³, Shinya TSUKIJI³, Tomoshige FUJINO¹, Gosuke HAYASHI¹, Hiroshi MURAKAMI^{1,2} (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University, 3. Department of Life Science and Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)

[1P-19] 細菌細胞表面ファイバータンパク質のメチル化修飾

*井上 翔理¹、吉本 将悟¹、堀 克敏¹ (1. 名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻)

[1P-20] 外的刺激による pH 応答性伸縮タンパク質集合体の運動制御

*鱒村 颯太¹、伊達 弘貴¹、Thuc Toan Pham¹、Xin Li¹、菊池 幸祐¹、上野 隆史¹ (1. 東京工業大学生命理工学院)

[1P-21] ジャスモン酸関連主要転写因子 MYC に対する選択的低分子阻害剤の開発

*劉 瑞琦¹、三野 光識²、出井 晶子²、吉田 稔²、上田 実^{1,3}、高岡 洋輔¹ (1. 東北大学理学研究科、2. 理研 環境資源科学研究センター、3. 東北大学生命科学研究科)

[1P-22] 合成分子による GLUT4 の膜動態の操作

*御手洗 拓真¹、足立 惇弥¹、矢野 君晟²、真鍋 良幸²、堀 雄一郎¹ (1. 九州大学大学院理学府、2. 大阪大学大学院理学研究科)

[1P-23] 抗原結合にตอบสนองして活性が回復する activatable 型レポーター酵素の開発

*木地 陸揮¹、小嶋 良輔²、王子儀²、橋 棕¹、清家 直樹¹、浦野 泰照^{1,2} (1. 東京大学 大学院薬学系研究科、2. 東京大学 大学院医学系研究科)

[1P-24] β酸化活性を指標とした代謝フェノタイプスクリーニング

*Yin Ruikang¹、井上 和哉、井上 咲季¹、Xiao Xiwen¹、内之宮 祥平¹、王子田 彰夫¹ (1. 九州大学薬学

府)

[1P-25] バイオセンシング素子の簡便な構築に向けた DNA-タンパク質間を均一かつ効率的に連結可能なツールの開発

小宮 英里香¹、*中島 美月²、三浦 大明¹、塚越 かおり¹、津川 若子¹、早出 広司³、池袋 一典¹、浅野 竜太郎¹ (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 東京農工大学工学部、3. ノースカロライナ大学チャペルヒル校・ノースカロライナ州立大学)

[1P-26] 近接効果を利用した新規架橋酵素融合タンパク質による部位特異的な抗体フラグメント修飾

*室園 晃輝¹、西岡 莉子¹、内田 和希¹、川口 喜郎¹、木村 道夫¹、神谷 典穂^{1,2} (1. 九州大学大学院 工学府、2. 九州大学 未来化学創造センター)

[1P-27] リボソームディスプレイ法を用いたアデノシン A2A 受容体の指向性進化

*深澤 元喜¹、松岡 佑真²、堂浦 智裕²、清中 茂樹²、松浦 友亮³ (1. 東京工業大学 生命理工学院、2. 名古屋大学 生命分子工学専攻、3. 東京工業大学 地球生命研究所)

[1P-28] マグネトソーム膜上の脂質組成調節による膜受容体の機能解析

*小林 茉優香¹、巴 瞭斗¹、田山 爽也華¹、藤本 一嗣¹、田中 剛¹、吉野 知子¹ (1. 東京農工大学大学院工学府)

[1P-29] 分岐構造にコードされた機能の抽出を可能とする光架橋型不均一ユビキチン鎖プローブ

*宇野 大輝¹、豊田 宇咲乃¹、古畑 隆史¹、富田 拓哉²、佐藤 裕介^{3,4}、尾勝 圭⁵、深井 周也⁵、佐伯 泰²、岡本 晃充¹ (1. 東京大学 工学系研究科、2. 東京大学 医科学研究所、3. 鳥取大学 工学系研究科、4. 鳥取大学 GSC センター、5. 京都大学 工学系研究科)

[1P-30] *Megavirinae Giant Virus* 由来のタンパク質 GciS が持つ新規な6核鉄硫黄クラスターの構造と機能

*谷 歩峻¹、野尻 正樹¹ (1. 大阪大学大学院理学研究科)

[1P-31] 相同組換え誘導が可能な Cas9 変異体取得法の開発

*松本 大亮^{1,2}、久保田 小葉利²、Ahmadi Shahram¹、濁川 清美^{1,2}、野村 渉^{1,2} (1. 広島大学大学院医系科学研究科、2. 広島大学薬学部)

[1P-32] Design of Cyborg Proteins by Loop Region Replacement With Oligo(ethylene glycol)

*Wijak Yospanya^{1,2}, Akari Matsumura³, Yukihiro Imasato¹, Tomoyuki Itou⁴, Yusuke Aoki¹, Hikaru Nakazawa⁴, Takashi Matsui³, Takeshi Yokoyama³, Mihoko Ui⁵, Mitsuo Umetsu⁴, Satoru Nagatoishi^{6,7}, Kouhei Tsumoto^{6,7,8}, Yoshikazu Tanaka³, Kazushi Kinbara^{1,9} (1. School of Life Science and Technology,

Tokyo Institute of Technology, 2. AIMR, Tohoku University, 3. Graduate School of Life Science, Tohoku University, 4. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, 5. IMRAM, Tohoku University, 6. Medical Device Development and Regulation Research Center, School of Engineering, The University of Tokyo, 7. Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 8. Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 9. Living Systems Materialogy Research Group, IRFI, Tokyo Institute of Technology)

[1P-33] 細胞骨格様 2 成分蛋白質チューブの創生

*野地 真広^{1,2,3}、杉田 征彦^{4,5,6}、山崎 陽祐^{7,8}、宮崎 牧人^{6,7,8,9,10}、鈴木 雄太^{3,6,9} (1. 日本学術振興会特別研究員、2. 京都大学大学院人間・環境学研究科、3. 京都大学高等研究院物質-細胞統合システム拠点、4. 京都大学医生物学研究所、5. 京都大学大学院生命科学研究科、6. 京都大学白眉センター、7. 京都大学大学院理学研究科、8. 理化学研究所生命機能科学研究センター、9. 科学技術振興機構さきがけ研究者、10. 信州大学大学院総合理工学研究科)

[1P-34] エピジェネティクスタンパク質を分解誘導する EpiTAC技術の開発

*安田 壮秀¹、森廣 邦彦¹、岡本 晃充¹ (1. 東京大学工学系研究科化学生命工学専攻)

[1P-35] 抗菌ペプチド天然物アシルデプシペプチド 1 (ADEP1) による細菌プロテアーゼ ClpP の機能発現機構の解明および ADEP1 の構造活性相関研究

*石川 文洋¹、高橋 幹士²、正林 直人¹、秋永 修佑¹、本間 道夫³、内橋 貴之²、田邊 元三¹ (1. 近畿大学薬学部、2. 名大院理、3. 名大院工)

[1P-36] タンパク質化学修飾を指向した生理条件でのナイトレン発生法の開発研究

*豊島 暖生¹、笠原 彰友²、山次 健三² (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究院)

[1P-37] ウミホタルルシフェリンに対する SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の擬似ルシフェラーゼ活性

*西原 諒^{1,2}、Dokainish Hisham^{3,4}、木原 良樹^{1,5}、杉田 有治^{4,6,7}、栗田 僚二^{1,5} (1. 産業技術総合研究所健康医工学研究部門、2. JST さきがけ、3. 北海道大学大学院薬学研究院、4. 理化学研究所開拓研究本部、5. 筑波大学院数理物質科学研究群、6. 理化学研究所生命機能科学研究センター、7. 理化学研究所計算科学研究センター)

[1P-38] 人工細胞膜上で二量化可能な膜貫通人工核酸三重鎖

の開発

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

[1P-39] 光架橋性新規修飾塩基導入 SNAの合成と SNA/RNA二重鎖の光制御

*池田 彩華¹、佐藤 史経¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹ (1. 名古屋大学工学研究科)

[1P-40] リポソームで区画化された酵素代謝反応システム

*小松原 風汰^{1,2}、中田 栄司¹、Lin Peng¹、森井 孝^{1,3} (1. 京都大学エネルギー理工学研究所、2. 京都大学エネルギー科学研究科、3. 京都光華女子大学健康科学部)

[1P-41] DNA-Encoded Libraryにおける化学反応条件の拡張とリガンドの高純度・高収率を担保した合成サイクルの増加を実現可能とする化学合成型 DNAバーコード

*白川 真純¹、植木 亮介¹、森本 淳平¹、山東 信介¹ (1. 東京大学大学院工学系研究科)

[1P-42] 構造化したループ領域をもつグアニン四重らせん構造の液液相分離

*小坂 直暉¹、中田 実紀¹、鶴田 充生¹、川内 敬子¹、三好 大輔¹ (1. 甲南大学)

[1P-43] 2種類の短鎖 DNAをビルディングブロックとした DNA集合体の形態制御

*牧野 哲直¹、田中 真紀子¹ (1. 電通大院情報理工)

[1P-44] グアニン四重鎖結合タンパク質の分解を志向した G4-PROTACリガンドの開発

*野原 玲奈¹、棚谷 優磨¹、長澤 和夫¹、寺 正行¹ (1. 東農工大院工)

[1P-45] ¹⁹F標識オリゴデオキシヌクレオチドを用いた¹⁹F NMRによる標的 miRNAの検出

*飛田 祐希¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学大学院理工学研究科)

[1P-46] 電位差計測で DNA検出を行うための溶液条件の検討

*猪狩 雅徳¹、古澤 宏幸^{1,2} (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)

[1P-47] アゾラト架橋白金二核錯体の一本鎖 DNA液滴形成能と核酸結合様式

*山田 拓磨¹、田代 竜²、植村 雅子^{1,2}、箕浦 克彦³、米田 誠治^{1,2} (1. 鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科、2. 鈴鹿医療科学大学薬学部、3. 大阪医科薬科大学薬学部)

[1P-48] 人工基質 RNAを用いた ADAR2の RNA編集基質認識特性の解析

*嶋津 尚輝¹、島内 駿¹、緒方 悠岐¹、福田 将虎^{1,2} (1. 福岡大学大学院理学研究科、2. 福岡大学理学部化学科)

[1P-49] 天然核酸塩基対 A/T と G/C のサイズを模倣したア

ルキニル C-ヌクレオチド二重鎖の開発

*山本 こみち¹、千葉 順哉¹、大石 雄基¹、井上 将彦¹ (1. 富山大・院薬)

[1P-50] RNase Hを標的としたスプリットアプタマーの開発と検出系の構築

*成田 侑生¹ (1. 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 機能物質化学専攻)

[1P-51] 1細胞内の転写活性を時系列に計測する、新生 RNAラベルシーケンス法

*馬場 峻^{1,2}、河崎 史子¹、森本 淳平³、山東 信介³、泊 幸秀¹ (1. 東京大学 定量生命科学研究科、2. 東京大学 新領域創成科学研究科、3. 東京大学 工学系研究科 化学生命工学専攻/バイオエンジニアリング専攻)

[1P-52] 3' UTRを標的とした RNA hackingによるハプロ不全関連遺伝子の発現量増加

*五木 結愛¹、勝田 陽介^{1,2}、佐藤 慎一^{1,2}、北村 裕介¹、井原 敏博¹ (1. 熊本大学先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio)

[1P-53] RNA hacking技術を基盤とした DNA Polymeraseのスリッパ現象制御

*嘉藤 美来¹、勝田 陽介^{1,2}、北村 裕介¹、佐藤 慎一^{1,2}、井原 敏博¹ (1. 熊本大学大学院先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio)

[1P-54] 蛍光色素導入 SNAらせん増幅系の評価

*杉山 乙珠¹、浅沼 浩之¹、樫田 啓¹ (1. 名古屋大学工学研究科)

[1P-55] 高モジュール性・高活性の自己切断型アプタザイムを基盤とした真核系無細胞リボスイッチ

*藤川 真広¹、大西 和希¹、高橋 萌¹、小川 敦司¹ (1. 愛媛大プロテオサイエンスセンター)

[1P-56] 速度論的機構で IRES媒介翻訳を制御する真核リボスイッチの構築

*高橋 萌¹、藤川 真広¹、小川 敦司¹ (1. 愛媛大プロテオサイエンスセンター)

[1P-57] 金属錯体形成によるヒドロキシウラシル-アデニン塩基対の不安定化を利用した DNAナノチューブの形成制御

*竹澤 悠典¹、大西 雄登¹、森 圭太¹、塩谷 光彦^{1,2} (1. 東京大学大学院理学系研究科、2. 東京理科大学研究推進機構総合研究院)

[1P-58] 人工塩基導入 PNA配列解析法の開発

*稲垣 和真¹、愛場 雄一郎²、荘司 長三²、浅沼 浩之¹、樫田 啓¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 名古屋大学大学院理学研究科)

[1P-59] 二重鎖形成を利用した非環状型人工核酸 SNAの配列解析

*日比野 希美¹、浅沼 浩之¹、樫田 啓¹ (1. 名大院工)

[1P-60] ケージド相分離液滴の光応答挙動

*坂東 晃成¹、渡邊 和則¹、高原 茉莉¹、藤原 誠一¹、金崎 佑紀²、北松 瑞生²、大槻 高史¹ (1. 岡山大学、2. 近畿大学)

[1P-61] ペプチド固定化ビーズを用いた環境中の鉛イオンの簡便な検出

*吉田 秀平¹、吉田 光輝¹、鶴岡 孝章¹、臼井 健二¹ (1. 甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科)

[1P-62] 自己集合球状錯体への閉じ込めによるアミロイドβ疎水性断片の会合構造の NMR解析

*小野寺 悠太¹、中間 真寛¹、矢木 真穂²、藤田 大士³、加藤 晃一²、藤田 誠^{1,2,4} (1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 分子科学研究所、3. 京都大学iCeMS、4. 東京大学国際高等研究所)

[1P-63] 酵素耐性と細胞内移行性の向上を指向した二重架橋ヘリカルペプチドの開発

*安力川 哲也¹、千葉 順哉¹、大石 雄基¹、横山 悟¹、周 越¹、井上 将彦¹ (1. 富山大学院薬)

[1P-64] Dアミノ酸を利用した大環状ヘキサデカペプチドの合理構築

*照岡 大岳¹、吉沢 道人¹、澤田 知久^{1,2} (1. 東工大・化生研、2. JSTさがけ)

[1P-65] オリゴアルギニン付与により生じる細胞毒性を軽減する方法

*荒川 主真¹、加藤 舞子¹、井上 靖道¹、林 秀敏¹、久松 洋介¹、梅澤 直樹¹ (1. 名古屋市立大学大学院薬学研究科)

[1P-66] YKペプチド融合 sfGFPによる浸透圧応答的な細胞内液滴形成

*清水 雅俊¹、相田 卓三¹、三木 卓幸¹ (1. 東京大学大学院)

[1P-67] アミノ酸への置換基導入によるペプチドチオエステル合成の効率化とチオエステル形成反応機構の解析

*中村 元紀¹、中津 幸輝¹、林 剛介¹、村上 裕^{1,2} (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 名古屋大学ナノライフシステム研究所)

[1P-68] 分割インティンを用いた標的タンパク質結合ペプチドの探索

*信澤 佳奈¹、渡辺 雄太郎¹、高橋 剛¹ (1. 群馬大院理工)

[1P-69] 分割インティンを用いた特定のペプチド配列を認識するタンパク質の探索

*清水 もも花¹、信澤 佳奈¹、高橋 剛¹ (1. 群馬大院理工)

[1P-70] 分割インティンとルシフェラーゼを用いた脱糖鎖酵

素 ENGase活性を発光検出するプローブの開発

*相京 碧¹、高橋 諭²、石井 希実²、松尾 一郎²、吉田 雪子³、鈴木 匡⁴、高橋 剛² (1. 群馬大理工、2. 群馬大院理工、3. 東京都医総研、4. 理研)

[1P-71] ナノポアライブラリの構築および測定・解析手法の確立

*小林 もえ¹、仮屋 拓斗¹、栢森 史浩¹、彭 祖癸²、川村 出³、川野 竜司²、臼井 健二¹ (1. 甲南大FIRST、2. 東京農工大、3. 横浜国立大工)

[1P-72] 細胞認識部位含有ペプチドによる金ナノロッドによる金ナノロッドの修飾と疎水環境による抗ガン剤の担持性能評価

*山岡 湖ノ波¹、今井 崇人¹、浅野 晶弘¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)

[1P-73] 肝細胞ガン標的ペプチドで修飾した金ナノロッドによるフォトサーマル効果の検証

*藤本 翔也¹、今井 崇人¹、浅野 昌弘¹、山崎 正幸¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)

[1P-74] ジチロシン架橋によるレジリン様ポリペプチドの化学酵素合成

*寺田 佳世¹、武村 翔吾¹、辻 優依¹、土屋 康佑²、沼田 圭司^{1,3} (1. 京大院工、2. 東大院工、3. 理研)

[1P-75] MTS誘導体を用いたがん選択的なペプチドの合成と特性評価

*齋田 颯心¹、山崎 正幸¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)

[1P-76] 電気化学発光による脂質二分子膜に対する抗菌ペプチド作用の評価

*高橋 一吹¹、阿部 博弥^{2,1}、平本 薫³、伊野 浩介¹、平野 愛弓²、珠玖 仁¹ (1. 東北大学大学院工学研究科、2. 東北大学学祭科学フロンティア研究所、3. 東北大学電気通信研究所)

[1P-77] 赤血球ゴーストを反応場とした光水素生成反応の制御

*坂本 大芽¹、越山 友美¹ (1. 立命館大院生命科)

[1P-78] アジド修飾ヒアルロン酸を用いたダブルクリック架橋による細胞の凝集と遊走の促進

*佐藤 史也¹、Hernandez Alejandra¹、竹前 等²、稲垣 奈都子³、伊藤 大知³、寺 正行¹ (1. 東農工大院工、2. 東農工大院農、3. 東大院工)

[1P-79] ナノ構造脂質キャリアを用いた¹⁹F MRI造影剤の開発研究

*杉浦 志帆¹、山本 智也^{1,2}、菊地 和也^{1,2} (1. 大阪大学大学院工学研究科、2. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

[1P-80] 酸素非依存的に DNAを光分解する光増感剤の応用に関する研究

*正角 優吏¹、山崎 智彦²、川上 亘作²、百武 篤也¹ (1. 筑波大学理工情報生命学術院数理物質研究群、2. 物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター)

[1P-81] 抗原タンパク質修飾ペプチド集合体の表面電荷制御とワクチンアジュバントへの応用

*難波江 友紀¹、樋口 亜也斗¹、若林 里衣¹、神谷 典穂^{1,2}、後藤 雅宏^{1,2} (1. 九大院工、2. 未来化学創造センター)

[1P-82] ジピコリルアミン亜鉛錯体導入ポリチオフェンによる化学・物理刺激を利用した細胞質内 mRNA送達

*松本 彬¹、佐々木 由比^{1,2,3}、土屋 和彦¹、南 豪¹ (1. 東京大学生産技術研究所、2. 東京大学先端科学技術研究センター、3. JSTさきがけ)

[1P-83] 光誘導電荷分離分子搭載ナノディスクによる細胞膜電位の制御

*高木 勇杜¹、山田 りおん²、作田 絵里²、沼田 朋大³、村上 達也^{1,4} (1. 富山県立大学大学院工学研究科、2. 長崎大学大学院工学研究科、3. 秋田大学大学院医学系研究科、4. 京都大学物質—細胞統合システム拠点)

[1P-84] ラマン分光法を用いた *Saccharomyces cerevisiae* における nectriatide 誘導体の局在解析

*三宅 良介¹、安藤 正浩^{2,4}、小林 啓介³、供田 洋³、大城 太一³、竹山 春子^{1,2,4,5} (1. 早大院・先進理工、2. 早大ナノ・ライフ創新研、3. 北里大院・薬、4. 産総研・早大C BBD-OIL、5. 早大・生命動態研)

[1P-85] 簡便かつ迅速な Zn置換クロロフィル誘導体の調製方法の開発

*高嶋 泰帆¹、岡本 千奈²、百武 篤也²、仲里 正孝³、山本 泰彦²、小林 正美¹ (1. 筑波大学 物質工学域、2. 筑波大学 化学域、3. クロロフィル研究所)

[1P-86] 血小板が結合した血中循環がん細胞の3Dイメージング解析

*吉岡 岳士¹、後藤 紗也香¹、桶川 貴嗣²、出来 真弓²、田中 剛¹、吉野 知子¹ (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 杏林大学医学部)

[1P-87] 光増感色素固定化基板の作製と間葉系幹細胞への影響評価

*原 正之¹、森 英樹¹ (1. 大阪公立大学 大学院理学研究科 生物化学専攻)

[1P-88] 交流電場による細菌の Swarming運動促進効果

*小林 将陽¹、鮎澤 優希¹、山口 瑞稀¹、小山 純弘²、石川 陽一²、奈須野 恵理¹、加藤 紀弘¹ (1. 宇都宮大学地域創生科学研究科、2. エイブル株式会社)

[1P-89] 電子移動反応を駆使した可視光光解除性保護基の開発

*家田 直弥^{1,2}、中村 旭良²、館 実優²、富田 なつみ²、堀

田 祐志³、大久保 敬⁴、川口 充康²、中川 秀彦² (1. 北海道大学大学院薬学研究院、2. 名古屋市立大学大学院薬学研究科、3. 名古屋市立大学大学院医学研究科、4. 大阪大学先導的学際研究機構)

[1P-90] 副作用の低減と腫瘍特異的な高活性化を目指した二重特異性抗体の開発

加藤 有紀¹、*金津 尊¹、熊谷 泉¹、浅野 竜太郎¹ (1. 東京農工大学 工学府 生命工学専攻)

[1P-91] イソプレノイドを配位結合で捕捉するホスト分子の開発

*菅原 孝太郎¹、中村 貴志² (1. 筑波大学大学院数理物質科学研究群、2. 筑波大学数理物質系)

[1P-92] ミトコンドリアにおけるタンパク質合成を検出する蛍光プローブの開発

*炭谷 峻¹、佐々木 栄太¹、大野 久史¹、花岡 健二郎¹ (1. 慶應義塾大学大学院薬学研究科)

[1P-93] リン酸レセプターの分子認識における水素結合および水分子の役割

*高柳 駿斗¹、中畑 雅樹²、石井 良樹³、渡辺 豪^{3,4}、中村 貴志⁵ (1. 筑波大学大学院数理物質科学研究群、2. 大阪大学大学院理学研究科、3. 北里大学未来工学部、4. 神奈川県立産業技術総合研究所、5. 筑波大学数理物質系)

[1P-94] 金属連結ペプチド鎖による編み込みシートの構築と力学物性調査

*保母 竜太¹、吉沢 道人¹、澤田 知久^{1,2} (1. 東工大・化生研、2. JSTさきがけ)

[1P-95] がん幹細胞を特異的に可視化するデュアル応答性近赤外 turn-on型蛍光プローブの開発

*三木 康輝¹、三木 康嗣¹、麻植 雅裕¹、鈴木 叶瑛¹、Mu Huiying¹、湯川 博²、大江 浩一¹ (1. 京都大学大学院工学研究科、2. 名古屋大学未来社会創造機構)

[1P-96] meso-vinyl-BODIPYを用いるチオール類識別蛍光プローブの開発

*山元 紗代子¹、ムー ホイイン¹、三木 康嗣¹、大江 浩一¹ (1. 京都大学大学院工学研究科)

[1P-97] 二価鉄精密イメージングに向けた分子内イミントラップ戦略による *in situ* 鉄(II)イオンプローブ合成法

*河合 寛太¹、辻 美恵子¹、平山 祐¹ (1. 岐阜薬科大学)

[1P-98] ルミノール化学発光を利用したヒト赤血球の脆弱性評価

*中田 三智¹、湯川 修宏²、白上 努¹ (1. 宮崎大学工学部、2. 宮崎大学医学部)

[1P-99] 超偏極 MRI分子プローブ群を用いたアミノペプチダーゼ活性の生体内多重解析に基づくがん診断

*谷田部 浩行¹、齋藤 雄太郎¹、高草木 洋一^{2,3}、齋藤 圭太

²、山本 和俊⁴、Murali Krishna⁴、山東 信介¹ (1. 東大院工、2. 量子科学技術研究開発機構、3. 千葉大院理、4. 米国国立衛生研究所)

[1P-100] タンパク質の凝集過程解明に向けたアミロイド線維の超解像赤外吸収分光イメージング

*濱田 悠太¹、廣瀬 敏晃¹、道垣内 龍男²、建部 徹²、河田 陽一²、川田 善正¹、小野 篤史¹ (1. 静大院工、2. 浜松ホトニクス)

[1P-101] 大豆根粒菌のラマン分光解析を通じた大豆の窒素固定活性予測

*諏訪 駿之介^{1,2}、柏木 康熙¹、安藤 正浩^{2,3}、京谷 拓磨¹、長谷川 健人^{1,2}、Habibi Safiullah⁴、大津 直子⁴、竹山 春子^{1,2,3,5} (1. 早大院・先進理工、2. 産総研・早大C BBD-OIL、3. 早大ナノ・ライフ創研、4. 農工大院・農、5. 早大・先進生命動態研)

[1P-102] シュードノットアプタマーを用いたストレス検出バイオセンサ

*森田 葵¹、内田 里奈⁴、上島 理乃⁴、光永 靖²、鳥澤 真介²、小林 靖尚²、才木 常正³、高村 映一郎⁴、坂元 博昭⁴ (1. 福井大学工学部、2. 近畿大学、3. 兵庫県立工業技術センター、4. 福井大学大学院工学研究科)

[1P-103] 喉頭がんスマート監視を目的とした miRNA画像検査技術の構築

*柳原 愛瑠¹、渡辺 結衣⁴、神田 真穂⁴、中居 桃花⁴、荘 漢聲²、長谷川 達人⁴、坂元 知里³、高村 映一郎⁴、坂元 博昭⁴ (1. 福井大学工学部、2. 国立成功大学、3. 福井工業高等専門学校、4. 福井大学大学院工学研究科)

[1P-104] DNAアプタマー標識ビーズの蛍光イメージングに基づく多成分生体分子検出

*三尾 玲緒斗¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学大学院理工学研究科)

[1P-105] ヒト腸管モデルにおけるアルカリホス

ファターゼ活性の定量評価に向けた多孔膜電極デバイス

*谷 和佳奈¹、宇田川 喜信¹、阿部 博弥^{1,2}、伊野 浩介¹、珠玖 仁¹ (1. 東北大学大学院工学研究科、2. 東北大学学際科学フロンティア研究所)

[1P-106] システイン付加型人工インスリンレセプタによるインスリンのEIS測定

*野原 一真¹、佐藤 嘉哉²、有田 栄次²、矢口 喜明²、池田 丈¹、石田 丈典¹、廣田 隆一¹、黒田 章夫¹、舟橋 久影¹ (1. 広島大学、2. テルモ株式会社)

[1P-107] ヒト直交性のあるキシロシダーゼを増感酵素とする沈着型蛍光性基質の開発

*黒田 晃大¹、古賀 朗寛¹、宮崎 祐之¹、金子 諒右²、新居 輝樹²、岸村 顕広^{2,3}、森 健²、片山 佳樹^{2,3} (1. 九州

大学大学院システム生命科学府、2. 九州大学大学院工学
研究院、3. 九州大学分子システム科学センター)

[1P-108] 「ヒト直交性酵素」を用いた微小液滴内での抗原
タンパク質の超高感度検出

*加隈 綾晟¹、金子 諒右²、古賀 朗寛¹、藤村 祐³、新居
輝樹²、岸村 顕広²、森 健²、片山 佳樹² (1. 九州大学大
学院システム生命科学府、2. 九州大学大学院工学研究
院、3. 株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ)

[1P-109] DNA-nano-tweezersバイオセンシング分子スプ
レー法による固体表面上の標的核酸直接検出

*重松 怜志¹、波多野 浩也¹、石田 丈典¹、池田 丈¹、廣
田 隆一¹、黒田 章夫¹、舟橋 久景¹ (1. 広島大学大学院
統合生命科学研究科)

ポスター発表 | 1P-01~1P-109

ポスター発表

2024年9月12日(木) 13:20 ~ 15:00 ポスター会場 (多目的ホール)

- [1P-01] SARS-CoV-2感染細胞内における3CLプロテアーゼの活性制御・局在解明を目指した Activity-based probeの開発
*山内 勇輝¹、今野 翔²、大村 紀子¹、吉岡 成美²、Hingst Alexandra³、Gütschow Michael³、Müller Christa³、田口 晃弘²、谷口 敦彦²、川口 敦史⁴、林 良雄^{2,5} (1. 東京薬科大学 薬学研究科、2. 東京薬科大学 薬学部、3. University of Bonn、4. 筑波大学 医学医療系、5. 東京薬科大学 生命科学部)
- [1P-02] eDHFRタグを基本骨格とする化学遺伝学 Ca^{2+} センサーのタンパク質工学的改変
*迫井 謙良¹、寺井 琢也¹、Robert Campbell¹ (1. 東大院理)
- [1P-03] ジスルフィド結合含有蛋白質のフォールディング反応中間体の検出
*阪田 菜奈¹、村上 友梨¹、芦田 織歌¹、廣嶋 杏菜¹、宮澤 光博²、島本 茂¹、日高 雄二¹ (1. 近畿大学大学院総合理工学研究科、2. (株)プリベンテック)
- [1P-04] 全原子分子動力学計算によるファイバータンパク質 AtaAの構成ドメインの力学特性解析
*笹原 純¹、逸見 奎太¹、吉本 将悟¹、堀 克敏¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科)
- [1P-05] FAD/ThDP依存性酵素の反応性を拡張した非生物学的光ラジカルアシル化反応の開発
*足立 柚斗¹、藤沢 修斗¹、加藤 俊介¹、林 高史¹ (1. 大阪大学大学院工学研究科)
- [1P-06] シトクロム P450BM3による非天然基質の酸化を促進するジカルボン酸導入デコイ分子の開発
*石上 恵¹、有安 真也¹、笠井 千枝¹、愛場 雄一郎¹、杉本 宏²、荘司 長三¹ (1. 名古屋大学大学院理学研究科、2. 理研SPRING-8)
- [1P-07] Development of Fluorescent Probes for Detection of Protein-protein Interaction Using a Reversible Labeling System
*Jiatong Li¹、Masafumi Minoshima¹、Kazuya Kikuchi^{1,2} (1. Graduate School of Engineering, Osaka University、2. Immunology Frontier Research Center, Osaka University)
- [1P-08] 野生型と一残基変異型サブユニットからなる二量体がん関連酵素の高純度精製方法の確立
*松本 夏弥¹、韓 叡佳¹、岡 智将¹、石場 智彬²、加藤 かざし²、原田 彩佳²、岩崎 憲治^{2,3} (1. 筑波大学理工情報生命学院数理物質科学研究学群化学プログラム、2. 筑波大学生存ダイナミクスセンター、3. 筑波大学量子情報生命科学研究センター)
- [1P-09] 細胞内局所の粘度計測を可能にする FRET型粘性感受性蛍光プローブの開発
*笠井 柊杜¹、佐々木 栄太^{1,2}、榛葉 満理奈²、森 貴裕³、阿部 郁朗³、花岡 健二郎^{1,2} (1. 慶應義塾大学大学院薬学研究科、2. 慶應義塾大学薬学部、3. 東京大学大学院薬学系研究科)
- [1P-10] 蛍光イメージングのための世界最小モノボディタグの創製
*宮崎 友輝¹、梅本 駿²、都築 成晃²、深谷 菜摘¹、キム チュン²、吉井 達之¹、吉川 優¹、藤野 公茂²、林 剛介²、村上 裕^{2,3}、築地 真也¹ (1. 名工大院・工、2. 名大院・工、3. 名大未来ナノ)
- [1P-11] SLIPT-PMを用いた上皮成長因子受容体 (EGFR) の化学遺伝学活性操作
*大平 修也¹、田原 海¹、吉川 優¹、築地 真也¹ (1. 名工大院・工)
- [1P-12] 翻訳後切断を指向した DNA結合タンパク質 Repの改変
*村山 瑞季¹、西田 慶¹、小島 英理¹、三重 正和¹ (1. 東京工業大学生物理工学院)

- [1P-13] Refolding Large Denatured Proteins by 2D Assembled GroEL Immobilized on Silica Surface
*Tonmoy Ray¹, Takayuki Miki¹, Hideki Taguchi², Tatsuya Niwa², Takuzo Aida^{1,3} (1. The University of Tokyo, 2. Tokyo Institute of Technology, Suzukakedai, 3. Center for Emergent Matter Science, RIKEN)
- [1P-14] 寛容にタンパク質を認識するチオール化合物の酸化的フォールディングの促進効果
*鈴木 洸希¹、野尻 涼矢¹、齋尾 智英²、奥村 正樹³、村岡 貴博^{1,4} (1. 東京農工大学 大学院工学府、2. 徳島大学 先端酵素学研究所、3. 東北大学 学際科学フロンティア研究所、4. 神奈川県立産業技術総合研究所)
- [1P-15] 抗 CLIC1モノクローナル抗体の結合特性とがん浸潤抑制効果
*今井 翔月^{1,2}、Mukherjee Samrat^{2,3}、飯嶋 益巳⁴、山岸 彩奈^{1,2,3}、中村 史^{1,2,3} (1. 東京農工大学工学部、2. 産業総合研究所細胞分子工学、3. 東京農工大学大学院工学研究院、4. 東京農業大学応用生物学部)
- [1P-16] 生体直交反応による光薬理学リガンドのタンパク質内合成を基盤とした機能化 DNA encoded libraryへの展開
*瀬川 友香¹、藤原 壮汰²、松尾 和哉³、和久 友則³、小堀 哲生³ (1. 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科、2. 京都工芸繊維大学工芸科学部、3. 京都工芸繊維大学分子化学系)
- [1P-17] 高濃度条件下で酸化的タンパク質フォールディングを促進する超分子材料の開発とその作用機序の理解
*喜多村 真衣¹、村岡 貴博^{1,2} (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 神奈川県立産業技術総合研究所)
- [1P-18] Development of covalent monobody-tag based on proximity-induced reactivity
*CHUNG KIM NGUYEN¹, Tomoki MIYAZAKI³, Shinya TSUKIJI³, Tomoshige FUJINO¹, Gosuke HAYASHI¹, Hiroshi MURAKAMI^{1,2} (1. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University, 3. Department of Life Science and Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology)
- [1P-19] 細菌細胞表層ファイバータンパク質のメチル化修飾
*井上 翔理¹、吉本 将悟¹、堀 克敏¹ (1. 名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻)
- [1P-20] 外的刺激による pH応答性伸縮タンパク質集合体の運動制御
*鱒村 颯太¹、伊達 弘貴¹、Thuc Toan Pham¹、Xin Li¹、菊池 幸祐¹、上野 隆史¹ (1. 東京工業大学 生命理工学院)
- [1P-21] ジャスモン酸関連主要転写因子 MYCに対する選択的低分子阻害剤の開発
*劉 瑞琦¹、三野 光識²、出井 晶子²、吉田 稔²、上田 実^{1,3}、高岡 洋輔¹ (1. 東北大学理科学研究科、2. 理研 環境資源科学研究センター、3. 東北大学生命科学研究科)
- [1P-22] 合成分子による GLUT4の膜動態の操作
*御手洗 拓真¹、足立 惇弥¹、矢野 君晟²、真鍋 良幸²、堀 雄一郎¹ (1. 九州大学大学院理学院、2. 大阪大学大学院理科学研究科)
- [1P-23] 抗原結合に応答して活性が回復する activatable型レポーター酵素の開発
*木地 陸揮¹、小嶋 良輔²、王子儀²、橘 棕¹、清家 直樹¹、浦野 泰照^{1,2} (1. 東京大学 大学院薬学研究科、2. 東京大学 大学院医学系研究科)
- [1P-24] β酸化活性を指標とした代謝フェノタイプスクリーニング
*Yin Ruikang¹、井上 和哉、井上 咲季¹、Xiao Xiwen¹、内之宮 祥平¹、王子田 彰夫¹ (1. 九州大学 薬学府)

- [1P-25] バイオセンシング素子の簡便な構築に向けた DNA-タンパク質間を均一かつ効率的に連結可能なツールの開発
小宮 英里香¹、*中島 美月²、三浦 大明¹、塚越 かおり¹、津川 若子¹、早出 広司³、池袋 一典¹、浅野 竜太郎¹ (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 東京農工大学工学部、3. ノースカロライナ大学チャペルヒル校・ノースカロライナ州立大学)
- [1P-26] 近接効果を利用した新規架橋酵素融合タンパク質による部位特異的な抗体フラグメント修飾
*室園 晃輝¹、西岡 莉子¹、内田 和希¹、川口 喜郎¹、木村 道夫¹、神谷 典穂^{1,2} (1. 九州大学大学院工学府、2. 九州大学 未来化学創造センター)
- [1P-27] リボソームディスプレイ法を用いたアデノシン A2A受容体の指向性進化
*深澤 元喜¹、松岡 佑真²、堂浦 智裕²、清中 茂樹²、松浦 友亮³ (1. 東京工業大学 生命理工学院、2. 名古屋大学 生命分子工学専攻、3. 東京工業大学 地球生命研究所)
- [1P-28] マグネトソーム膜上の脂質組成調節による膜受容体の機能解析
*小林 茉優香¹、巴 瞭斗¹、田山 爽也華¹、藤本 一嗣¹、田中 剛¹、吉野 知子¹ (1. 東京農工大学大学院工学府)
- [1P-29] 分岐構造にコードされた機能の抽出を可能とする光架橋型不均一ユビキチン鎖プローブ
*宇野 大輝¹、豊田 宇咲乃¹、古畑 隆史¹、富田 拓哉²、佐藤 裕介^{3,4}、尾勝 圭⁵、深井 周也⁵、佐伯 泰²、岡本 晃充¹ (1. 東京大学 工学系研究科、2. 東京大学 医科学研究所、3. 鳥取大学 工学系研究科、4. 鳥取大学 GSCセンター、5. 京都大学 工学系研究科)
- [1P-30] *Megavirinae Giant Virus*由来のタンパク質 GciSが持つ新規な6核鉄硫黄クラスタの構造と機能
*谷 歩峻¹、野尻 正樹¹ (1. 大阪大学大学院理学研究科)
- [1P-31] 相同組換え誘導が可能な Cas9変異体取得法の開発
*松本 大亮^{1,2}、久保田 小茉莉²、Ahmadi Shahram¹、濁川 清美^{1,2}、野村 渉^{1,2} (1. 広島大学大学院医系科学研究科、2. 広島大学薬学部)
- [1P-32] Design of Cyborg Proteins by Loop Region Replacement With Oligo(ethylene glycol)
*Wijak Yospanya^{1,2}, Akari Matsumura³, Yukihiro Imasato¹, Tomoyuki Itou⁴, Yusuke Aoki¹, Hikaru Nakazawa⁴, Takashi Matsui³, Takeshi Yokoyama³, Mihoko Ui⁵, Mitsuo Umetsu⁴, Satoru Nagatoishi^{6,7}, Kouhei Tsumoto^{6,7,8}, Yoshikazu Tanaka³, Kazushi Kinbara^{1,9} (1. School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology, 2. AIMR, Tohoku University, 3. Graduate School of Life Science, Tohoku University, 4. Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University, 5. IMRAM, Tohoku University, 6. Medical Device Development and Regulation Research Center, School of Engineering, The University of Tokyo, 7. Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 8. Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 9. Living Systems Materialogy Research Group, IRFI, Tokyo Institute of Technology)
- [1P-33] 細胞骨格様 2 成分蛋白質チューブの創生
*野地 真広^{1,2,3}、杉田 征彦^{4,5,6}、山崎 陽祐^{7,8}、宮崎 牧人^{6,7,8,9,10}、鈴木 雄太^{3,6,9} (1. 日本学術振興会 特別研究員、2. 京都大学大学院人間・環境学研究科、3. 京都大学高等研究院物質－細胞統合システム拠点、4. 京都大学医生物学研究所、5. 京都大学大学院生命科学研究科、6. 京都大学白眉センター、7. 京都大学大学院理学研究科、8. 理化学研究所生命機能科学研究センター、9. 科学技術振興機構さきがけ研究者、10. 信州大学大学院総合医理工学研究科)

- [1P-34] エピジェネティックスタンパク質を分解誘導する EpiTAC技術の開発
*安田 壮秀¹、森廣 邦彦¹、岡本 晃充¹ (1. 東京大学工学系研究科化学生命工学専攻)
- [1P-35] 抗菌ペプチド天然物アシルデプシペプチド 1 (ADEP1) による細菌プロテアーゼ ClpP の機能発現機構の解明および ADEP1 の構造活性相関研究
*石川 文洋¹、高橋 幹士²、正林 直人¹、秋永 修佑¹、本間 道夫³、内橋 貴之²、田邊 元三¹ (1. 近畿大学薬学部、2. 名大院理、3. 名大院工)
- [1P-36] タンパク質化学修飾を指向した生理条件でのナイトレン発生法の開発研究
*豊島 暖生¹、笠原 彰友²、山次 健三² (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究院)
- [1P-37] ウミホタルルシフェリンに対する SARS-CoV-2スパイクタンパク質の擬似ルシフェラーゼ活性
*西原 諒^{1,2}、Dokainish Hisham^{3,4}、木原 良樹^{1,5}、杉田 有治^{4,6,7}、栗田 僚二^{1,5} (1. 産業技術総合研究所健康医工学研究部門、2. JST さきがけ、3. 北海道大学大学院薬学研究院、4. 理化学研究所開拓研究本部、5. 筑波大学院数理物質科学研究群、6. 理化学研究所生命機能科学研究センター、7. 理化学研究所計算科学研究センター)
- [1P-38] 人工細胞膜上で二量化可能な膜貫通人工核酸三重鎖の開発
*劉 凱夫¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科)
- [1P-39] 光架橋性新規修飾塩基導入 SNAの合成と SNA/RNA二重鎖の光制御
*池田 彩華¹、佐藤 史経¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹ (1. 名古屋大学工学研究科)
- [1P-40] リポソームで区画化された酵素代謝反応システム
*小松原 風汰^{1,2}、中田 栄司¹、Lin Peng¹、森井 孝^{1,3} (1. 京都大学エネルギー理工学研究所、2. 京都大学エネルギー科学研究科、3. 京都光華女子大学健康科学部)
- [1P-41] DNA-Encoded Libraryにおける化学反応条件の拡張とリガンドの高純度・高収率を担保した合成サイクルの増加を実現可能とする化学合成型 DNAバーコード
*白川 真純¹、植木 亮介¹、森本 淳平¹、山東 信介¹ (1. 東京大学大学院工学系研究科)
- [1P-42] 構造化したループ領域をもつグアニン四重らせん構造の液液相分離
*小坂 直暉¹、中田 実紀¹、鶴田 充生¹、川内 敬子¹、三好 大輔¹ (1. 甲南大学)
- [1P-43] 2種類の短鎖 DNAをビルディングブロックとした DNA集合体の形態制御
*牧野 哲直¹、田仲 真紀子¹ (1. 電通大院情報理工)
- [1P-44] グアニン四重鎖結合タンパク質の分解を志向した G4-PROTACリガンドの開発
*野原 玲奈¹、棚谷 優磨¹、長澤 和夫¹、寺 正行¹ (1. 東農工大院工)
- [1P-45] ¹⁹F標識オリゴデオキシヌクレオチドを用いた¹⁹F NMRによる標的 miRNAの検出
*飛田 祐希¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学大学院理工学研究科)
- [1P-46] 電位差計測で DNA検出を行うための溶液条件の検討
*猪狩 雅徳¹、古澤 宏幸^{1,2} (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)
- [1P-47] アゾラト架橋白金二核錯体の一本鎖 DNA液滴形成能と核酸結合様式
*山田 拓磨¹、田代 竜²、植村 雅子^{1,2}、箕浦 克彦³、米田 誠治^{1,2} (1. 鈴鹿医療科学大学大学院薬学研究科、2. 鈴鹿医療科学大学薬学部、3. 大阪医科薬科大学薬学部)
- [1P-48] 人工基質 RNAを用いた ADAR2の RNA編集基質認識特性の解析
*嶋津 尚輝¹、島内 駿¹、緒方 悠岐¹、福田 将虎^{1,2} (1. 福岡大学大学院理学研究科、2. 福岡大学理学部化学科)

- [1P-49] 天然核酸塩基対 A/T と G/C のサイズを模倣したアルキニル C-ヌクレオチド二重鎖の開発
*山本 こみち¹、千葉 順哉¹、大石 雄基¹、井上 将彦¹ (1. 富山大・院薬)
- [1P-50] RNase Hを標的としたスプリットアプタマーの開発と検出系の構築
*成田 侑生¹ (1. 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科機能物質化学専攻)
- [1P-51] 1細胞内の転写活性を時系列に計測する、新生 RNAラベルシーケンス法
*馬場 峻^{1,2}、河崎 史子¹、森本 淳平³、山東 信介³、泊 幸秀¹ (1. 東京大学 定量生命科学研究所、2. 東京大学 新領域創成科学研究科、3. 東京大学 工学系研究科 化学生命工学専攻/バイオエンジニアリング専攻)
- [1P-52] 3' UTRを標的とした RNA hackingによるハプロ不全関連遺伝子の発現量増加
*五木 結愛¹、勝田 陽介^{1,2}、佐藤 慎一^{1,2}、北村 裕介¹、井原 敏博¹ (1. 熊本大学先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio)
- [1P-53] RNA hacking技術を基盤とした DNA Polymeraseのスリップ現象制御
*嘉藤 美来¹、勝田 陽介^{1,2}、北村 裕介¹、佐藤 慎一^{1,2}、井原 敏博¹ (1. 熊本大学大学院先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio)
- [1P-54] 蛍光色素導入 SNAらせん増幅系の評価
*杉山 乙珠¹、浅沼 浩之¹、樫田 啓¹ (1. 名古屋大学工学研究科)
- [1P-55] 高モジュール性・高活性の自己切断型アプタザイムを基盤とした真核系無細胞リボスイッチ
*藤川 真広¹、大西 和希¹、高橋 萌¹、小川 敦司¹ (1. 愛媛大プロテオサイエンスセンター)
- [1P-56] 速度論的機構で IRES媒介翻訳を制御する真核リボスイッチの構築
*高橋 萌¹、藤川 真広¹、小川 敦司¹ (1. 愛媛大プロテオサイエンスセンター)
- [1P-57] 金属錯体形成によるヒドロキシウラシル-アデニン塩基対の不安定化を利用した DNAナノチューブの形成制御
*竹澤 悠典¹、大西 雄登¹、森 圭太¹、塩谷 光彦^{1,2} (1. 東京大学大学院理学系研究科、2. 東京理科大学研究推進機構総合研究院)
- [1P-58] 人工塩基導入 PNA配列解析法の開発
*稲垣 和真¹、愛場 雄一郎²、荘司 長三²、浅沼 浩之¹、樫田 啓¹ (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 名古屋大学大学院理学研究科)
- [1P-59] 二重鎖形成を利用した非環状型人工核酸 SNAの配列解析
*日比野 希美¹、浅沼 浩之¹、樫田 啓¹ (1. 名大院工)
- [1P-60] ケージド相分離液滴の光応答挙動
*坂東 晃成¹、渡邊 和則¹、高原 茉莉¹、藤原 誠一¹、金崎 佑紀²、北松 瑞生²、大槻 高史¹ (1. 岡山大学、2. 近畿大学)
- [1P-61] ペプチド固定化ビーズを用いた環境中の鉛イオンの簡便な検出
*吉田 秀平¹、吉田 光輝¹、鶴岡 孝章¹、臼井 健二¹ (1. 甲南大学大学院フロンティアサイエンス研究科)
- [1P-62] 自己集合球状錯体への閉じ込めによるアミロイドβ疎水性断片の会合構造のNMR解析
*小野寺 悠太¹、中間 貴寛¹、矢木 真穂²、藤田 大士³、加藤 晃一²、藤田 誠^{1,2,4} (1. 東京大学大学院工学系研究科、2. 分子科学研究所、3. 京都大学iCeMS、4. 東京大学国際高等研究所)
- [1P-63] 酵素耐性と細胞内移行性の向上を指向した二重架橋ヘリカルペプチドの開発
*安力川 哲也¹、千葉 順哉¹、大石 雄基¹、横山 悟¹、周 越¹、井上 将彦¹ (1. 富山大学院薬)
- [1P-64] Dアミノ酸を利用した大環状ヘキサデカペプチドの合理構築
*照岡 大岳¹、吉沢 道人¹、澤田 知久^{1,2} (1. 東工大・化生研、2. JSTさきがけ)

- [1P-65] オリゴアルギニン付与により生じる細胞毒性を軽減する方法
*荒川 主真¹、加藤 舞子¹、井上 靖道¹、林 秀敏¹、久松 洋介¹、梅澤 直樹¹ (1. 名古屋市立大学大学院薬学研究科)
- [1P-66] YKペプチド融合 sfGFPによる浸透圧応答的な細胞内液滴形成
*清水 雅俊¹、相田 卓三¹、三木 卓幸¹ (1. 東京大学大学院)
- [1P-67] アミノ酸への置換基導入によるペプチドチオエステル合成の効率化とチオエステル形成反応機構の解析
*中村 元紀¹、中津 幸輝¹、林 剛介¹、村上 裕^{1,2} (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 名古屋大学ナノライフシステム研究所)
- [1P-68] 分割インテインを用いた標的タンパク質結合ペプチドの探索
*信澤 佳奈¹、渡辺 雄太郎¹、高橋 剛¹ (1. 群馬大院理工)
- [1P-69] 分割インテインを用いた特定のペプチド配列を認識するタンパク質の探索
*清水 もも花¹、信澤 佳奈¹、高橋 剛¹ (1. 群馬大院理工)
- [1P-70] 分割インテインとルシフェラーゼを用いた脱糖鎖酵素 ENGase活性を発光検出するプローブの開発
*相京 碧¹、高橋 諭²、石井 希実²、松尾 一郎²、吉田 雪子³、鈴木 匡⁴、高橋 剛² (1. 群馬大理工、2. 群馬大院理工、3. 東京都医総研、4. 理研)
- [1P-71] ナノポアライブラリの構築および測定・解析手法の確立
*小林 もえ¹、仮屋 拓斗¹、栢森 史浩¹、彭 祖癸²、川村 出³、川野 竜司²、白井 健二¹ (1. 甲南大 FIRST、2. 東京農工大工、3. 横浜国立大工)
- [1P-72] 細胞認識部位含有ペプチドによる金ナノロッドによる金ナノロッドの修飾と疎水環境による抗ガン剤の担持性能評価
*山岡 湖ノ波¹、今井 崇人¹、浅野 晶弘¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)
- [1P-73] 肝細胞ガン標的ペプチドで修飾した金ナノロッドによるフォトサーマル効果の検証
*藤本 翔也¹、今井 崇人¹、浅野 昌弘¹、山崎 正幸¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)
- [1P-74] ジチロシン架橋によるレジリン様ポリペプチドの化学酵素合成
*寺田 佳世¹、武村 翔吾¹、辻 優依¹、土屋 康佑²、沼田 圭司^{1,3} (1. 京大院工、2. 東大院工、3. 理研)
- [1P-75] MTS誘導体を用いたがん選択的なペプチドの合成と特性評価
*齋田 颯心¹、山崎 正幸¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)
- [1P-76] 電気化学発光による脂質二分子膜に対する抗菌ペプチド作用の評価
*高橋 一吹¹、阿部 博弥^{2,1}、平本 薫³、伊野 浩介¹、平野 愛弓²、珠玖 仁¹ (1. 東北大学大学院工学研究科、2. 東北大学学祭科学フロンティア研究所、3. 東北大学電気通信研究所)
- [1P-77] 赤血球ゴーストを反応場とした光水素生成反応の制御
*坂本 大芽¹、越山 友美¹ (1. 立命館大院生命科)
- [1P-78] アジド修飾ヒアルロン酸を用いたダブルクリック架橋による細胞の凝集と遊走の促進
*佐藤 史也¹、Hernandez Alejandra¹、竹前 等²、稲垣 奈都子³、伊藤 大知³、寺 正行¹ (1. 東農工大院工、2. 東農工大院農、3. 東大院工)
- [1P-79] ナノ構造脂質キャリアを用いた¹⁹F MRI造影剤の開発研究
*杉浦 志帆¹、山本 智也^{1,2}、菊地 和也^{1,2} (1. 大阪大学大学院工学研究科、2. 大阪大学免疫学フロンティア研究センター)
- [1P-80] 酸素非依存的に DNAを光分解する光増感剤の応用に関する研究
*正角 優吏¹、山崎 智彦²、川上 亘作²、百武 篤也¹ (1. 筑波大学理工情報生命学術院数理物質研究

群、2. 物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター)

[1P-81] 抗原タンパク質修飾ペプチド集合体の表面電荷制御とワクチンアジュバントへの応用

*難波江 友紀¹、樋口 亜也斗¹、若林 里衣¹、神谷 典穂^{1,2}、後藤 雅宏^{1,2} (1. 九大院工、2. 未来化学創造センター)

[1P-82] ジピコリルアミン亜鉛錯体導入ポリチオフェンによる化学・物理刺激を利用した細胞質内 mRNA 送達

*松本 彬¹、佐々木 由比^{1,2,3}、土屋 和彦¹、南 豪¹ (1. 東京大学生産技術研究所、2. 東京大学先端科学技術研究センター、3. JST さきがけ)

[1P-83] 光誘導電荷分離分子搭載ナノディスクによる細胞膜電位の制御

*高木 勇杜¹、山田 りおん²、作田 絵里²、沼田 朋大³、村上 達也^{1,4} (1. 富山県立大学大学院工学研究科、2. 長崎大学大学院工学研究科、3. 秋田大学大学院医学系研究科、4. 京都大学物質—細胞統合システム拠点)

[1P-84] ラマン分光法を用いた *Saccharomyces cerevisiae* における nectriatide 誘導体の局在解析

*三宅 良介¹、安藤 正浩^{2,4}、小林 啓介³、供田 洋³、大城 太一³、竹山 春子^{1,2,4,5} (1. 早大院・先進理工、2. 早大ナノ・ライフ創新研、3. 北里大院・薬、4. 産総研・早大CBBD-OIL、5. 早大・生命動態研)

[1P-85] 簡便かつ迅速な Zn 置換クロロフィル誘導体の調製方法の開発

*高嶋 泰帆¹、岡本 千奈²、百武 篤也²、仲里 正孝³、山本 泰彦²、小林 正美¹ (1. 筑波大学 物質工学域、2. 筑波大学 化学域、3. クロロフィル研究所)

[1P-86] 血小板が結合した血中循環がん細胞の3Dイメージング解析

*吉岡 岳士¹、後藤 紗也香¹、桶川 貴嗣²、出来 真弓²、田中 剛¹、吉野 知子¹ (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 杏林大学医学部)

[1P-87] 光増感色素固定化基板の作製と間葉系幹細胞への影響評価

*原 正之¹、森 英樹¹ (1. 大阪公立大学 大学院理学研究科 生物化学専攻)

[1P-88] 交流電場による細菌の Swarming 運動促進効果

*小林 将陽¹、鮎澤 優希¹、山口 瑞稀¹、小山 純弘²、石川 陽一²、奈須野 恵理¹、加藤 紀弘¹ (1. 宇都宮大学地域創生科学研究科、2. エイブル株式会社)

[1P-89] 電子移動反応を駆使した可視光光解除性保護基の開発

*家田 直弥^{1,2}、中村 旭良²、舘 実優²、富田 なつみ²、堀田 祐志³、大久保 敬⁴、川口 充康²、中川 秀彦² (1. 北海道大学大学院薬学研究院、2. 名古屋市立大学大学院薬学研究科、3. 名古屋市立大学大学院医学研究科、4. 大阪大学先導的学際研究機構)

[1P-90] 副作用の低減と腫瘍特異的な高活性化を目指した二重特異性抗体の開発

加藤 有紀¹、*金津 尊¹、熊谷 泉¹、浅野 竜太郎¹ (1. 東京農工大学 工学府 生命工学専攻)

[1P-91] イソプレノイドを配位結合で捕捉するホスト分子の開発

*菅原 孝太郎¹、中村 貴志² (1. 筑波大学大学院数理物質科学研究群、2. 筑波大学数理物質系)

[1P-92] ミトコンドリアにおけるタンパク質合成を検出する

蛍光プローブの開発

*炭谷 峻¹、佐々木 栄太¹、大野 久史¹、花岡 健二郎¹ (1. 慶應義塾大学大学院薬学研究科)

[1P-93] リン酸レセプターの分子認識における水素結合および水分子の役割

*高柳 駿斗¹、中畑 雅樹²、石井 良樹³、渡辺 豪^{3,4}、中村 貴志⁵ (1. 筑波大学大学院数理物質科学研究群、2. 大阪大学大学院理学研究科、3. 北里大学未来工学部、4. 神奈川県立産業技術総合研究所、5. 筑波大学数理物質系)

- [1P-94] 金属連結ペプチド鎖による編み込みシートの構築と力学物性調査
*保母 竜太¹、吉沢 道人¹、澤田 知久^{1,2} (1. 東工大・化生研、2. JSTさきがけ)
- [1P-95] がん幹細胞を特異的に可視化するデュアル応答性近赤外 turn-on型蛍光プローブの開発
*三木 康輝¹、三木 康嗣¹、麻植 雅裕¹、鈴木 叶瑛¹、Mu Huiying¹、湯川 博²、大江 浩一¹ (1. 京都大学大学院工学研究科、2. 名古屋大学未来社会創造機構)
- [1P-96] meso-vinyl-BODIPYを用いるチオール類識別蛍光プローブの開発
*山元 紗代子¹、ムー ホイイン¹、三木 康嗣¹、大江 浩一¹ (1. 京都大学大学院工学研究科)
- [1P-97] 二価鉄精密イメージングに向けた分子内イミントラップ戦略による *in situ* 鉄(II)イオンプローブ合成法
*河合 寛太¹、辻 美恵子¹、平山 祐¹ (1. 岐阜薬科大学)
- [1P-98] ルミノール化学発光を利用したヒト赤血球の脆弱性評価
*中田 三智¹、湯川 修宏²、白上 努¹ (1. 宮崎大学工学部、2. 宮崎大学医学部)
- [1P-99] 超偏極 MRI分子プローブ群を用いたアミノペプチダーゼ活性の生体内多重解析に基づくがん診断
*谷田部 浩行¹、齋藤 雄太郎¹、高草木 洋一^{2,3}、齋藤 圭太²、山本 和俊⁴、Murali Krishna⁴、山東 信介¹ (1. 東大院工、2. 量子科学技術研究開発機構、3. 千葉大院理、4. 米国国立衛生研究所)
- [1P-100] タンパク質の凝集過程解明に向けたアミロイド線維の超解像赤外吸収分光イメージング
*濱田 悠太¹、廣瀬 敏晃¹、道垣内 龍男²、建部 徹²、河田 陽一²、川田 善正¹、小野 篤史¹ (1. 静大院工、2. 浜松ホトニクス)
- [1P-101] 大豆根粒菌のラマン分光解析を通じた大豆の窒素固定活性予測
*諏訪 駿之介^{1,2}、柏木 康熙¹、安藤 正浩^{2,3}、京谷 拓磨¹、長谷川 健人^{1,2}、Habibi Safiullah⁴、大津 直子⁴、竹山 春子^{1,2,3,5} (1. 早大院・先進理工、2. 産総研・早大CBBDOIL、3. 早大ナノ・ライフ創研、4. 農工大院・農、5. 早大・先進生命動態研)
- [1P-102] シュードノットアプタマーを用いたストレス検出バイオセンサ
*森田 葵¹、内田 里奈⁴、上島 理乃⁴、光永 靖²、鳥澤 真介²、小林 靖尚²、才木 常正³、高村 映一郎⁴、坂元 博昭⁴ (1. 福井大学工学部、2. 近畿大学、3. 兵庫県立工業技術センター、4. 福井大学大学院工学研究科)
- [1P-103] 喉頭がんスマート監視を目的とした miRNA画像検査技術の構築
*柳原 愛璃¹、渡辺 結衣⁴、神田 真穂⁴、中居 桃花⁴、荘 漢聲²、長谷川 達人⁴、坂元 知里³、高村 映一郎⁴、坂元 博昭⁴ (1. 福井大学工学部、2. 国立成功大学、3. 福井工業高等専門学校、4. 福井大学大学院工学研究科)
- [1P-104] DNAアプタマー標識ビーズの蛍光イメージングに基づく多成分生体分子検出
*三尾 玲緒斗¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学大学院理工学研究科)
- [1P-105] ヒト腸管モデルにおけるアルカリホスファターゼ活性の定量評価に向けた多孔膜電極デバイス
*谷 和佳奈¹、宇田川 喜信¹、阿部 博弥^{1,2}、伊野 浩介¹、珠玖 仁¹ (1. 東北大学大学院工学研究科、2. 東北大学学際科学フロンティア研究所)
- [1P-106] システイン付加型人工インスリンレセプタによるインスリンのEIS測定
*野原 一真¹、佐藤 嘉哉²、有田 栄次²、矢口 喜明²、池田 丈¹、石田 丈典¹、廣田 隆一¹、黒田 章夫¹、舟橋 久影¹ (1. 広島大学、2. テルモ株式会社)
- [1P-107] ヒト直交性のあるキシロシダーゼを増感酵素とする沈着型蛍光性基質の開発
*黒田 晃大¹、古賀 朗寛¹、宮崎 祐之¹、金子 諒右²、新居 輝樹²、岸村 顕広^{2,3}、森 健²、片山 佳樹^{2,3} (1. 九州大学大学院システム生命科学府、2. 九州大学大学院工学研究院、3. 九州大学分子システム

科学センター)

[1P-108] 「ヒト直交性酵素」を用いた微小液滴内での抗原タンパク質の超高感度検出

*加隈 綾晟¹、金子 諒右²、古賀 朗寛¹、藤村 祐³、新居 輝樹²、岸村 顕広²、森 健²、片山 佳樹² (1. 九州大学大学院システム生命科学府、2. 九州大学大学院工学研究院、3. 株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ)

[1P-109] DNA-nano-tweezersバイオセンシング分子スプレー法による固体表面上の標的核酸直接検出

*重松 怜志¹、波多野 浩也¹、石田 丈典¹、池田 丈¹、廣田 隆一¹、黒田 章夫¹、舟橋 久景¹ (1. 広島大学大学院統合生命科学研究科)

SARS-CoV-2 感染細胞内における 3CL プロテアーゼの活性制御・局在解明を目指した Activity-based probe の開発

○山内勇輝¹・今野 翔²・大村紀子¹・吉岡成美²・Alexandra Hingst³・Michael Gütschow³・Christa E. Müller³・田口晃弘²・谷口敦彦²・川口敦史⁴・林 良雄^{2,5}
(¹ 東京薬大院薬、² 東京薬大薬、³ Univ. Bonn、⁴ 筑波大医、⁵ 東京薬大生命)

Development of activity-based probe to elucidate the activity regulation and localization of 3CL protease in SARS-CoV-2 infected cells. (Grad. Sch. Pharm., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.¹, Sch. Pharm., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.², Pharmaceutic. Inst., Pharmaceutic. Med. Chem., Univ. Bonn³, Inst. Med., TMRC, Univ. Tsukuba⁴, Sch. Life Sci., Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.⁵) YAMAUCHI, Yuki¹; KONNO, Sho²; OMURA, Noriko¹; YOSHIOKA, Narumi²; HINGST, Alexandra³; GÜTSCHOW, Michael³; MÜLLER, Christa E.³; TAGUCHI, Akihiro²; TANIGUCHI, Atsuhiko²; KAWAGUCHI, Atsushi⁴; HAYASHI, Yoshio^{2,5}

【目的】

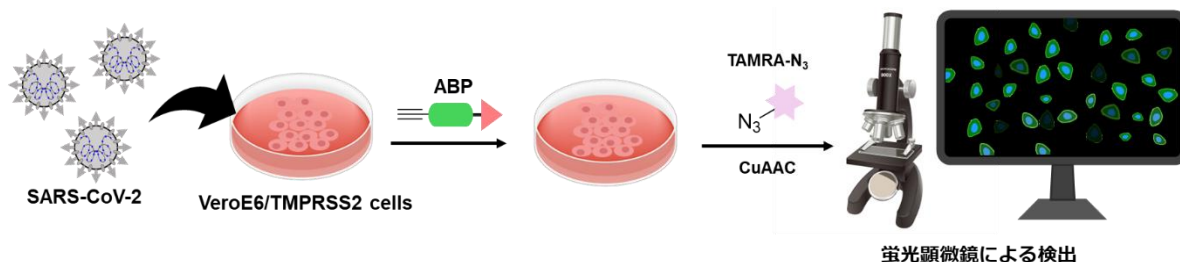
重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は、2020 年に世界的な大流行へと発展した COVID-19 の原因ウイルスである。SARS-CoV-2 のウイルス複製における重要因子として 3CL プロテアーゼ (3CLpro) が知られており、抗 COVID-19 治療戦略の標的として注目されている。これまでに 3CLpro に対する創薬研究を中心として、結晶構造解析や成熟化機構など様々な研究が展開されてきた。3CLpro に関する特性や機能への理解が深まる中で、SARS-CoV-2 感染細胞内における 3CLpro の分布や活性発現、細胞内局在などは十分に解明されていない。そこで我々は、感染細胞内における 3CLpro の細胞内動態の解明を目的として、3CLpro に対する Activity-based probe (ABP) の開発を行った。

【方法・結果】

我々はこれまで、3CLpro 阻害剤 YH-53 の独自創製を報告している¹。YH-53 は、3CLpro と強固な結合を示すことから、ABP のリガンドに採用することで選択的かつ高感度に 3CLpro を検出できると考えた。そこで今回、YH-53 を基盤に 3CLpro と不可逆的に結合可能な反応性基を導入した ABP を設計・合成した。合成した ABP は、精製系及びプロテオーム系において、組み換え 3CLpro をリガンド依存的かつ選択的にラベル化した。続いて、本 ABP が細胞内の 3CLpro をラベル化できるか評価した。COS-7 細胞に 3CLpro を一過性発現させた後に、本 ABP を処理したところ、本 ABP は細胞内 3CLpro をラベル化できることが明らかとなった。最後に、SARS-CoV-2 感染細胞内に発現している 3CLpro を検出できるか蛍光顕微鏡を利用して評価した。その結果、本 ABP は感染細胞内の 3CLpro を検出可能であることが示唆された。また、SARS-CoV-2 感染後 5 時間において、3CLpro が核周辺に局在していることを明らかにした²。

1. S. Konno, *et al.*, J. Med. Chem. 65, 4, 2926-2939 (2022).

2. Y. Yamauchi, *et al.*, ACS Chem. Biol. 19, 5, 1028-1034 (2024).



eDHFR タグを骨格とする化学遺伝学 Ca^{2+} センサーのタンパク質工学的改変

○迫井謙良¹・寺井琢也¹・Robert E. Campbell¹ (¹ 東大院理)

Protein engineering of chemigenetic Ca^{2+} indicators based on eDHFR tag (Graduate School of Science, the University of Tokyo¹) SAKOI, Kenryo¹; TERAII, Takuya¹; CAMPBELL, Robert E.¹

カルシウムイオン(Ca^{2+})は生体内の二次情報伝達物質であり、刺激に伴う細胞内への Ca^{2+} の流入によって細胞質の Ca^{2+} 濃度が一時的に上昇することで情報が伝達される。このようなシグナル伝達を可視化するツールとして、 Ca^{2+} 濃度に反応して蛍光強度が変化する蛍光センサーが用いられてきた。最近では、従来の合成低分子センサーと遺伝子コード型センサーの両方の利点を併せ持つセンサーとして、低分子蛍光団とタンパク質骨格を用いる化学遺伝学センサーが報告されている¹。しかし、従来の化学遺伝学センサーの多くは蛍光リガンドとタンパク質が共有結合で結合しており、不可逆的に結合した蛍光団の光退色によってセンサーの性能が低下する可能性がある。そこで本研究では、大腸菌ジヒドロ葉酸還元酵素(eDHFR)とこれに可逆的に結合するリガンドであるトリメトプリム(TMP)に着目し、 Ca^{2+} 認識ドメイン CaM と eDHFR との融合タンパク質が Ca^{2+} 濃度の上昇に伴い構造変化を起こすことで、TMP に結合した蛍光団の蛍光強度が変化するセンサーが構築できると考えた (Figure 1, left)。本センサーにおいてはタンパク質とリガンドの間の結合が非共有結合であることから、リガンドが光退色しても新しい分子と交換されてセンサーの蛍光強度が保たれると考えられ、細胞内の no wash かつ光退色のない Ca^{2+} イメージングが実現できると期待される (Figure 1, right)。

eDHFR タグは蛍光リガンドの TMP 部位と非共有結合を介して可逆的にラベルされ、蛍光団周辺の環境変化により蛍光強度が上昇するリガンドも報告されている²。まず、CaM を eDHFR の様々な箇所に挿入した変異体と種々の蛍光リガンドに対し、 Ca^{2+} 濃度の上昇による蛍光変化を調べたところ、 Ca^{2+} の存在下で蛍光強度が 23 %減少する変異体とリガンドの組み合わせが得られた。つぎに、二つのドメイン間のリンカー残基を調節することにより、 Ca^{2+} に対して正と負それぞれの蛍光変化を起こす変異体を得た。得られた変異体のリンカー部位、次いでランダムな部位に部位飽和変異を導入したライブラリーを作製し Ca^{2+} 応答に基づいたスクリーニングを複数回行うことで、センサーの蛍光変化を上昇させた。今後は引き続き指向性進化法に基づくライブラリー構築とスクリーニングを繰り返して *in vitro* での性能を向上させるとともに、*in vivo* での Ca^{2+} イメージングへの応用を行い、細胞内の多色および多標的イメージングを目指す予定である。

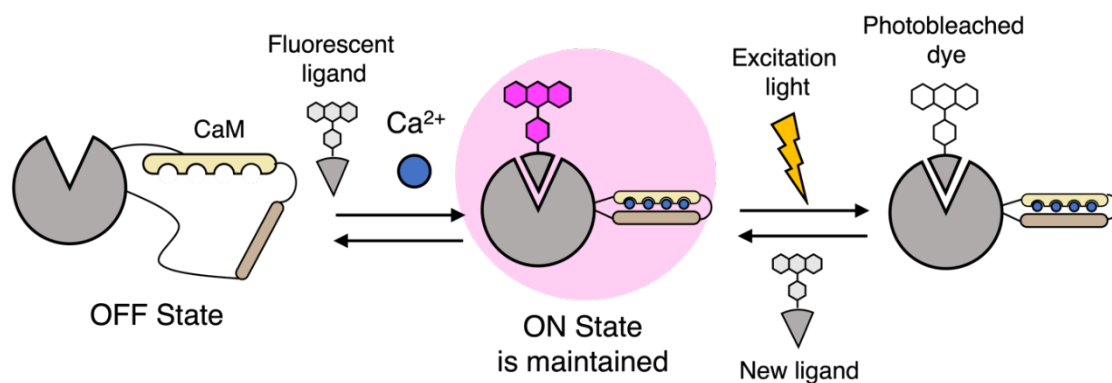


Figure 1. eDHFR 型化学遺伝学 Ca^{2+} センサーの模式図

1. *Nat. Chem. Biol.*, **2021**, 17, 718-723. 2. *Nat. Methods*, **2005**, 2, 255-257.

ジスルフィド結合含有蛋白質のフォールディング反応中間体の検出

○阪田菜奈¹・村上友梨¹・芦田織歌¹・廣嶋杏菜¹・宮澤光博²・島本茂¹・日高雄
二¹ (¹近大院総合理工学、²(株)プリベンテック)

Detection and separation of disulfide-coupled folding intermediates of mid-size proteins (Graduate School of Science and Engineering Research, Kindai University¹, PrevenTec Inc.²) SAKATA, Nana¹; MURAKAMI, Yuri¹; ASHIDA, Orika¹; HIROSHIMA, Kyona¹; MIYAZAWA, Mitsuhiro²; SHIMAMOTO, Shigeru¹; HIDAKA, Yuji¹

現在、ジスルフィド結合(SS 結合)を持つ蛋白質のフォールディング機構の研究は、比較的低分子量の蛋白質(〜10 kDa)に限られており、より大きな分子量の蛋白質では困難となっている。これは、主に、SDS-PAGE や HPLC 等でのフォールディング中間体の分離・分解能が低く、結果として、反応中間体を特徴づける SS 結合の架橋位置等の情報を得ることが困難なためである。そこで、我々は、より大きな分子量を持つ蛋白質のフォールディング機構を解明するため、反応中間体の新規標識試薬を開発することにした¹。モデル蛋白質として、ウシ膀胱トリプシンインヒビター(BPTI, 6.5 kDa)及びトリプシノーゲン様酵素(プロコクナーゼ: proCCN, 25.1 kDa)²を用い、これらのフォールディング反応の中間体を新規試薬で標識後、分離分析することで、我々が開発した試薬の有効性を評価することにした。

反応中間体を捉えるための新規標識試薬のデザインとして、チオール捕捉剤としてマレイミド基を、また、疎水性の高い中間体の凝集抑制効果を期待したポリ Arg 配列を導入した。最終的に、maleimidohexanoyl-Arg₅-Tyr-NH₂ (Male-Arg₅-Tyr-NH₂)を新規ラベル化試薬としてデザインした。本試薬の調製は、まず、Arg₅-Tyr-NH₂を Boc 固相合成法で化学合成し、その後、*N*-succinimidyl 6-maleimidohexanoate と反応させ、最終物である Male-Arg₅-Tyr-NH₂ を獲得した。

得られた試薬を用い、まず、BPTI の反応中間体をラベル化し、SDS-PAGE および逆相 HPLC 分析を行ったところ、反応中間体の良好な分離が得られ、また、懸念される SS 交換反応も起こらなかった。そこで、本試薬をより大きな分子量を持つ proCCN に適応することにした。反応中間体の標識試薬の比較対象として、汎用されている *N*-エチルマレイミドを用い、新規試薬 Male-Arg₅-Tyr-NH₂ の有効性を評価した。各反応時間でリフォールディング反応溶液をそれぞれの試薬で処理し、SDS-PAGE あるいは逆相 HPLC により分析した。その結果、SDS-PAGE 及び逆相 HPLC のいずれの場合でも、*N*-エチルマレイミドでは全く分離できなかった反応中間体を Male-Arg₅-Tyr-NH₂ では効率よく分離できることが分かった(図 1)。以上のことから、本試薬により、これまで困難であった中程度の分子量をもつ蛋白質(〜25 kDa)のフォールディング機構の研究への新たな手法を確立することができた。

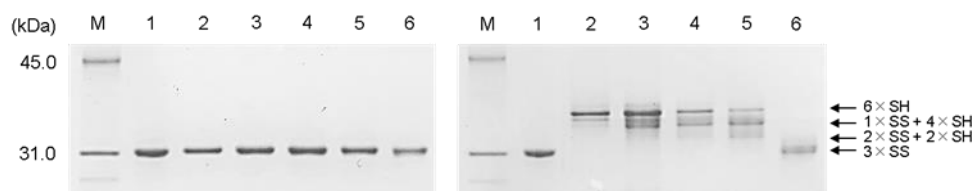


図 1 トリプシノーゲン様酵素(proCCN)のリフォールディング反応溶液を *N*-エチルマレイミド(左)あるいは Male-Arg₅-Tyr-NH₂ (右)で処理した反応混合物の SDS-PAGE ; レーン 1: 未処理、レーン 2-6: 反応時間 0, 1, 2, 3, 24 時間

1. N. Sakata, Y. Murakami, *et al.*, *Molecules*, **28**(8), 3494–3504 (2023)
2. N. Sakata, A. Ogata, *et al.*, *Molecules*, **27**(22), 8063–8085 (2022)

全原子分子動力学計算によるファイバータンパク質 AtaA の構成ドメインの力学特性解析

○笹原 純・逸見奎太・吉本将悟・堀 克敏（名大院工）

All-atom molecular dynamics simulations of the mechanical properties of the domains of the fiber protein AtaA (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SASAHARA, Jun; HEMMI, Keita; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

タンパク質の機能発現は、その力学的安定性に大きく依存している。この安定性はタンパク質の構造的特徴、特にその二次構造 (α ヘリックスや β シート) や分子間の非共有結合相互作用によって決定される。しかし、複雑な四次構造をもつタンパク質における力学的安定性は十分に理解されていない。非病原性細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 から発見されたファイバータンパク質 AtaA は、その高い接着力とユニークな四次構造を有しており、微生物固定化法やバイオインターフェース工学への応用が期待されている¹⁾。AtaA は長さ 250 nm の三量体型テザー分子であり、複数のドメインが反復、混在したユニークな構造をとり、容易に構造が崩壊しない強靭さと柔軟性を有している (図 1)。これまでに AtaA の N 末端ドメイン (Nhead) は接着性、C 末端ドメイン (Chead) は強靭性を発揮することが明らかとなっているが、AtaA 全体の 85% を占める他のドメインの力学特性は未だ不明である。そこで本研究では、全原子分子動力学 (MD) 計算を用いることで、AtaA を構成する主要な 12 のドメインおよび、ファイバー全体としての力学特性の解明を目的とした。

MD シミュレーションを用いてタンパク質構造の両末端原子を一定速度 (1 nm/ns) で伸長させることにより、各ドメインの力学強度を明らかにした。GANG や Trp-ring など β シート構造が引っ張り軸方向に平行なドメインは比較的高い力学強度を示し、GIN や Ylhead など β シート構造が引っ張り軸方向に垂直なドメインの力学強度が低いことが明らかとなった。これより、 β シート間に存在する水素結合の数や向きによって力学強度が制御されていることが示唆された。さらに、12 のドメインの力学強度を AtaA の配列と比較しドメイン-力学強度マッピングを行ったところ、AtaA ファイバーは全体として力学強度の高いドメインと低いドメインが交互に配置したユニークな構造をとっていることが明らかとなった (図 2)。本研究から AtaA の力学的特徴が明らかとなり、ファイバー様タンパク質が強靭性、柔軟性を発揮するための構造的戦略が示唆された。これにより複雑な四次構造をもつタンパク質の力学的安定性についての新たな理解が得られた。

1) S. Yoshimoto, *et al.*, *Front Bioeng. Biotechnol.* **10**, 1095057 (2023).

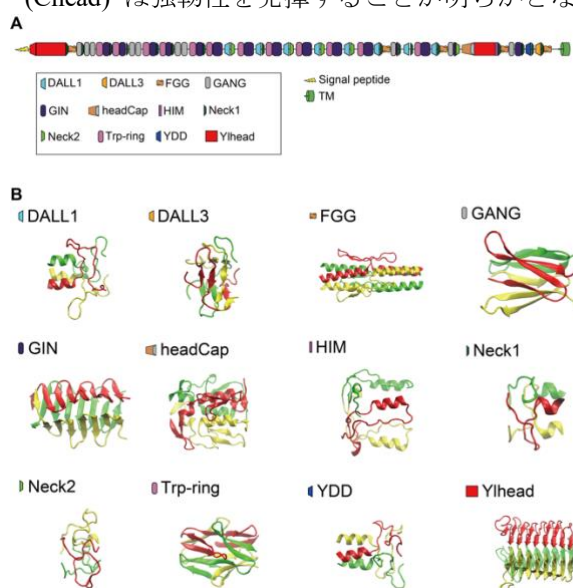


図 1 (A) AtaA ファイバーと(B) 各ドメインの構造

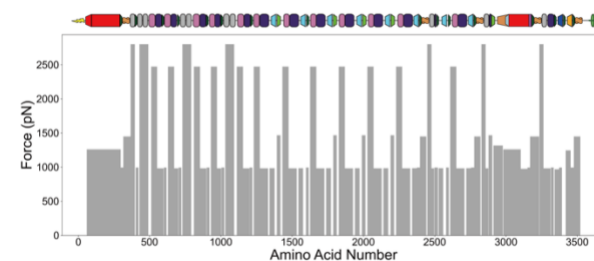


図 2 AtaA のドメイン-力学強度マッピング

FAD/ThDP 依存性酵素の反応性を拡張した非生物学的ラジカルアシル化反応の開発

○足立柚斗・藤沢修斗・加藤俊介・林 高史（阪大院工）

Abiotic Photo-driven Radical Acylations Catalyzed by FAD/ThDP-dependent Enzymes (Graduate School of Engineering, Osaka University) ADACHI, Yuto; FUJISAWA, Shuto; KATO, Shunsuke; HAYASHI, Takashi

持続可能な社会の実現に向け、近年、酵素や微生物等の生体触媒を用いた物質変換に注目が集まっている。これら生体触媒の反応適用範囲を非天然の化学反応にまで拡張することは喫緊の課題であり、非生物学的反応を触媒する新たな酵素の開発が精力的に進められている。そこで我々の研究室では、高難度なラジカルカップリング反応を触媒する新規酵素を開発するべく、FAD/ThDP 依存性酵素を用いたラジカルアシル化反応の開発を実施した。アセト乳酸合成酵素をはじめとする FAD/ThDP 依存性酵素は、電子伝達を仲介するフラビン（FAD）と NHC 有機触媒の等価体であるチアミン（ThDP）を補因子として有しており、通常、ベンゾイン縮合反応のようなカルボニル化合物の極性転換反応を触媒することで知られている。本研究では、このような酵素本来の二電子反応機構による触媒反応様式を抜本的に改変し、FAD/ThDP 依存性酵素の反応性をラジカル反応様式へと拡張することをめざした。具体的には、種々の FAD/ThDP 依存性酵素のスクリーニングと遺伝子工学的改変を実施し、 α -プロモエステルのラジカルアシル化反応や、*N*-アシロキシフタルイミドの光駆動型ラジカルアシル化反応に対して触媒活性を示す新規酵素を開発したので報告する（図 1）。

まず初めに、目的のラジカルアシル化反応に対して有望な触媒活性を示す酵素を同定するため、種々の微生物種由来 FAD/ThDP 依存性酵素のスクリーニングを実施した。その結果、*T. bispora* 由来のアセト乳酸合成酵素（TbALS）が、ピルビン酸と α -プロモエステルのラジカルアシル化反応に対して触媒活性を示すことを見出した。さらに、分子動力学計算に基づく TbALS の遺伝子工学的改変を実施し、得られた TbALS(D283Y/V104K/W484H) 変異体では、目的の β -ケトエステルの収率を 87%にまで向上させることに成功した。また、活性中心近傍に位置する FAD から基質に対する光励起電子移動を誘起することを目的に、TbALS に対して青色光を照射したところ、TbALS(D283Y/V104K/W484H) 変異体がピルビン酸と *N*-アシロキシフタルイミドの光駆動型ラジカルアシル化反応に対して高い触媒活性を示すことが明らかとなった。すなわち酵素の活性中心において、励起状態になり還元力の増加した FAD が *N*-アシロキシフタルイミドを一電子還元することでアルキルラジカルが生じたことが示唆された。さらに本反応系における基質特異性は、一般的な有機ラジカルカップリング反応系とは反対の傾向を示し、比較的不安定で小さいアルキルラジカルを放出する基質がよく適合することが明らかとなった。

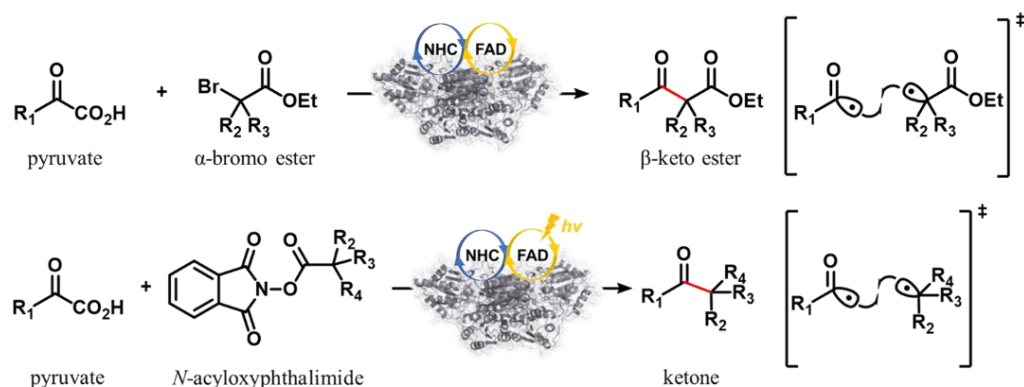


図 1 FAD/ThDP 依存性酵素が触媒する非生物学的ラジカルカップリング反応

シトクロム P450BM3 による非天然基質の酸化を促進する

ジカルボン酸導入デコイ分子の開発

○石上恵¹・有安真也¹・笠井千枝¹・愛場雄一郎¹・杉本宏²・荏司長三¹(¹ 名大院理、² 理研 SPring-8)

Development of Dicarboxylic Acid-Based Decoy Molecules to Promote Oxidation of Non-Native Substrates by Cytochrome P450BM3 (Graduate School of Science, Nagoya University¹, SPring-8, RIKEN²) ISHIGAMI, Megumi¹; ARIYASU, Shinya¹; KASAI, Chie¹; AIBA, Yuichiro¹; SUGIMOTO, Hiroshi²; SHOJI, Osami¹

シトクロム P450BM3 (以下、P450BM3) は長鎖脂肪酸の不活性な C-H 結合を水酸化するヘム酵素で、高難度な反応を高効率に達成できることからバイオ触媒としての利用が期待されている。しかし、酵素は一般に基質特異性を有しているため、天然基質以外の物質の変換は困難である。それに対し当研究室では、基質を模擬した偽の基質 (デコイ分子) を添加することで、P450BM3 を“誤作動”させ、本来進行しないトルエン

などの小分子の酸化を達成している (図 1) [1]。これまで開発されてきたデコイ分子はアミノ酸誘導体やジペプチド誘導体であり、高活性デコイ分子の構造はいずれも類似している[2]。そのため、それらの基質選択性に大きな違いは見られていない。そこで本研究では、デコイ分子の骨格の改変による基質選択性変化などを期待し、アミノ酸に代わりジカルボン酸を導入したデコイ分子の開発に取り組んだ。

まず、カルボン酸とフェニルアラニンを縮合させた従来型デコイ分子 (Cn-Phe) の骨格 (図 2 a 左) を参考に、アルキルアミンとジカルボン酸を縮合させた骨格を設計した。ジカルボン酸を数種選び、直鎖状のアルキルアミンと縮合した分子を合成した。P450BM3 によるトルエン水酸化反応でこれらの分子の活性を評価したところ、フタル酸を導入した分子 Cn-Pht (図 2 a 右) が最も高い活性を示すことが明らかになった。

フタル酸が P450BM3 との結合にどのように関与しているのかを調べるため、共結晶を作製し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、フタル酸の屈曲構造が、基質ポケットに折れ曲がるように結合している天然基質の三次元構造を非常に良く模倣していることが明らかになった。

さらに、合成した炭素数 n: 7~12 の Cn-Pht を用いて P450BM3 によるトルエン、シクロヘキサン、ナフタレンの水酸化とスチレンのエポキシ化を行い、活性を評価した。従来型デコイ分子 (Cn-Phe) はトルエン水酸化を最高速度で進行させるのに対して、新規骨格デコイ分子 (Cn-Pht) はスチレンエポキシ化において高い活性を示し、エポキシ化に適したデコイ分子であることが示唆された (図 2 bc)。以上より、ジカルボン酸を新たな部分構造として導入したことで、従来型デコイ分子と異なる基質の変換に適した新たなデコイ分子を開発することに成功した。

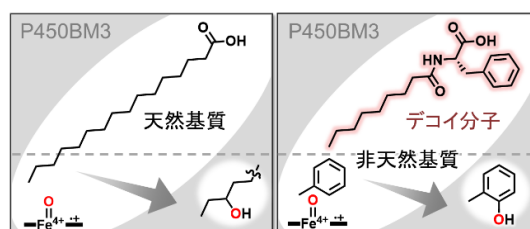


図 1. P450BM3 による反応 (左)天然基質の水酸化(右)デコイ分子によるトルエンの水酸化

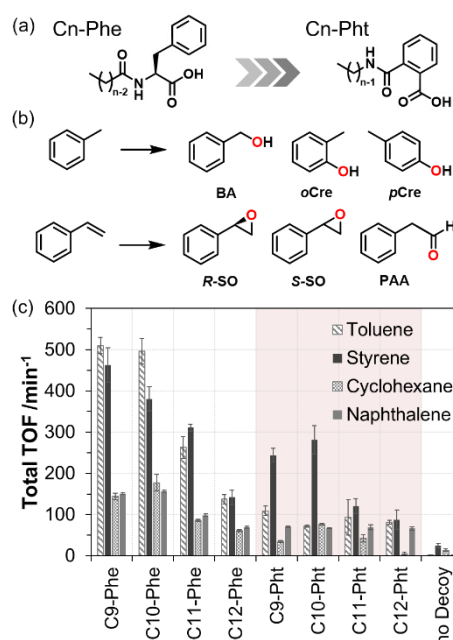


図 2. (a)従来型デコイ分子と新規骨格デコイ分子の構造(b)トルエン水酸化とスチレンエポキシ化(c)各反応の速度

Ref. [1] O. Shoji, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 6606. [2] O. Shoji, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 10324.

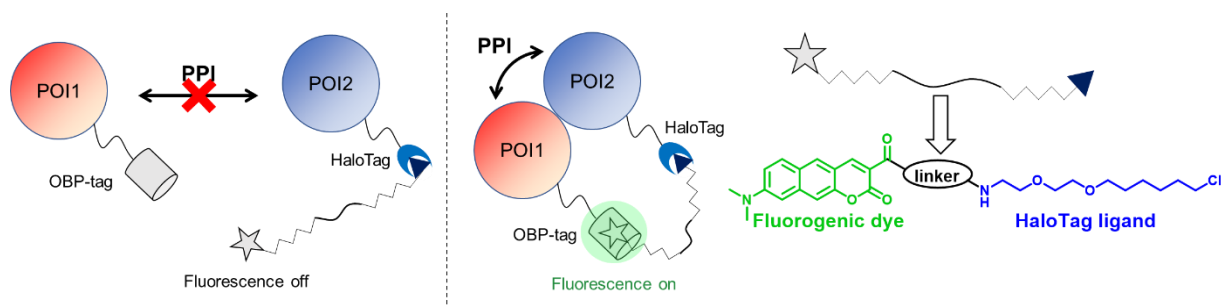
Development of Fluorescent Probes for Detection of Protein-protein Interaction Using a Reversible Labeling System

(¹Graduate School of Engineering, ²Immunology Frontier Research Center, Osaka University) ○Jiatong Li,¹ Masafumi Minoshima,¹ Kazuya Kikuchi^{1,2}

Protein-protein interactions (PPI) play important roles in signal transduction and molecular transportation in cells¹. Understanding PPI reveals the network of gene products and function in cells. Fluorescence imaging is a powerful tool for visualizing biomolecules in living cells, enabling researchers to study biological processes with high spatiotemporal resolution. Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)² based techniques and Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)³ methods have been widely used for investigating PPIs. Nevertheless, interpreting PPIs by these approaches may be confounded by various factors, such as fluorescence crosstalk and spontaneous fluorescent artifact formation, respectively.

To address these challenges and advance the field of PPI detection, our research focuses on a reversible labeling method using chemical fluorescent probes. In this study, we propose a novel imaging method for visualizing PPIs based on a reversible and fluorogenic protein labeling approach. Our method involves the utilization of the Odorant binding protein (OBP)⁴ as a protein tag, which serves as a protein tag fused with the protein of interest (POI). By employing fluorogenic ligands specific to the OBP-tag, POIs can be visualized with high contrast and precision in living cells.

This research presents a novel method for detecting PPIs. The highly hydrophobic fluorophore 8-DiMethylAminoBenzoCoumarin (DMABC) was selected as the fluorogenic and reversible binding ligand of OBP-tag. At the same time, a chloroalkane moiety at the other end of the probe provides a covalent docking site for PPI detection. In the absence of a PPI event, the physical length of the probe prevents the fluorogenic ligand from reaching and binding to the OBP-tag, resulting in no fluorescence. During a PPI event, however, DMABC is allowed to bind to and interact with OBP-tag to give off fluorescence. Various probes were synthesized and characterized, bearing with a series of linkers. These probes demonstrated irreversible binding to HaloTag and reversible binding to OBP-tag, showing significant fluorescence shifts and increases when both proteins were present. Additionally, the probes maintained their fluorogenic properties in live cell imaging applications for PPI analysis.



- (1) Lu, H. et al. *Sig Transduct Target Ther* **2020**, 5 (1), 213.
- (2) Park, S.-H. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141 (10), 4273.
- (3) Wang, S. et al. *ACS Chem. Biol.* **2018**, 13 (5), 1180.
- (4) Briand, L. et al. *Biochemistry* **2002**, 41, 7241.

野生型と一残基変異型サブユニットからなる

二量体ががん関連酵素の高純度精製方法の確立

○松本夏弥¹・韓叡佳¹・岡智将¹・石場智彬²・加藤かざし²・原田彩佳²・岩崎憲治^{2,3} (¹筑波大・院数理、²筑波大・TARA、³筑波大・QILS)

Establishment of a High-Purity Purification Method for a Dimeric Cancer-Related Enzyme Composed of one Wild-Type and one Single-Residue Mutant Subunit (Grad. Sch. Sci. Tech., Univ. of Tsukuba.¹ Univ. of Tsukuba TARA.² Univ. of Tsukuba QiLS.³) Matsumoto Natsumi¹, Kan Eika¹, Oka Tomomasa¹, Ishiba Tomoaki², Kato Kazashi², Harada Ayaka², Iwasaki Kenji^{2,3}

背景 本研究の目的はクライオ電子顕微鏡単粒子解析 (cryo-EM SPA) の利点を生かし、これまでの構造解析法では不可能だった**野生型 IDH1 サブユニットと変異型 IDH1 R132C サブユニットからなるヘテロ二量体の原子座標を明らかにすること**である。加えて、この試みは **cryo-EM SPA の低分子量解析の限界に挑む**というもう一つの目的も内包する。野生型 IDH はホモ二量体を形成し、イソクエン酸から α -ケトグルタル酸への変化を触媒する酵素である。IDH には 3 つのアイソフォームが存在し、その中の IDH1 では c.394C>T のミスセンス変異により、132 残基目のアルギニンがシステインに置換される(R132C)ことが知られている。この一残基変異が二量体の一方に組み込まれ、ヘテロ二量体となると新型触媒機構を示し、がん代謝産物を生成する。

IDH1 と変異体 IDH1 のヘテロ二量体の構造解析例としては、R132H という別の変異体についての X 線結晶構造解析の報告が 1 件(PDB ID:3MAS)だけである。しかし、分解能が 3.2Å と低く、二量体界面に関する、詳細な結合様式の解明には至っていない。この分解能の低さは、変異体サブユニットと野生型サブユニットの周期性が結晶構造中で失われているためと推測できる。

そこで、個々の粒子の配向を独立に決定できる cryo-EM SPA の特性を生かし、野生型 IDH1 と変異型 IDH1R132C のヘテロ二量体の構造解析を行うことを計画した。しかし、ホモ二量体の発現精製に比べ、わずかに残基の違いしかないサブユニットの二量体試料の作製は非常に難易度が高い。今回は、非常に純度高くヘテロ二量体の作製に成功したため、その手法と結果を紹介する。

実験手法と結果 まず、大腸菌 BL21 (DE3) により野生型 IDH1 と変異型 IDH1R132C を共発現させることにした。しかし、共発現を行うと、野生型 IDH1 のホモ二量体、変異型 IDH1R132C のホモ二量体、そして野生型 IDH1 と変異型 IDH1R132C のヘテロ二量体の 3 種類が形成されてしまう。この問題を解決するためアフィニティタグを利用して次のような融合タンパク質をデザインした。野生型 IDH1 に GST タグを、変異型 IDH1R132C に His タグを融合する。両者を共発現した大腸菌から作製した粗精製画分から、GST タグアフィニティー精製、続いて His タグアフィニティー精製を連続して行う。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィーにおいて、GST タグは His タグよりも大きなタンパク質であることを利用し、ヘテロ二量体の純度を高める。この結果を図 1 に示す。ピーク溶出画分のウェスタンブロットの結果 (図 2) から His タグと GST タグのそれぞれが確認できたため、試料には GST タグを付加した野生型 IDH1 と His タグを付加した変異型 IDH1R132C が含まれることが分かった。

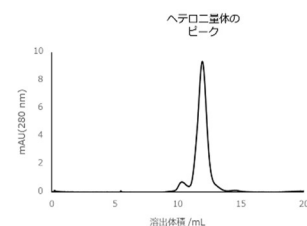


図 1 最終ゲル濾過クロマトグラフィーの結果

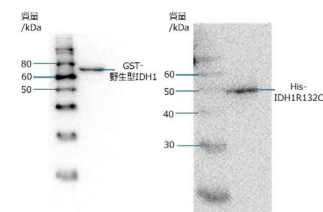


図 2 ウェスタンブロットによるタグの確認

細胞内局所の粘度計測を可能にする FRET 型粘性感受性蛍光プローブの開発

○笠井柊杜¹・佐々木栄太^{1,2}・榛葉満理奈²・森貴裕³・阿部郁朗³・花岡健二郎^{1,2}
(¹慶大院薬、²慶大薬、³東大院薬)

Development of a FRET-based viscosity-sensitive fluorescence probe for measuring intracellular local viscosity (Grad. Sch. Pharm. Sci., Keio Univ.¹, Fac. Pharm., Keio Univ.², Grad. Sch. Pharm. Sci., The Univ. of Tokyo³) KASAI, Shuto¹; SASAKI, Eita^{1,2}; SHIMBA, Marina²; MORI, Takahiro³; ABE, Ikuro³; HANAOKA Kenjiro^{1,2}

細胞内における液-液相分離は、様々な生命現象に関与することが報告されており、近年注目を集めている。これらは、天然変性領域をもつタンパク質や核酸が高密度に集積した液滴として観察されるが、その物性や形成メカニズムについては不明な点が多く、新しい解析技術の開発が求められている。我々は、緑色蛍光タンパク質の EGFP と HaloTag の融合タンパク質 (Chimera 1) に赤色蛍光色素である HaloTag TMR (tetramethylrhodamine) ligand を結合させた Chimera 1-TMR が、FRET (Förster resonance energy transfer) 型の粘性感受性蛍光プローブとして働く可能性を見出し、これを利用した細胞内液滴内の粘度計測を試みている (図 1)。

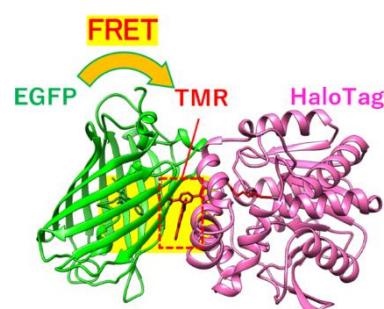


図 1 Chimera 1-TMR のデザイン

1 始めに、Chimera 1-TMR の蛍光スペクトルを PBS 中で測定したところ、96% の高効率で EGFP から TMR への FRET が観測された。また、Chimera 1-TMR の X 線結晶構造解析の結果、EGFP と TMR の蛍光団の距離は 1.8Å と非常に近接しており、EGFP の側鎖と TMR との間で 2 つの π - π 相互作用および塩橋が形成され、TMR が EGFP 近傍に固定されることで、高効率の FRET が引き起こされたと推測した。次に、様々なグリセロール濃度によって粘度を変化させたリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で Chimera 1-TMR の蛍光スペクトルを測定したところ、粘度の上昇に伴い FRET 効率が大きく低下した (図 2)。

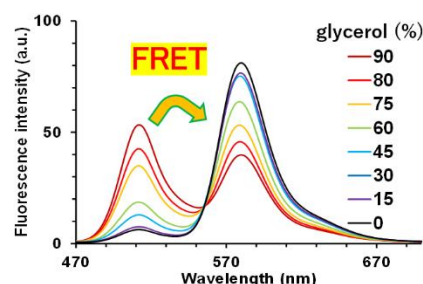


図 2 グリセロール濃度依存的な Chimera 1-TMR 蛍光スペクトルの変化 (Ex. 450 nm)

また、BSA を添加した PBS 中においても、BSA 濃度依存的な FRET 効率の減少が観察された。一方、塩濃度 (0-0.3M) や pH 変化 (7.4-9.0)、温度変化 (20-40℃) は、FRET 効率にほとんど影響を与えなかった。

最後に、FUS (fused in sarcoma) の天然変性領域と、24 量体を形成することの知られている Ferritin サブユニット (FTH1) の間に Chimera 1 を挿入した融合タンパク質 (FUS:Chimera 1:FTH1) を設計し、その発現ベクターを HEK293 細胞に導入した。さらに、TMR HaloTag ligand を付加することで、HEK293 細胞内に Chimera 1-TMR 融合タンパク質を含む液滴を形成させることに成功した。次に、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、波長 488 nm の光で EGFP を励起した際の EGFP と TMR に由来する蛍光のレシオ画像を取得することで、細胞内局所における粘度イメージングを試みた。液滴の内外における蛍光強度のレシオ値を比較したところ、液滴内において [TMR の蛍光強度]/[EGFP の蛍光強度] の値が大きく低下していた (FRET 効率が低下していた) ことから、細胞内液滴では液滴外と比較して粘性が上昇している可能性が示唆された。

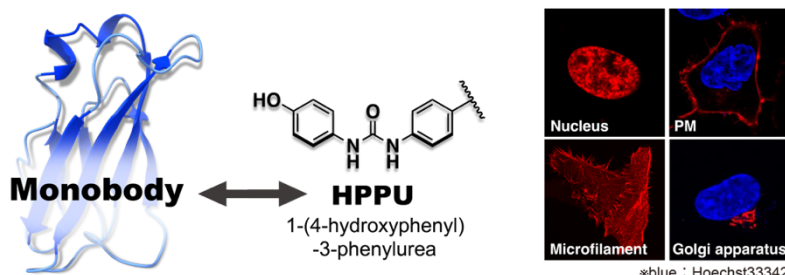
蛍光イメージングのための世界最小モノボディタグの創製

○宮崎友輝¹・梅本駿²・都築成晃²・深谷菜摘¹・Chung Nguyen Kim²・吉井達之¹・吉川優¹・藤野公茂²・林剛介²・村上裕^{2,3}・築地真也¹ (¹名工大院・工、²名大院・工、³名大未来ナノ)

Generation of the smallest Monobody-tag for fluorescence imaging (¹Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology; ²Graduate School of Engineering, ³Institute of Nano-Life-Systems, Institute of Innovation for Future Society, Nagoya University) MIYAZAKI, Tomoki¹; UMEMOTO, Shun²; TSUDUKI, Masaaki²; FUKAYA, Natsumi¹; KIM, Nguyen, Chung²; YOSHII, Tatsuyuki¹; YOSHIKAWA, Masaru¹; FUJINO, Tomoshige²; HAYASHI, Gosuke²; MURAKAMI, Hiroshi^{2,3}; TSUKIJI, Shinya¹

蛍光イメージングによる生体分子の可視化は、生命研究のための強力な基盤技術である。その手法の一つとして、タグタンパク質と小分子リガンドの特異的ペアを利用した「タグラベリング技術」がある。この手法では、標的タンパク質にタグタンパク質を融合したものを細胞に発現させ、特異的小分子リガンドの蛍光プローブ誘導体を用いて、そのタグ融合標的タンパク質を蛍光標識する。現在、タグラベリング技術の代表格となるのは HaloTag と SNAP-tag のシステムであり、蛍光プローブ側の発展に伴い、高コントラスト蛍光イメージングや超解像イメージングへの応用も可能になってきた^[1]。一方、HaloTag (33 kDa) と SNAP-tag (19 kDa) は決して小さくはなく、タグ融合による標的タンパク質への機能摂動が危惧される。理想的には、タグタンパク質はできる限りサイズが小さい方が望ましい。そのため、より小さなタグタンパク質の探索・開発が国内外で精力的に進められ、これまでに、PYP-tag (14 kDa)^[2]、FKBPF_{36V} (12 kDa)^[3]など、HaloTag・SNAP-tag よりも小型のタグタンパク質がいくつか報告された。一方、これらのタグタンパク質に対応する小分子リガンドは比較的構造が複雑なものが多く、蛍光プローブ誘導体の合成が容易ではない。

そこで本研究では、小さなタグタンパク質とシンプルな小分子リガンドのペアからなる新規タグラベリング技術の開発を目指した。そのための戦略として、改良型 mRNA 提示法である TRAP 提示法^[4]を利用して、小分子化合物に結合する人工タンパク質を *in vitro selection* によって取得・創製するというアプローチを展開した。具体的には、タグタンパク質の骨格としてフィブロネクチン構造を有するモノボディ (~10 kDa) を選択し、リガンドには小分子 HPPU (1-(4-hydroxyphenyl)-3-phenylurea) を独自に設計した。モノボディの DNA ライブラリを構築し、TRAP 提示法による *in vitro selection* を行った結果、HPPU に特異的に結合する抗 HPPU モノボディクローンの取得に成功した ($K_d \approx 11.8$ nM)。取得したモノボディタグは動物細胞内に発現させることができ、細胞内でも HPPU 特異的に結合することが示された。また、モノボディタグに対する HPPU 型発蛍光プローブを開発し、モノボディタグ融合標的タンパク質を“無洗浄条件下”において高いコントラストで蛍光標識可能なラベリングシステムを開発した。本発表では、世界最小モノボディタグの創製とライブセル蛍光イメージングへの応用について報告する。



- [1] C. A. Hoelzel et al., *ChemBioChem*, **2020**, 21, 1935. [2] Y. Hori et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 46, 16610.
 [3] T. Clackson et al., *PNAS*, **1998**, 95, 10437. [4] T. Ishizawa et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 5433.

SLIPT-PM を用いた上皮成長因子受容体 (EGFR) の化学遺伝学活性操作

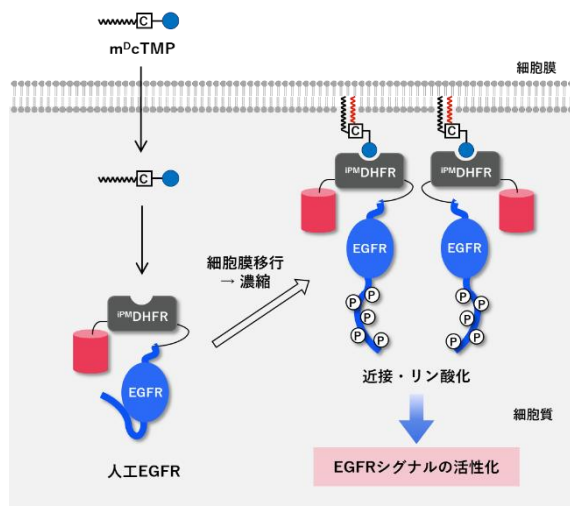
○大平修也・田原海・吉川優・築地真也 (名工大院・工)

Chemogenetic activity manipulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) using SLIPT-PM
 (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) OHIRA, Shuya; TAHARA, Kai;
 YOSHIKAWA, Masaru; TSUKIJI, Shinya

受容体型チロシンキナーゼ (RTK) は、細胞外の成長因子やサイトカインと結合することで、増殖、分化、遊走などのさまざまな細胞応答を誘導する。一方、RTK はヒトゲノム中に 58 種類コードされており、ErbB1/2/3/4 に代表されるように、1 つの RTK クラスの中にも複数のファミリー分子が存在する。そのため、細胞に発現している個々の RTK の機能と細胞応答の関係を解明するのは容易ではない。そこで近年注目されているのが、RTK 特異的活性操作ツールである。特定の RTK の活性を人為的かつ特異的にコントロールするツールは、RTK の機能解明のための基盤技術として極めて有用であるばかりでなく、細胞機能・運命の操作を目指した医療分野への応用も期待される。

通常、RTK は、天然リガンドに結合することで二量体化し、自己リン酸化することで活性化する。これまでに、小分子結合ドメインや光受容ドメインを RTK に融合することで、その二量体化と活性化を小分子 (化学二量化剤) や光で誘導することのできる化学遺伝学^[1]および光遺伝学 RTK ツール^[2]が報告されている。しかし、従来のツールでは、人工 RTK を細胞膜上に外来・過剰発現させるため、小分子や光がない条件下でも人工 RTK が二量体化し、初期活性化 (活性漏れ) が起こりやすいことが問題となっている^{[1],[3]}。

そこで我々は、上記の問題を解決するための独自の戦略として、RTK の細胞内局在を制御することを考えた。我々の戦略ではまず、RTK の細胞内ドメインを細胞質に発現させる。そして、それを細胞膜インナーリーフレットに局在移行させることで、RTK の細胞膜上での濃縮効果による二量体化と活性化を誘導する、というアイデアである。このアプローチでは、RTK を (細胞膜ではなく) 細胞質に発現させるため、初期活性化が全く起こらず、細胞膜へ局在移行させて初めて活性化するという、シャープなオフオン活性スイッチングが実現できるものと期待される。また、RTK を細胞質から細胞膜へ移行させる技術として、当研究室で開発したタンパク質局在制御化合物技術「SLIPT-PM」を用いることにした^{[4],[5]}。SLIPT-PM では、局在性リガンド m^DcTMP を用いることで、タグタンパク質 iPM^{DHFR} を融合した任意のタンパク質を細胞質から細胞膜へ特異的に移行させることができる。本研究では、RTK の一つである上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的とし、局在操作に基づいた iPM^{DHFR} 融合 EGFR の化学遺伝学活性操作を試みた。本発表では、一連の成果について詳細を報告する。



[1] M. Whitney, et al., *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 44, 41191-41196. [2] K. Chang, et al., *Nat. Commun.*, **2014**, 5, 4057. [3] H. Nakabayashi, et. al., *Biotechnol J.*, **2017**, 12, 1700441. [4] A. Nakamura, et al., *ACS Chem. Biol.*, **2017**, 15, 837. [5] S. Suzuki, et al., *Cell Chem. Biol.*, **2022**, 29, 1446.

翻訳後切断を指向した DNA 結合タンパク質 Rep の改変

○村山瑞季・西田慶・小島英理・三重正和（東工大生命理工学院）

Modification of DNA-binding protein Rep for post-translational modification (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) MURAYAMA, Mizuki; NISHIDA, Kei; KOBATAKE, Eiry; MIE, Masayasu

DNA-タンパク質ハイブリッド分子は、DNA とタンパク質の特性に基づく相乗的な機能拡張が期待できることから、幅広い分野で注目されている。Porcine Circovirus Type2 由来の DNA 複製開始タンパク質 (Rep) は、一本鎖 DNA (ssDNA) を特定配列で切断するとともに自身の 96 番目の Tyr 残基 (Y96) との間に共有結合を形成する酵素活性を有している。当研究室では、化学的な手法に依存せずに ssDNA の結合が可能である Rep を ssDNA 結合性ドメインと位置付け、Rep と機能性タンパク質を融合することにより DNA-タンパク質ハイブリッド分子の構築を推進している¹⁾。一方で、機能性タンパク質に対する立体障害を考慮すると、Rep の分子サイズは最小限にすることが望ましい。そこで本研究では、DNA-タンパク質ハイブリッド分子の構築における翻訳後タンパク質プロセシングの導入を指向した Rep の改変を実施する。翻訳後タンパク質プロセシングの利用は、ssDNA を結合した Rep のプロテアーゼ切断による小型化や、トランススプライシング反応による、機能性タンパク質に対する ssDNA 結合部位に限定した Rep の部分導入が達成可能になると期待される (Fig. 1)。本報告では、Tobacco Etch Virus (TEV) 由来のプロテアーゼ認識配列を導入した Rep を構築することにより、翻訳後タンパク質プロセシング配列の Rep への導入部位の検討を行った。

Rep の ssDNA 結合部位である Y96 の上流にある、A79-R80 間および K85-G88 間のループ構造部分を TEV 認識配列 (ENLYFQG) の導入部位として選定し、この配列をそれぞれ導入した T₇₉-Rep、T₈₅-Rep を構築した。各 Rep の TEV プロテアーゼによる切断および ssDNA 結合活性を評価した。TEV プロテアーゼによる各 Rep の切断を評価した結果、いずれの Rep においても切断が認められた。しかしながら、T₈₅-Rep での切断効率は、T₇₉-Rep と比較して低かった。また、各 Rep の ssDNA 結合活性を評価した結果、T₇₉-Rep においてのみ ssDNA 結合活性が認められた。T₈₅-Rep と比較して、T₇₉-Rep ではプロテアーゼによる切断と ssDNA 結合活性の双方が認められた。以上の結果より、Rep の A79-R80 間のループ構造は、Rep の翻訳後タンパク質プロセシング配列の導入部位として適していることが示唆された。本報告で得られた知見から、Rep を利用した DNA-タンパク質ハイブリッド分子の構築において、Rep の A79-R80 間へのさまざまな翻訳後タンパク質プロセシング配列の導入を通して ssDNA 結合ドメインとしての Rep の幅広い応用が期待される。

1) Mie M. *et al.*, *Biotechnol Lett* **41**, 357-362 (2019)

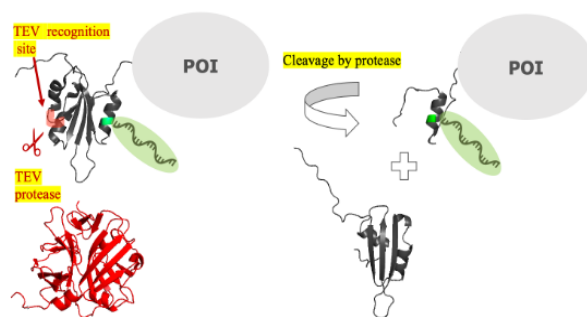


Fig. 1 Schematic illustration of post-translational cleavage of Rep by TEV protease

Refolding Large Denatured Proteins by 2D Assembled GroEL Immobilized on Silica Surface

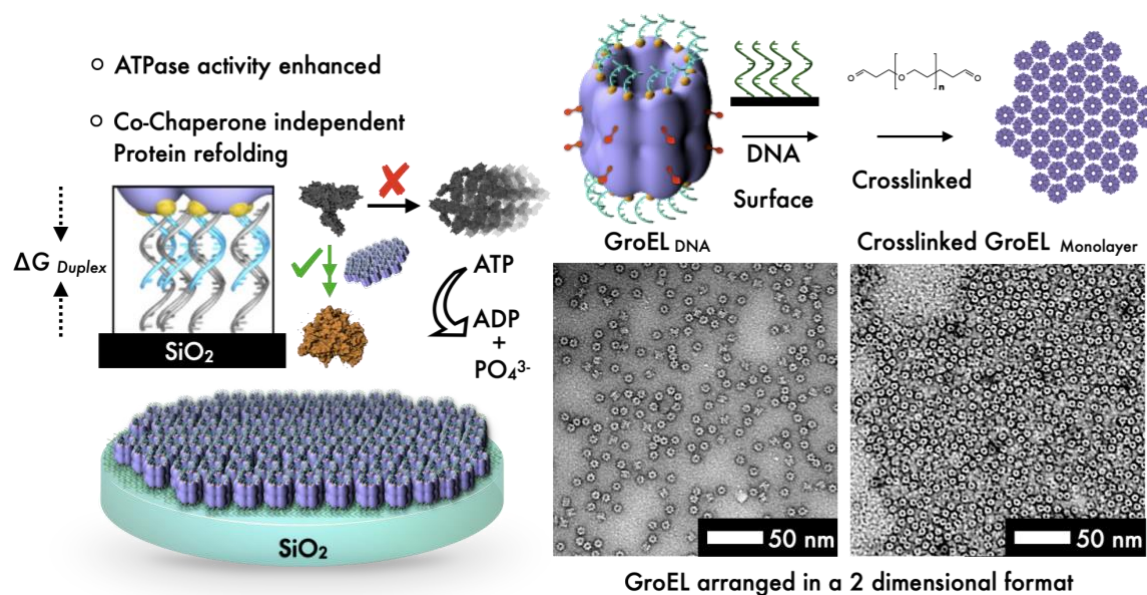
(¹Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, ²RIKEN Center for Emergent Matter Science, ³Institute of Innovation Research, Tokyo Institute of Technology)

○Tonmoy Ray¹, Takayuki Miki¹, Hideki Taguchi³, and Tatsuya Niwa³, Takuzo Aida^{1,2*}

Keywords: Chaperonin, Immobilization, Enzyme catalysis; Porous Materials; Stimuli Responsive

Naturally occurring membranous structures are formed by the precision lateral assembly of monomeric building blocks such as lipids or proteins¹. However, achieving functional two-dimensional (2D) structures from proteins as building blocks is still a big synthetic challenge. We utilize DNA appended chaperonin mutants as shape-persistent building blocks for the construction of an endogenous- stimuli-responsive, porous 2D sheet. Our lab has pioneered the use of chaperonin GroEL for nanotubular supramolecular polymerization.²⁻⁶

Chaperonins are remarkable biomolecular machines found in cells that play a vital role in protein folding. They maneuver the newly synthesized or misfolded polypeptides to a correctly functioning folded state preventing to form toxic aggregates. The double-barrelled chaperonin GroEL along with co-chaperonin GroES facilitates refolding of various proteins ($\sim <57\text{kDa}$) by encapsulating them into its hydrophobic central cavity in presence of ATP. In this work we reimagined the scope and synthesized a 2-dimensionally assembled GroEL monolayer on a DNA appended silica surface. Immobilization of the monomer GroEL_{DNA} which comprises densely functionalised complementary DNA motifs on its apical domain that led to an orientational preference on the template platform thus generating a porous scaffold. Astoundingly, the preferentially end on bound state on surface exhibits a high rise in ATPase activity. Investigating deeper, these assembled monolayers reveal a GroES independent spontaneous refolding of a very large guest aconitase ($\sim 83\text{kDa}$) in its immobilised state unlike the monomer counterpart. Further the design has been optimized to crosslink the assembly into sheets and eventually exfoliating them from the surface using DNA toehold mediated mechanism. Additionally, 2D-immobilized GroELs can be repetitively used for selectively entrapping and for on demand serum purification.



[References]

[1] *Microbiol. Rev.* **2014**, 38, 823. [2] *JACS* **2013**, 135, 11509. [3] *JACS* **2015**, 137, 4658. [4] *JACS* **2016**, 138, 11152. [5] *JACS* **2018**, 140, 26. [6] *JACS* **2020** 142, 31, 13310.

寛容にタンパク質を認識するチオール化合物の酸化的フォールディング促進効果

○鈴木洸希¹・野尻涼矢¹・齋尾智英²・奥村正樹³・村岡貴博^{1,4} (¹農工大院工、²徳島大先端酵素、³東北大学際研、⁴KISTEC)

Promotion of oxidative folding by a thiol compound bearing protein recognition units. (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology¹, Institute of Advanced Medical Sciences, Tokushima University², Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University³, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology⁴) SUZUKI Koki¹; NOJIRI Ryoya¹; SAIO Tomohide²; OKUMURA Masaki³; MURAOKA Takahiro^{1,4}

近年、バイオ医薬品の需要が高まっており、その生産効率の向上が求められている。特に、インスリンや免疫グロブリンなどのタンパク質生産には、ジスルフィド結合の形成を伴う酸化的フォールディングの促進剤が必要とされる。具体的には、還元変性状態のタンパク質に対し、ジスルフィド結合を導入する酸化剤(ジスルフィド化合物)と、非天然型のジスルフィド結合を組み替える求核剤(チオール化合物)である。先行研究では数々のジスルフィド/チオール化合物が開発され、 μM オーダーの希薄条件下において天然構造タンパク質を効率的に生産する方法が確立されてきた^{1,2}。一方で、非天然構造タンパク質は疎水部が表面に露出しているため、濃縮環境中ではタンパク質分子間相互作用により不可逆的な凝集体を形成しやすく、この環境中でフォールディングを促進する材料は未だ開発されていない。そのため、本研究では、高濃度条件下においても凝集体の形成を抑制しつつ、酸化的フォールディングを促進する材料の開発を目指した。

細胞内は mM オーダーの高濃度条件下だが、分子シャペロンや酸化還元酵素の働きにより、フォールディングが安定的に進行している。なかでも、ジスルフィド結合異性化酵素 Protein Disulfide Isomerase (PDI) family は酸化的フォールディングの品質管理を行っている。20 種類以上存在する PDI family のうち、ERp46 は CGHC 配列からなる活性部位が表面に露出しているため、速やかにジスルフィド結合を導入する特徴を持つ。これは、一般的な酵素が持つ「鍵と鍵穴の関係」とは異なる「プロミスカス認識特性」によるものである。この寛容な基質認識特性により、ERp46 は高濃度条件下において酸化的フォールディングの進行を促進している。

ERp46 が持つ基質認識特性に着目し、基質認識部位とチオール活性部位を連結した化合物を開発した。基質認識部位には、芳香族性アミノ酸側鎖とホストゲスト相互作用する β -シクロデキストリンを使用した。 β -シクロデキストリンは円錐台形の化合物であり、二つの口の大きさが異なる。主に口の広い側からゲスト分子を認識するため、口の狭い側に修飾を施すのが一般的であるが、今回は基質を曖昧に認識させるため、あえて口の広い側にチオール基を導入した化合物を設計した。このチオール化合物とその二量体であるジスルフィド化合物が持つ効果を確認するため、三つのジスルフィド結合を有する bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI)を用いて、フォールディング促進効果と基質認識特性を評価した。実験結果から、チオール化合物への寛容な相互作用ユニットの導入が、タンパク質フォールディングを促進するうえで効果的であることを見出した。

1. S. Okada. *et al. Chem. Sci.* **2023**, *14*, 7630.
2. T. Muraoka. *et al. Chem. Sci.* **2024**, *15*, 2282.

抗 CLIC1 モノクローナル抗体の結合特性とがん浸潤抑制効果

○今井翔月^{1,2}・Mukherjee Samrat^{2,3}・飯島益巳⁴・山岸彩奈^{1,2,3}・中村史^{1,2,3} (農工大工、²産総研細胞分子工学、³農工大院工、⁴東農大応生) **Binding properties and inhibitory effects on cancer invasion of anti-CLIC1 monoclonal antibody** (Fac. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.¹, Cell. Mol. Biotech. Res. Inst., AIST², Grad. Sch. Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.³, Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.⁴) IMAI, Kazuki^{1,2}; MUKHERJEE, Samrat^{2,3}; IIJIMA, Masumi⁴; YAMAGISHI, Ayana^{1,2,3}; NAKAMURA, Chikashi^{1,2,3}

【背景と目的】塩化物イオン(Cl⁻)排出チャネル1 (CLIC1) は、乳がんや神経膠芽腫等、様々ながん細胞で過剰発現し、Cl⁻排出に伴う水分子の排出により細胞容積を減少させるため、浸潤に寄与することから、創薬標的として近年注目を集める。通常 CLIC1 は可溶性の高い極めて安定な構造をとるが、悪性のがん細胞では膜結合型チャネルに構造遷移するメタモルフィックタンパク質である。可溶型の分子構造は解明されているものの膜結合型は極めて不安定であり、その構造や構造遷移のメカニズムも未解明のままである。我々は今までに AFM を用いた細胞への外力印加により排出される Cl⁻を計測する手法により、膜結合型の CLIC1 発現量が高い悪性のがん細胞ほど、Cl⁻排出量が高いことを示してきた。本発表では、浸潤抑制を目的として新たに開発した抗 CLIC1 モノクローナル抗体の評価結果に関して報告する。

【方法および結果】膜貫通領域の N 末側 24 残基の細胞外領域と推定されるペプチドを抗原としてウサギ抗 CLIC1 モノクローナル抗体を作製した。取得された 11 個のクローンの 24 残基抗原ペプチドに対する結合能は同等であった。可溶型 CLIC1 に対する結合を ELISA により調査した結果、結合性の低いクローンが存在した。可溶型 CLIC1 においてエピトープである細胞外領域が分子内に折り畳まれているためであると推察される。これらのクローンは、構造が未解明である膜結合型 CLIC1 に特異的な抗体として、悪性がん細胞の識別に利用できる。さらに、AFM による Cl⁻排出の阻害効果と創傷治癒アッセイによる浸潤阻害効果を検証した。次にマウス乳がん細胞に抗体を添加し外力印加に伴う Cl⁻排出を調べた結果を図 1 に示す。Cl⁻チャネル低分子阻害剤である IAA-94 と比較して、取得されたクローンには高い Cl⁻排出阻害能を示すものと、全く示さないものが混在することが分かった。創傷治癒アッセイの結果も同様であり、Cl⁻排出阻害能の高いクローンは、遊走阻害能も高いことが明らかとなり、本研究で取得されたモノクローナル抗体は、膜結合型 CLIC1 特異的であり、将来的に、細胞診断やがん転移抑制抗体薬としての応用が期待される。

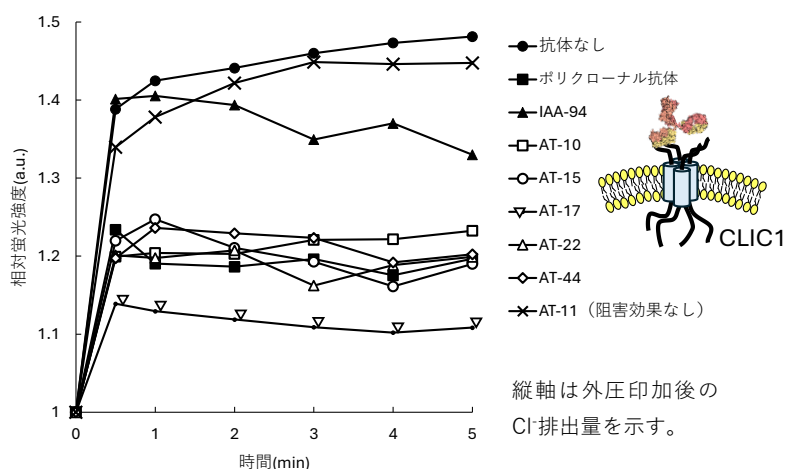


図 1 モノクローナル抗体によるマウス乳がん細胞の Cl⁻排出阻害

生体直交反応による光薬理学リガンドのタンパク質内合成を基盤とした機能化 DNA encoded library への展開

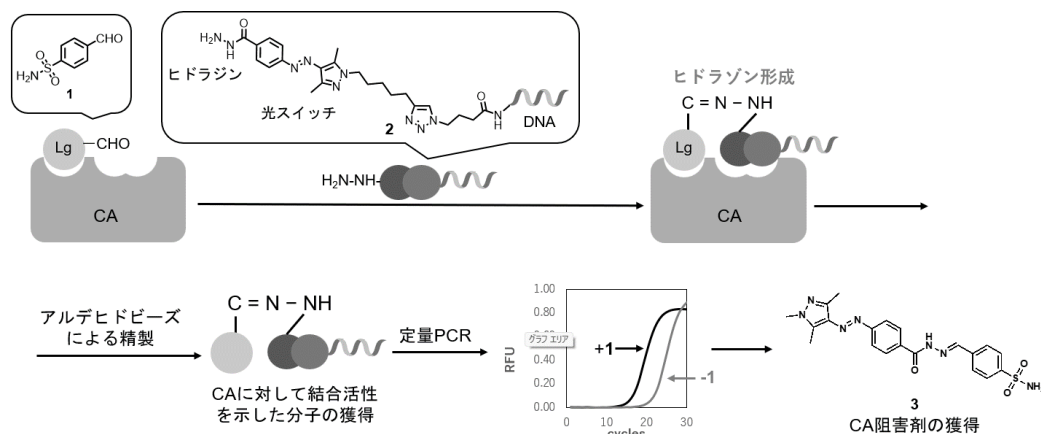
○瀬川友香¹・藤原壮汰¹・松尾和哉¹・和久友則¹・小堀哲生¹ (1京工繊大)

Development of functional DNA-encoded library based on in-protein synthesis of photopharmacological ligands using bioorthogonal chemistry (Kyoto Institute of Technology¹) SEGAWA Yuka¹; FUJIWARA Sota¹; MATSUO Kazuya¹; TOMONORI Waku¹; KOBORI Akio¹

タンパク質の小分子リガンドにアゾベンゼンなどの光スイッチを融合させた光薬理学リガンド⁽¹⁾は、時空間制御能に優れた外部刺激である「光」を利用して、タンパク質の活性を可逆的にスイッチングできる。光薬理学リガンドを使用することで様々な生命現象を光操作できると期待されるが、光薬理学リガンドは、光スイッチ構造をタンパク質リガンドへと巧妙に導入する必要があり、その獲得自体が困難であることが多い。現状、多くの光薬理学リガンドは偶発的な獲得に依存しており、光薬理学の戦略を適用できるタンパク質は極めて限定的である。この課題を克服することを目指して、本研究では、生体直交型反応を利用したリガンドのタンパク質内合成を基盤として、光薬理学リガンドを効率的に探索するための機能化 DNA encoded library (f-DEL) を確立することを目的とした。

本手法の proof-of-principle を確認するため、標的タンパク質として炭酸脱水酵素 (CA) を選択した。CA の阻害剤として知られる benzenesulfonamide にアルデヒド基を導入した化合物 **1** を用い、光スイッチとして機能する arylazopyrazole 誘導体にヒドラジン基と識別のための DNA 鎖を導入した化合物 **2** を、CA の存在下で混和した溶液を準備した (Scheme 1)。この時、**1** と **2** が CA の阻害剤結合ポケット内において近接すると、ヒドラゾン結合を効率的に形成すると考えられる。アルデヒドビーズによる洗浄後 (近接しない場合は、この段階で除去される) の溶液を定量 PCR 法で解析した結果、**1** の有無の違いで Ct 値に大きな差が生じたことから、CA と結合活性を示す化合物を、本手法により同定することが示唆された。実際に、**2** の DNA 鎖を排除し、**1** とヒドラゾン形成させた化合物 **3** を別途合成し、CA に対する阻害活性を解析したところ、有効な阻害剤となることが確認された。

今後は、種々の光スイッチ誘導体を用いて DNA encoded library 法⁽²⁾へと展開し、光照射することで光スイッチ部位の構造変化を誘起した場合に CA との結合活性が劇的に変化する組み合わせを探索することで、効率的な光薬理学リガンドを獲得する。発表では、光薬理学リガンドを探索するための f-DEL 法の詳細を、今後の展望とともに議論する。



Scheme 1. Schematic workflow of this study

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

(2) S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 5381.

高濃度条件で酸化的タンパク質フォールディングを促進する超分子材料の開発とその作用機序の理解

○喜多村真衣¹・奥村正樹²・齋尾智英³・村岡貴博^{1,4} (¹ 農工大院工、² 東北大FRIS、³ 徳島大先端酵素学研究所、⁴ KISTEC)

Development of oxidative protein folding promoters functioning under high concentrations and understanding of their mechanisms (Graduate School of Engineering, Tokyo Univ. Agric. Technol.¹, FRIS, Tohoku Univ.², Institute of Advanced Medical Sciences, Tokushima Univ.³, KISTEC⁴) KITAMURA, Mai¹; OKUMURA, Masaki²; SAIO, Tomohide³; MURAOKA, Takahiro^{1,4}

細胞内はタンパク質などの生体高分子が高濃度に存在する分子混雑環境である。新生タンパク質は、この混雑環境下で、活性を持つ天然構造へフォールディングされている。ここで、新生タンパク質の一部が非天然構造へミスフォールドされることがある。非天然構造タンパク質は、分子表面に露出した疎水性領域の間での非特異的な疎水性相互作用により、不可逆的に凝集体を形成する。さらに、生体内で凝集体が蓄積することで神経変性疾患の発症につながる。細胞内では分子シャペロンや酸化還元酵素によりタンパク質の品質が管理されており、凝集体の蓄積が軽減されている。たとえば、酸化還元酵素の1つである Protein Disulfide Isomerase (PDI) はジスルフィド (SS) 結合形成を伴う酸化的タンパク質フォールディングの促進に関与している。PDI は分子表面の活性部位と分子内部の基質認識部位により構成されている。PDI の活性部位ではレドックス活性な SS 基により基質に対する天然型の SS 結合の形成が促進されている。また PDI の基質認識部位では疎水性空間によりフォールディング中間体が捕捉され、基質の凝集が抑制されている。

これまでに PDI の活性部位の機能に着目した低分子化合物が開発され、試験管内希薄条件での効率のよいタンパク質フォールディングが達成されている¹。ここで、細胞内のような高濃度条件で機能する酸化的タンパク質フォールディング促進剤を開発することで、抗体医薬などのバイオ医薬品の生産効率化が期待できる。その実現に向け、本研究では、PDI の基質認識部位を模倣した疎水性空間と、レドックス活性な SS 基を連結した超分子ミセルを開発した。開発したミセルは、その疎水性領域で変性状態のタンパク質と相互作用し、表面のレドックス活性部によりタンパク質への天然型の SS 結合形成を促進すると考えられる (図 1)。

実際に分子内に3つのSS結合を有するタンパク質

Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI) を用いて、開発した材料の効果を調べた。Sub-millimolar の還元変性 BPTI に対して開発したミセルを作用させた結果、BPTI の凝集が抑えられ、BPTI は天然構造へと高効率にフォールディングされることが示された。疎水性空間のみの超分子ミセルでは、BPTI のフォールディングはほとんど進行せず、またレドックス活性部のみの化合物では、BPTI の凝集が見られた。したがって、開発したミセルは、タンパク質に対する凝集抑制効果と天然型の SS 結合形成を促進する効果を両立した機能を有すると考えられる。ミセルと還元変性 BPTI の相互作用機序を調べるため、NMR による sPRE 効果を評価した。その結果、ミセルが BPTI の比較的疎水性な領域に吸着することが示され、この吸着によって BPTI に対する凝集抑制効果が発現されたと考えられる。

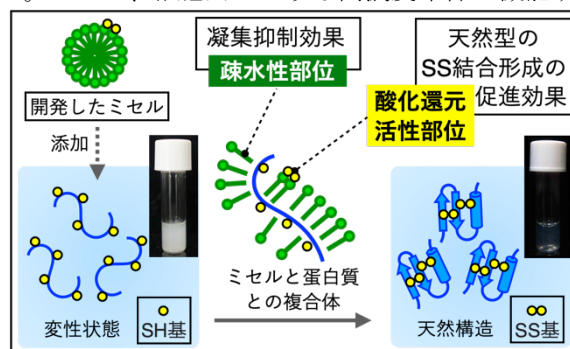


図 1. 本研究のコンセプト

1. T. Muraoka, *et al.*, Chem. Sci. 15, 7, 2282–2299 (2024).

Development of covalent monobody-tag based on proximity-induced reactivity

NGUYEN, Kim Chung¹; MIYAZAKI, Tomoki³; TSUKIJI, Shinya³; FUJINO, Tomoshige¹; HAYASHI, Gosuke¹; MURAKAMI, Hiroshi^{1,2} (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University². Department of Life Science and Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology³)

Protein tags, such as HaloTag, SNAP-tag, or PYP-tag, are widely used in bioimaging and biotechnology for applications like visualizing intracellular proteins, controlling location of proteins, and sensing metabolites ^{1,2}. We previously developed a novel protein-tag-based on the high-affinity interaction ($K_D = 8.5$ nM) between an artificial antibody (monobody) and the small molecule 1-(4-hydroxyphenyl)-3-phenylurea (HPPU), demonstrating its application in cell imaging ³. While non-covalent interactions are beneficial in many contexts, covalent protein tags are highly desirable for applications that require a stable linkage between the protein and substrate over an extended period, such as pulse-chase labeling experiments or protein trafficking studies. In this study, we report the development of a covalent HPPU-monobody system, which features fast labeling kinetics ($k_{app} = \sim 10^4$ M⁻¹s⁻¹) and a compact protein tag (monobody MW ~ 11 kDa).

Based on a proximity-induced reaction strategy, we designed three monobody variants with a cysteine residue positioned to react with a chloroacetamide installed on the HPPU-peptide substrate (Figure 1). All three monobody variants retained high binding affinity towards HPPU, with K_D values ranging from 7 to 22 nM. We also synthesized thirteen peptide substrates with linkers of varying characteristics (R group) to optimize the *in vitro* alkylation reaction. Using a gel-shift assay, we evaluated the *in vitro* alkylation reaction and observed up to a 12-fold change in reaction efficiency among peptide substrates, indicating that the characteristics of the R group in the linker significantly affect the reaction efficiency. We identified monobody - peptide substrate pairs that achieved complete reaction within minutes.

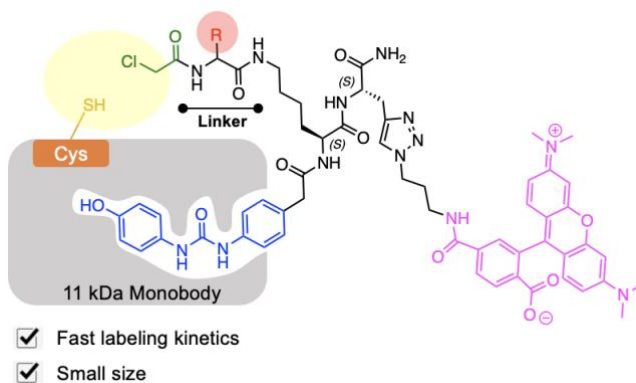


Figure 1. Schematic of covalent HPPU-Monobody tag

The optimized monobody - peptide substrate pairs exhibited rapid labelling kinetics, with a reaction half-life ($t_{1/2}$) of approximately 2 minutes, and apparent rate constants (k_{app}) of 2×10^4 M⁻¹s⁻¹.

We envision that the rapid formation of the covalent linkage, combined with the small size of the monobody, will make the covalent HPPU-monobody a valuable tool for studying and controlling biological processes.

- 1) Hoelzel CA, Zhang X., Chembiochem., 21(14):1935-1946 (2020).
- 2) Ishida M., Watanabe H., Takigawa K., Tsukiji S., J Am Chem Soc., 135(34):12684-12689 (2013)
- 3) In preparation.

細菌細胞表面ファイバータンパク質のメチル化修飾

○井上翔理・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

Methylation of a fiber protein on the bacterial cell surface (Graduate School of Engineering, Nagoya University) INOUE, Shori; YOSHIMOTO, Shogo; HORI, Katsutoshi

タンパク質翻訳後に生じるリシン残基のメチル化修飾は、真核生物においてエピジェネティクス、転写調節、シグナル伝達など、細胞内のさまざまな生物学的プロセスを制御する重要な因子である。さらに近年、一部の病原性細菌の細胞表面タンパク質や分泌タンパク質は、リシン残基にメチル化修飾を受けており、その感染性に寄与していることが報告された (1, 2)。しかし、原核生物におけるリシン残基のメチル化修飾は、ごく一部の病原性細菌でしか研究されておらず、その多くは未解明である。

排ガス処理リアクターより単離されたトルエン分解細菌 *Acinetobacter* sp. Tol 5 は、菌体表面に存在するファイバー状のタンパク質を介して自己凝集性と様々な固体表面へ強力な付着性を示す (図 1)。この性質を利用して、固定化が容易な全細胞触媒としての応用が進められている。Tol 5 の菌体表面には、多種のファイバーが存在するが、中でもホモ三量体のアドヘシンである Trimeric autotransporter adhesin (TAA) ファミリーのファイバータンパク質 AtaA が、Tol 5 の特徴的な自己凝集性と付着性を媒介することが明らかとなっている。そのため、AtaA の機能に着目した構造解析や異種発現による工学的応用に向けた AtaA の改変が行われてきた (3)。

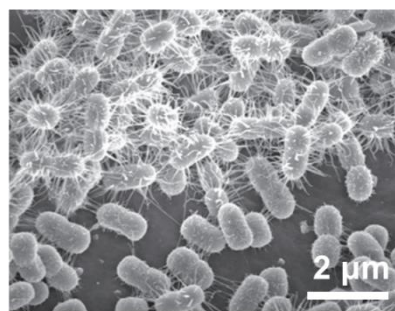


図1. ファイバー状のタンパク質を介して凝集する *Acinetobacter* sp. Tol 5

本研究では、Tol 5 細胞のラベルフリー定量プロテオミクスを実施し、細胞表面を構成するファイバータンパク質を同定した。その解析の中で、偶然にも、ファイバータンパク質の中で AtaA のみが、多数のリシン残基にメチル化修飾を受けることを発見した。AtaA は 3,630 個のアミノ酸からなり、234 個のリシン残基を含むが、その 130 個以上のリシン残基がメチル化されていた。これは既報のタンパク質の中で最も多数のメチル化修飾を受ける例となる。さらに、バイオインフォマティクス解析により AtaA を選択的にメチル化する新規の外膜タンパク質リシン残基メチル化酵素 KmtA を同定した。KmtA 欠損株が発現する AtaA はほとんどメチル化されないことから、KmtA が AtaA 全体のリシン残基のメチル化に関与していることが示された。アミノ酸配列の類似性に基づいた解析によると、KmtA に類似したアミノ酸配列はグラム陰性菌に広く分布しており、様々な細菌で TAA や関連する外膜タンパク質がメチル化されている可能性が示唆された。KmtA を欠損した Tol 5 では細胞表面の AtaA が増加し、菌体の付着性が上昇した。さらに、AtaA を介した付着性が発揮される無機塩培地中での増殖が野生株より遅くなったことから、KmtA が Tol 5 の増殖に寄与していることが明らかとなった。

これらの結果は、多数リシン残基のメチル化修飾が一部の病原性細菌に限らず幅広い細菌において生理学的特性に関与している可能性を初めて示すものであり、細菌の感染防止やバイオテクノロジーへの応用において重要な有益な知見となる。

(1) J. A. Horstmann *et al.*, *Nature Communications* 2020.

(2) P. Engström, *et al.*, *Science Advances*, 2021.

(3) S. Yoshimoto *et al.*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024.

外的刺激による pH 応答性伸縮タンパク質集合体の運動制御

○罇村颯太¹・伊達弘貴¹・Thuc Toan Pham¹・Xin Li¹・菊池幸祐¹・上野隆史¹ (1 東工大生命理工)

Controlling the motion of pH-responsive piston protein assemblies by external stimuli (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology¹) MASUMURA, Souta¹; DATE, Koki¹; PHAM, Toan Thuc¹; LI, Xin¹; KIKUCHI, Kosuke¹; UENO, Takafumi¹

タンパク質は自己集合によってナノメートルからマイクロメートルスケールの構造体を形成し、様々な分子機能を発現している。また、タンパク質は環境に応答してその構造や集合状態を変化させる能力がある。たとえばタンパク質カルモジュリンは Ca^{2+} と結合することによって α ヘリックス構造が変化する。しかしながらこうした単量体のナノメートルレベルの構造変換を連動させてマクロスケールの運動を実現する分子設計はいまだに困難とされている。

そこで我々は、ゾウリムシの細胞内共生体によって形成されるタンパク質超分子、51 型 Refractile body (R-body) に着目した。R-body は、一般的なナノレベルのタンパク質構造変化とは一線を画す、マイクロレベルの巨視的変形を実現する集合体である¹。このタンパク質超分子は、pH 5 と pH 7 の間で 400 nm のロール状リボン構造から 20 μm のらせん状リボン構造に可逆的に伸縮する (Fig. 1a)²。R-body は RebA、RebB、RebC、RebD と呼ばれる 4 種のタンパク質の共発現によって細胞内で合成される。R-body は細胞内で自発的に形成され、化学的刺激をセンシングして運動に変換する材料としての利用が期待されるが、先行研究では、その原子レベルの構造は未だに解明されていない。

R-body は pH 応答性のピストンタンパク質超分子ある。pH 応答には電荷をもつアミノ酸側鎖のプロトン化が寄与していると考えられる。そこで、金属イオン応答的な伸縮制御も可能になると考えた。本研究では、溶液中金属イオンによる R-body の pH 応答の変化の同定をおこなった。R-body は大腸菌で発現させ、先行研究に従って菌体をヌクレアーゼとリゾチームで処理することで精製した²。精製後の WT は無色の微粒子状固体として得られた。SDS-PAGE によって目的物が単離されたことを確認した。精製した R-body を用いて、pH 応答性を位相差顕微鏡観察によって調べた。

観察の結果、溶液中の金属イオンの種類に依存して、R-body の pH 応答点が低下していることが確認された。この結果より、R-body は変異などを必要とせず、外部環境だけで応答性を変化させられることが示唆された。今後は金属イオンを用いた R-body の運動制御や、金属イオンの作用機構を AlphaFold3 の予測モデルなどを用いて考察していく (Fig. 1b)。

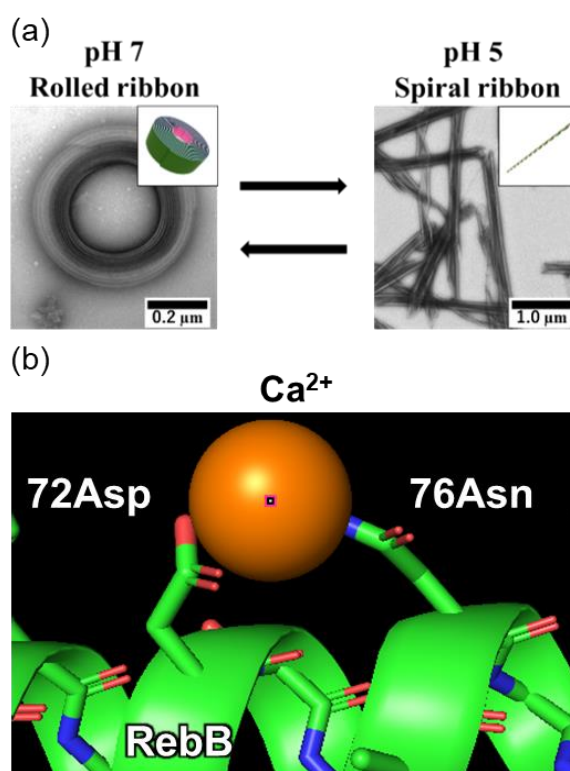


Fig.1 (a) TEM image of R-body.² (b) AlphaFold3 model for RebB and metal ions (Ca^{2+}).

1. Pond, F. R. *et al.*, *Microbiol. Rev.* 53, 25-67, 1989.
2. Polka, J. K. *et al.*, *ACS Synth. Biol.* 5, 303-311, 2016.

ジャスモン酸関連主要転写因子 MYC に対する選択的低分子阻害剤の開発

○劉 瑞琦¹、三野光識²、出井晶子²、吉田稔²、上田実^{1,3}、高岡洋輔¹

(¹東北大院理、²理研 環境資源科学研究センター、³東北大院生命科学)

Development of selective small-molecule inhibitors for the Jasmonate-related master transcription factor MYC (Graduate School of Science, Tohoku University¹, RIKEN Center for Sustainable Resource Science², Graduate School of Life Sciences, Tohoku University³) LIU, Ruiqi¹; MINO, Koshiki²; IDEI, Akiko²; YOSHIDA, Minoru²; UEDA, Minoru^{1,3}; TAKAOKA, Yousuke¹

植物ホルモンであるジャスモン酸(JA-Ile)は、植物の生長や老化、虫害や病害に対する防御応答などを制御する重要な分子である。JA-Ile は植物体内でユビキチンリガーゼ F-box タンパク質の COI1 と転写リプレッサー JAZ 間のタンパク質間相互作用を誘起し、JAZ がユビキチン化を介して分解されることで、JAZ によって抑制されていた転写因子が転写メディエーター(MED25)を介して活性化され、様々な遺伝子の発現を引き起こす(図1)^[1]。モデル植物シロイヌナズナにおいて、JA-Ile の下流には25種類以上の転写因子がコードされており、これら転写因子がお互いにクロストーク制御を受けることなどで様々な応答が厳密に制御されると考えられているが、詳細は不明である^[2]。そこで本研究では、複雑なジャスモン酸シグナル伝達を解析・制御するためのケミカルツールとして、ジャスモン酸主要転写因子である MYC ファミリーに対する選択的な阻害剤の開発を目指した。

これまでに我々は、MYC の抑制および活性化の際に起こるタンパク質間相互作用 (MYC-JAZ および MYC-MED25) を *in vitro* で安定に評価する系を開発しており^[3]、これを用いた MYC 阻害剤のハイスループットスクリーニングシステム(HTS)を構築し、既知低分子阻害剤ライブラリーを評価した結果、いくつかのヒット化合物を同定することに成功した^[4]。さらにこれらの候補分子のうち環状ペプチド型阻害剤の一つが、植物体内でも MYC 下流遺伝子の発現を抑制することが確認された。ただし、同時にオフターゲット効果として重篤な生長阻害作用があることも判明した。そこで結晶構造解析が為されている MYC3 に対する *in silico* ドッキング試験を行い^[5]、MYC との相互作用に関与しない部分の構造最適化などを行なった結果、MYC 阻害能を保持しつつ、副作用の大幅な低減に成功した。本発表ではこれらの分子設計の一連の流れと、得られたリード化合物の植物体内での機能、およびジャスモン酸シグナル伝達機構の制御について詳細を報告する。

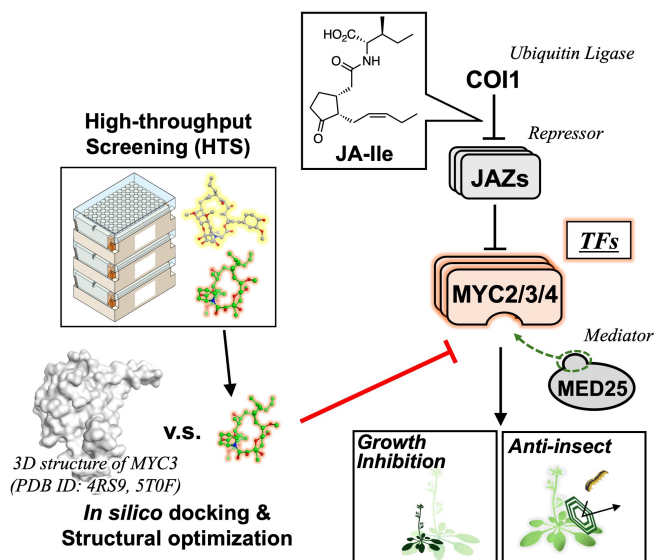


図1. ジャスモン酸シグナル伝達経路の概要
及び MYC 阻害剤の HTS と構造最適化。

REFERENCES

- [1] Wasternack, C., *et al.*, *Ann. Bot.* **111**, 1021 (2013). [2] Chini, A., *et al.*, *Curr. Opin. Plant Biol.* **33**, 147-156 (2016). [3] Takaoka, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **298**, 101504 (2022). [4] 劉瑞琦ら, 第17回バイオ関連化学シンポジウム (ポスター発表) (2023). [5] Xu, H. E., Melcher, K., He, S. Y. *et al.* *Nature* **525**, 269 (2015).

合成分子による GLUT4 の膜動態の操作

○御手洗 拓真¹、足立 惇弥¹、矢野 君晟²、真鍋 良幸²、堀 雄一郎¹ (¹ 九大院理、² 阪大院理)

Control of GLUT4 Dynamics Using Synthetic Molecules

(Graduate School of Science, Kyushu University¹, Graduate School of Science, Osaka University²)

MITARAI, Takuma¹; YANO, Kumpei²; ADACHI, Junya¹; MANABE Yoshiyuki²; HORI, Yuichiro¹

グルコース輸送体の一種である GLUT4 (Glucose transporter 4) はインスリン刺激により細胞膜上に移行し、血中グルコースを細胞内に取り込むことで血糖値を下げる重要な役割を担っている。一方、2 型糖尿病の患者ではその膜移行が阻害され、効率的にグルコースを取り込むことが出来なくなる⁽¹⁾。未だ GLUT4 の動態には不明な点が多く、GLUT4 の動態の制御は生命科学に加え医学の大きな課題である。

演者らはこれまで、独自に開発した PYP (Photoactive yellow protein) タグを用いるタンパク質ラベル化技術を発展させてきた。PYP タグは細菌由来の小タンパク質で、クマリンや桂皮酸誘導体と特異的に共有結合をすることが知られており、この性質を利用することで PYP タグを融合させた標的タンパク質を標識することができる。これまでに、この PYP タグラベル化技術を利用して、細胞内や細胞膜上の様々なタンパク質を特異的にラベル化・可視化してきた。また、最近では、PYP タグの非天然リガンドを開発し、天然リガンドよりも高速・高効率にタンパク質をラベル化できることを示した⁽²⁾。

GLUT4 には糖鎖が一つ結合しているが、先行研究において、PYP タグラベル化技術を用いて、GLUT4 糖鎖欠損変異体を可視化したところ、細胞膜上に移行した後、膜上に保持することができずすぐに内在化していく過程が観察された^(2,3)。この結果から、糖鎖が GLUT4 の細胞膜上への保持を制御する役割を果たしていることを示してきた。

GLUT4 の細胞膜上への保持を人為的に操作することができれば、その細胞内動態の制御機構に関する知見が得られることに加え、2 型糖尿病の治療法開発にも貢献することが期待される。そこで本研究では、細胞膜に留まることのできない動態異常を示す GLUT4 変異体に対して、PYP タグラベル化技術を利用して合成分子を導入することで、その細胞内動態を操作することを目的とした。(Fig. 1)

本発表では、合成分子の設計の詳細とそれらを用いた GLUT4 変異体のイメージングの結果について報告する。

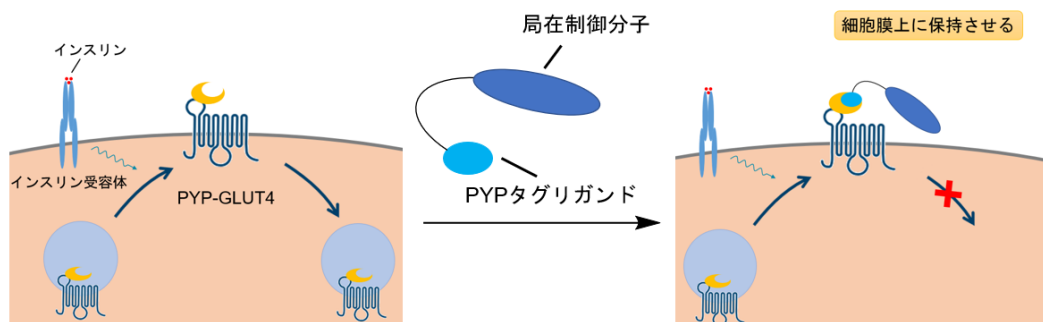


Fig. 1 合成分子による GLUT4 動態の操作

(1) Klip, A. *et al. J Biol Chem.* **2019**, 294, 11369.

(2) Nishiura, M. *et al. Chem. Sci.* **2023**, 14, 5925.

(3) Hirayama, S. *et al. Nat. Chem. Biol.* **2016**, 12, 853.

抗原結合に応答して活性が回復する activatable 型レポーター酵素の開発

○木地陸揮¹・小嶋良輔²・王子儀²・橘椋¹・清家直樹¹・浦野泰照^{1,2} (¹ 東大院薬、² 東大院医)

Development of an activatable reporter enzyme which responds to antigen binding (Grad. Sch. Pharm. Sci., Univ. of Tokyo¹, Grad. Sch. Med., Univ. of Tokyo²) KIJI, Rikuki¹; KOJIMA, Ryosuke²; WANG, Ziyi²; TACHIBANA, Ryo¹; SEIKE, Naoki¹; URANO, Yasuteru^{1,2}

【背景・目的】

微小ながんも蛍光可視化する技術は、例えばがんの外科的切除手術の際に利用することで、取り残しを減らして再発を防止することができるため、非常に有用であると考えられる。このような技術の一例として、がん表面抗原を認識する抗体などのタンパク質に結合したレポーター酵素をがん細胞に集積させ、ここにレポーター酵素により加水分解され発蛍光する小分子蛍光プローブを投与する系¹が挙げられる。しかしこのような系においては、① β -galactosidase などの汎用されるレポーター酵素が一部の正常細胞にも内在的に発現しているため、これによってもプローブが分解されることが多く系の生体直交性が低い、②レポーター酵素の活性が *always-on* であるため、抗原と結合しなかったレポーター酵素もプローブを分解しバックグラウンドシグナルを上昇させてしまう、といった課題がある。近年、当研究室において①の課題を解決すべく、ロドールベースの蛍光団である HMRef に種々の糖を結合した独自の蛍光プローブライブラリーを活用したスクリーニングによって HMRef- β -D-Fucose と Td2F2 (メタゲノム由来の糖加水分解酵素) が生体直交性の高い蛍光プローブ・レポーター酵素として見出された。そこで本研究においては、さらに②の課題を解決すべく、Td2F2 を基盤として、抗原と結合してはじめて活性が大きく上昇するような「*activatable* 型レポーター酵素」の開発を目指す (Fig. 1)。

【方法・結果】

Activatable 型酵素を開発するには、抗原結合に伴って Td2F2 の活性中心に構造変化を引き起こすことが求められる。そこで、*circular permutation* (cp) を導入した Td2F2 の両末端に *nanobody* を分割して融合したタンパクをデザインした。このライブラリー作製に際しては、分割した *nanobody* のプールと複数の cpTd2F2 の発現カセットを DNA アセンブリによってランダムに掛け合わせて発現する独自の手法を確立した。本手法を用いて調製した数百種のセンサー酵素候補に関して、モデル抗原添加前後での酵素活性変化を HMRef- β -D-Fucose を用いて評価した結果、抗原添加前後で数倍の活性上昇を示すプロトタイプセンサー酵素の取得に成功した。続いて、*nanobody* と cpTd2F2 を繋ぐペプチドリンカーの配列をベイズ最適化を用いた実験計画法によって調節したところ、活性上昇の程度を向上させることに成功した。本発表ではこの詳細と将来展望について議論する。

1. M. Kamiya, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 13, 3918-3929 (2007)

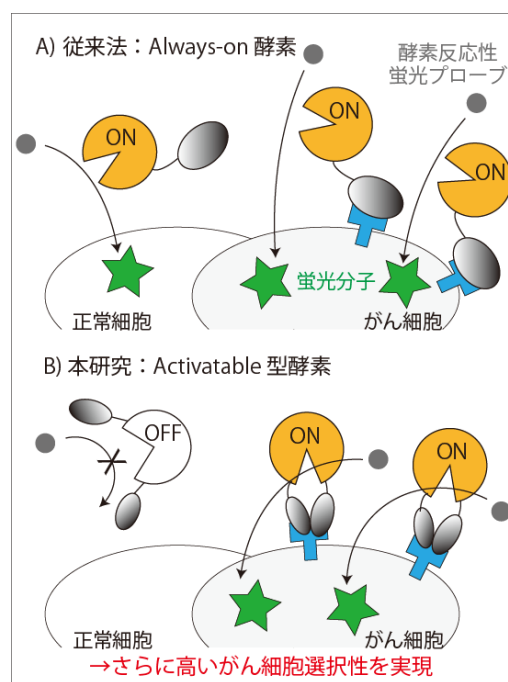


Fig. 1 本研究のコンセプト

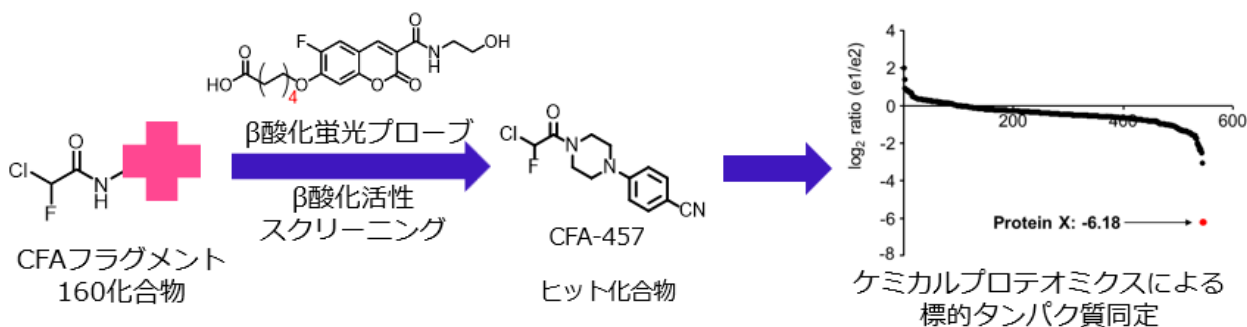
β酸化活性を指標とした代謝フェノタイプスクリーニング

○YIN RUIKANG¹・井上和哉¹・井上咲季¹・Xiao Xiwen¹・内之宮祥平¹・王子田彰夫
(九大院薬)

Phenotypic Inhibitor Screening based on metabolic activity of fatty acid oxidation (¹Graduate School of Pharmacy, Kyushu University) YIN RUIKANG¹, Kazuya Inoue¹, Saki Inoue, Xiao Xiwen, Shohei Uchinomiya¹, Akio Ojida¹

創薬においてスクリーニングはリード化合物を見出すための重要なステップだが、ヒット化合物を得られるかはスクリーニング系とライブラリーの種類に依存する。今回我々は、代謝経路の活性を指標とした代謝フェノタイプスクリーニングを新しいスクリーニング系として提案する。代謝経路の活性はその経路を直接構成する酵素群以外にも、多様な酵素の影響を受ける。そのため、ある代謝経路の活性を指標としてスクリーニングを行うことで、その経路に影響を与える酵素群に対するスクリーニングを同時に行えると考えた。今回我々は標的とする代謝経路として脂肪酸を分解するβ酸化に着目した。β酸化はATP生産に深く関与する代謝経路であり、腫瘍での亢進が報告されている。我々はこれまでにβ酸化活性を生細胞で検出可能な蛍光プローブを開発しており⁽¹⁾、今回のスクリーニングに応用した。また、我々はライブラリーとして、分子量300以下の低分子フラグメントライブラリーに着目した。通常分子量が比較的大きな化合物ライブラリーと比較して、低分子フラグメントは標的タンパク質と結合しやすいことから、小さなライブラリーからもヒット化合物を得やすいという特徴を持つ。特に我々はシステインと選択的に共有結合反応するα-クロロフルオロアセトアミド(CFA)基⁽²⁾を導入したコバレントフラグメントライブラリーを独自に構築している。そこで今回、β酸化蛍光プローブとCFAライブラリーを組み合わせ、生細胞での代謝フェノタイプスクリーニングを行った。

生細胞に約150種類のCFAライブラリー化合物をそれぞれ添加し、プレートリーダーでβ酸化蛍光プローブの蛍光強度を測定した。一次スクリーニング(50 μM, 24 hr)および二次スクリーニング(10 μM, 24 hr)の結果、CFA457をヒット化合物として見出した。続いてCFA457のアルキン誘導体を合成しin-gel 蛍光解析によって細胞内での選択性を評価したところ、選択的なラベル化バンドが検出された。続いてケミカルプロテオミクスを行うことで、protein Xを標的タンパク質として同定した。興味深いことに、protein Xはβ酸化経路を直接構成する酵素ではなかった、また我々は、CFA457が精製protein Xに加えて生細胞でもprotein Xの活性を阻害していることを確認した(IC₅₀ ~ 80 nM)。そこで我々はさらにSARに基づく構造展開を行うことで、protein Xを生細胞内で強く阻害する化合物を見出した(IC₅₀ ~ 7 nM)。これらの結果は、代謝フェノタイプスクリーニングが阻害剤探索に有効な戦略であることを示している。



(1) Shohei U. *et al. Chem. Commun.*, **56**, 3023, (2020)

(2) Naoya S. *et al. Nature Chemical Biology*, **15**, 250–258, (2019)

バイオセンシング素子の簡便な構築に向けた DNA-タンパク質間を 均一かつ効率的に連結可能なツールの開発

小宮 英里香¹・〇中島 美月²・三浦 大明¹・塚越 かおり¹・津川 若子¹・早出 広
司³・池袋 一典¹・浅野 竜太郎¹ (¹農工大院工、²農工大工、³UNC/NCSU 共同生命
医工)

Development of a stoichiometric and irreversible DNA-Protein linking tool for the convenient fabrication of biosensing elements (Grad. Sch. of Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.¹, Dept. of Eng., Tokyo Univ. Agric. Technol.², Joint Dept. of Biomed. Eng., The Univ. of North Carolina at Chapel Hill and North Carolina State Univ.³) KOMIYA, Erika¹; NAKASHIMA, Mizuki²; MIURA, Daimei¹; TSUKAKOSHI, Kaori¹; TSUGAWA, Wakako¹; SODE, Koji³; IKEBUKURO, Kazunori¹; ASANO, Ryutaro¹

DNA-タンパク質複合体は、分子認識能を有する核酸
アプタマーと化学発光等のシグナルを発する酵素を用
いることで検出素子への応用が期待できるが、DNA お
よびタンパク質双方の機能を十分に保持し、均一かつ共
有結合性の複合体を簡便に作製する手法は確立されて
いなかった。本研究では、DNA 共有結合タンパク質と
タンパク質間連結モジュールである SpyCatcher/SpyTag
を組み合わせることで、DNA とタンパク質を均一かつ効率的に複合体化可能なツールを開発し
(図)、バイオセンシング素子の簡便な構築を試みた。

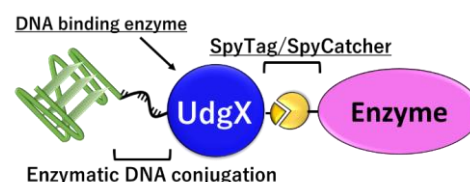


図 DNA-タンパク質複合体の作製

文献情報等をもとに DNA 共有結合タンパク質を網羅的に探索し、選択した 4 つの DNA 共有結
合タンパク質と、それぞれに SpyTag を末端に融合した分子を大腸菌により組換え生産した。DNA
との結合効率は、SDS-PAGE における移動度で評価した。DNA-タンパク質間連結ツールとしての
利用を検討するため、SpyCatcher を末端に融合したグルコース酸化酵素 (GOx) と 4°C で 24 時間
反応させたのち、ヒトヘモグロビン (Hb) を認識するアプタマーを反応させた。各種複合体形成
は、SDS-PAGE により確認した。得られたアプタマー-GOx 複合体の結合能は、Hb を固定化した
プレートを用いて蛍光修飾アプタマー由来の蛍光を指標に測定し、また酵素活性は、HRP 存在下
グルコース添加による Quinonemine dye の吸光度変化を測定することで評価した。

選択した 4 つの DNA 共有結合タンパク質の評価結果を踏まえて、核酸との結合効率が最大
93.2%であったウラシル DNA グリコシラーゼ (UdgX) を以降の評価に用いた。C 末端に SpyTag
を融合した UdgX と SpyCatcher 融合 GOx を用いて複合体化させ、SDS-PAGE により評価した結
果、理論分子量付近に明瞭なバンドが確認された。またさらに Hb 認識核酸アプタマーと反応さ
せた結果、期待する位置にバンドが確認されたことから、4°C で混合するのみで共有結合性のアプ
タマー-GOx 複合体が形成されたことが示唆された。このアプタマー-GOx 複合体は、アプタマー
と酵素それぞれ単独と同等の結合能と酵素活性を有していることも確認された。さらに、2 種の
トロニン結合アプタマーと、酵素として GOx あるいはグルコース脱水素酵素を用いて、それぞ
れの複合体を作製し評価した結果、いずれも機能を保持していることが確認されたため、本ツ
ールの汎用性を示すことができた¹⁾。

1) Komiya E., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **146**(6), 4087-4097 (2024)

近接効果を利用した新規架橋酵素融合タンパク質による部位特異的な抗体フラグメント修飾

○室園晃輝¹・西岡莉子¹・内田和希¹・川口喜郎¹・木村道夫¹・神谷典穂^{1,2} (¹九大院工、²九大未来化セ)

Proximity-based site-specific modification of antibody fragment by novel fusion proteins of cross-linking enzyme (Graduate School of Engineering¹, and Center for Future Chemistry, Kyushu University²)

MUROZONO, Koki¹; NISHIOKA, Riko¹; UCHIDA, Kazuki¹; KAWAGUCHI, Yoshiro¹; KIMURA, Michio¹; KAMIYA, Noriho^{1,2}

抗体-薬物複合体 (ADC) は、抗体の標的特異性と低分子薬物の高い薬効を併せ持つ次世代医薬品として注目されている。抗体の Fab を利用した抗体フラグメント-薬物複合体 (AFDC) は、全長抗体と比べて分子量が約 1/3 であり、腫瘍組織への浸透性が高いことが報告されている。従来 AFDC の作製に用いられてきた化学修飾法は、高い反応効率を示す一方で、薬物結合数の制御が困難なことから、均一な生成物を得るための抗体断片への部位特異的修飾法が必要となる。近年、ネイティブ抗体の部位特異的な修飾法として、抗体結合タンパク質による抗体への近接効果を利用した架橋酵素を用いた手法が提案されている¹。当研究室では、微生物由来トランスグルタミナーゼ活性型前駆体 (EzMTG²) の C あるいは N 末端に、Fab 領域に特異的に結合する protein G (pG) を融合した EzMTG-pG、pG-EzMTG を設計し、これらの融合酵素が IgG 抗体の特定の Lys 残基 (K65, K225) をそれぞれ選択的に修飾可能であることを見出した。そこで、上述の 2 種類の融合酵素を用いて、Fab 配列中の Lys 残基への部位特異的な蛍光ラベル化と蛍光修飾 Fab の機能評価を試みた (Fig. 1a)。

まず、IgG 抗体 (trastuzumab) に蛍光ラベル化 Gln 基質を修飾後、プロテアーゼ処理で断片化する方法 (戦略 1) と、Fab を事前に調製した上で Gln 基質を修飾する方法 (戦略 2) により得られた蛍光色素修飾 Fab について、逆相 HPLC による修飾率評価を行ったところ、EzMTG-pG を用いた場合、IgG あるいは Fab に対して、戦略に依存せず 90%以上の修飾率を与えた (Fig. 1b)。一方、pG-EzMTG による修飾では、Fab の修飾率は IgG と比較して有意に向上した (Fig. 1c)。分子モデリングでの物性値計算から、Fab 断片化によって pG-EzMTG の標的 Lys 残基の溶媒露出度が大きく増加したことから、立体障害が断片化により解消され、架橋酵素による修飾効率が向上したと考えられる。特に、既往の IgG の断片化プロトコルを経由する戦略 2 は、Fab の修飾と精製を効率よく行える点で優れていた。さらに、各蛍光色素修飾 Fab は、HER2 陽性細胞に対する抗原結合能を保持していることが確認された。以上のことから、新たに設計した融合酵素が Fab の部位特異的修飾に適用可能なことが示された。

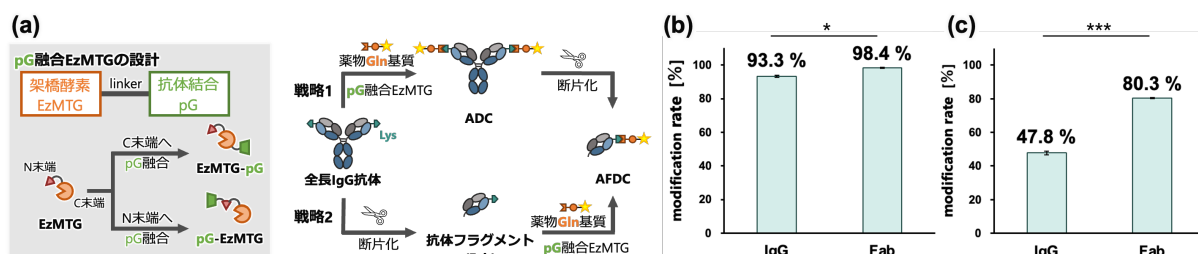


Fig. 1. (a) Conceptual diagram of this research. (b, c) Modification rates of a fluorescently modified Gln-donor substrate by EzMTG-pG or pG-EzMTG. $N = 3$; mean $\pm$ SE; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

【参考文献】 1) W. Yu et al., *Bioconjugate Chem.*, 2021, **32**, 1058.; 2) R. Ariyoshi et al., *ibid.*, 2024, **35**, 340.

【謝辞】AMED 課題番号 JP21ae0121004 並びに JSPS 科研費 JP23H00247 の支援に感謝致します。

リボソームディスプレイ法を用いたアデノシン A2A 受容体の指向性進化

○深澤元喜¹・松岡佑真²・堂浦智裕²・清中茂樹²・松浦友亮³

(¹東工大 生命理工、²名古屋大 生命分子工学専攻、³東工大 地球生命研究所)

In vitro directed evolution of A2A receptor using Ribosome Display (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology¹, Department of Biomolecular Chemistry, Nagoya University², Earth Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology³) FUKASAWA, Genki¹; MATSUOKA, Yuma²; Doura Tomohiro²; KIYONAKA, Shigeki²; MATSUURA, Tomoaki³

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は生体内のシグナル伝達において重要な役割を担う膜タンパク質であり、疾患メカニズムの理解、治療薬の創出のために精力的に研究が進められている。近年、GPCR の変異体を創出し、熱安定性の向上やリガンド選択性の制御をすることで構造解析やバイオセンサーへ応用する研究が注目されている。しかしながら、有用な変異体を同定するためには、多くのトライアンドエラーが必要であり、時間を要するという問題がある。この問題に対し、当研究室では、再構成型無細胞翻訳系で GPCR を *in vitro* 合成し、多様な変異体をスクリーニングできるリボソームディスプレイ (RD) 法による指向性進化を検討してきた¹。しかしながら、活性のある膜タンパク質を試験管内合成し、*in vitro* スクリーニングにおいて有用変異体を同定した例は未だ報告されていない。そこで、本研究では、代表的な GPCR の一つであるアデノシン A2A 受容体 (A_{2A}R) に着目し、*in vitro* 合成および RD 法の適用可能性について検討した後、試験管内指向性進化による有用変異体の獲得を目指した。

無細胞翻訳系に A_{2A}R をコードする DNA と 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG)- nanodisc を加え、37°C で 18 時間インキュベーションすることで A_{2A}R を *in vitro* で合成した。合成した A_{2A}R のリガンド結合能は、アンタゴニストである ZM241385 を蛍光修飾した ZM-Cy3 を用いた Fluorescence Size Exclusion Chromatography (FSEC) によって確認し、合成条件を検討した。次に、検討した合成条件を用いて、Protein-Ribosome-mRNA の三者複合体をビオチン修飾 ZM241385 (ZM-PEG12-Biotin) 共存下で合成し、Streptavidin ビーズによって mRNA を回収できるかどうかを検証した。ZM を代わりに加えた場合と比べて ZM-PEG12-Biotin 添加時には 1000 倍程度の mRNA を回収することできた。続いて、A_{2A}R への RD 法の適用が示唆されたのでスクリーニングの対象となる DNA ライブラリを作成した。

リガンドとの親和性が変化した変異体を取得するために細胞外ループに着目し、飽和変異を導入した 2 つの DNA ライブラリを作成した。作成した変異体ライブラリを用いて RD 法により *in vitro* スクリーニングをおこない、各ラウンドでの変異体の多様性を NGS で解析した。

今後の展望としては、引き続き *in vitro* スクリーニングをおこなうと共に、得られた NGS データを解析することで有用変異体の同定および配列-機能の関係を明らかにすることを目指す。

【参考文献】

1. Nakai H. et al. (2022) *Anal Chem*, **94** (9), 3831-3839

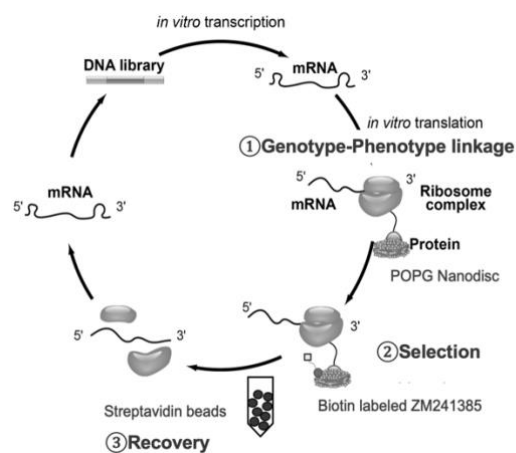


Fig.1 Schematic view of Ribosome Display

マグネトソーム膜上の脂質組成調節による膜受容体の機能解析

○小林茉優香・巴瞭斗・田山爽也華・藤本一嗣・田中剛・吉野知子（東京農工大院工）

Functional analysis of membrane receptors expressed on magnetosome by modifying membrane lipid compositions (Institute of Engineering, Tokyo Univ. Agric. Technol.) KOBAYASHI, Mayuka; TOMOE, Ryoto; TAYAMA, Sayaka; FUJIMOTO, Kazushi; TANAKA, Tsuyoshi; YOSHINO, Tomoko

【目的】磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* は、マグネトソームと呼ばれる脂質膜に被覆された磁気微粒子を生合成する。マグネトソームは外部磁場により容易に回収可能であることから、創薬領域におけるハイスループットな化合物探索への応用が期待されている。当研究室では、創薬標的の過半数を占める膜タンパク質に着目し、ヒト由来膜受容体をマグネトソーム膜上に発現させる技術確立してきた。しかし、マグネトソーム膜上の膜受容体は、ヒト細胞上の膜受容体と比較してリガンド親和性が低下することが課題である。その要因の一つとしてマグネトソームとヒト細胞の膜リン脂質組成の違いが考えられる。これまでに、甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR) とヒト細胞に豊富に存在する phosphatidylcholine (PC) を合成可能な磁性細菌 TSHR-PCS 株を作出することで、マグネトソーム膜上に発現させた TSHR のリガンド親和性の向上が示されている。しかし、膜脂質組成と膜受容体機能の詳細な関係は未解明である。そこで、本研究ではマグネトソーム膜脂質中の PC 含有量を調節し、TSHR の発現やリガンド結合能への影響評価を行った。

【方法】TSHR-PCS 株では対数増殖中期において、誘導剤である Anhydrotetracycline (ATc) と PC 合成の基質である Choline を添し、TSHR と PCS の発現誘導と PC 合成を行った。この時、Choline の終濃度を 0, 20, 80, 200 μM とした。獲得した粒子から脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーによるリン脂質組成解析を行った。作出された各マグネトソームに対して、抗 TSHR 抗体を用いた ELISA 法による TSHR の発現量評価、および甲状腺刺激ホルモン (TSH) を用いたリガンド結合試験を行った。

【結果と考察】抽出した各マグネトソーム膜の脂質組成解析を行った結果、PC の含有量は全リン脂質量に対してそれぞれ 6 wt%、13 wt%、20 wt% であることが示され (Fig.)、様々な PC 含有量のマグネトソームの作製に成功した。次に、これらの粒子を用いて、PC 含量と TSHR 機能との関係性を評価した。TSHR 発現量評価を行った結果、マグネトソーム膜中の PC 含量に依らず TSHR の発現量は同等であることが示された。一方で、TSHR のリガンド結合試験を行った結果、PC の導入により TSHR のリガンド結合能向上が示された。また、PC 含有率 6 wt% と 20 wt% において、TSHR のリガンド結合能に有意差は確認されなかったため、TSHR のリガンド親和性は PC 含量に依存しないことが示唆された。以上より、TSHR-PCS 株のマグネトソーム膜における PC 含有率の調節に成功し、リン脂質組成調節によるマグネトソーム膜上 TSHR への機能評価が可能であった。

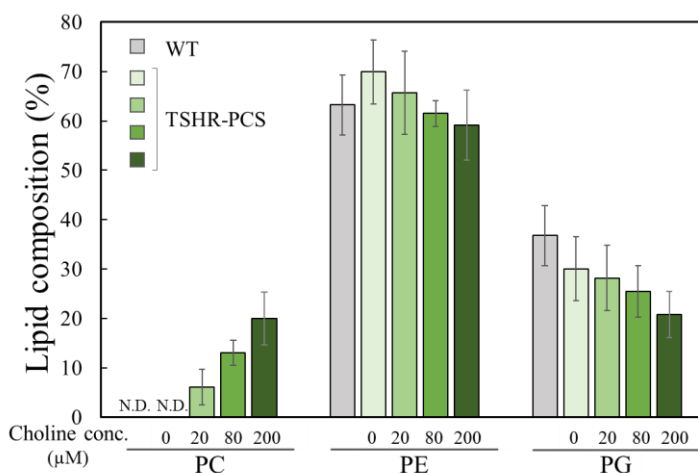


Fig. Lipid composition of the magnetosomes in *M. magneticum* wild-type (WT) and transformants (TSHR-PCS) cultured with various choline concentration.

分岐構造にコードされた機能の抽出を可能とする光架橋型不均一ユビキチン鎖プローブ

○宇野大輝¹・豊田宇咲乃¹・古畑隆史¹・富田拓哉²・佐藤祐介^{3,4}・尾勝圭⁵・深井周也⁵・佐伯泰²・岡本晃充¹ (¹東大院工・²東大医科研・³鳥大院工・⁴鳥大 GSC センター・⁵京大院工)

Photo-crosslinking heterotypic polyubiquitin probes for exploration of ubiquitin functions encoded on the branch structure (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo², Graduate School of Engineering, Tottori University³, GSC center, Tottori University⁴, Graduate School of Science, Kyoto University⁵) UNO, Taiki¹; TOYODA, Usano¹; FURUHATA, Takafumi¹; TOMITA, Takuya²; SATO, Yusuke^{3, 4}; OKATSU, Kei⁵; FUKAI, Shuya⁵; SAEKI Yasushi²; OKAMOTO Akimitsu¹

不均一ユビキチン鎖 (不均一鎖) は構造と機能の多様性に富む翻訳後修飾として近年注目を集めている。その中でも K63/K48 不均一鎖は細胞内で最も豊富に存在し、K48 鎖が誘導するプロテアソームによるタンパク質分解と K63 鎖が誘導する

非分解性シグナルのバランスにより多彩な機能が発揮される^[1-3]。例えば、K63 鎖上への K48 鎖形成は、K63 鎖を酵素的な認識と切断から保護することで免疫応答シグナルを安定化させる^[3]。その一方で、時として K63 鎖を足場にすることで基質タンパク質を分解へと誘導し、その機能を停止させる^[2]。しかし K63/K48 鎖において、基質シグナルの安定化と停止という一見相反する機能の使い分けが可能となる化学的なメカニズムは未解明である。これは、一般にユビキチン鎖とユビキチンシグナルを媒介するユビキチン認識タンパク質群 (URP) との相互作用が弱く、夾雑環境において不均一鎖と URP との相互作用を捕捉し、分岐構造の違いが URP との相互作用に与える影響を、網羅的に定量評価することが困難であったためである。

以上の背景から本研究では、URP との相互作用における不均一鎖の構造-機能関連の網羅的な抽出の実現に向け、光架橋型不均一ユビキチン鎖プローブの開発を試みた。具体的には、ユビキチン鎖と URP との複合体を架橋により安定化させるため、高い反応性を持つ光架橋剤「ジアジリン」を不均一鎖の特定の位置に導入することとした。そこで、システインを介して位置選択的にジアジリンを導入した光架橋型モノユビキチンを、K63 ジユビキチンの近位 (Proximal) または遠位 (Distal) に K48 結合を介して酵素的に導入することで、分岐位置の異なる光架橋型 K63/K48 トリユビキチン鎖を合成した。合成した光架橋型トリユビキチン鎖を、試験管内で URP と混合し、UV 光を照射したところ、Western blotting により光照射依存的な URP との架橋が観察された。さらに、K48 鎖選択的、K63 鎖選択的な URP それぞれについて、分岐位置の異なる K63/K48 トリユビキチン鎖の間で比較したところ、Western blotting のバンド強度から架橋効率の有意な差が確認され、分岐位置が URP との相互作用を調節する構造因子であることが示唆された。本発表では、K48 均一鎖と比較した K63/K48 不均一鎖の機能や、分岐位置が URP との相互作用に与える影響のほか、細胞抽出液中における相互作用解析と定量比較に向けた光架橋型 K63/K48 ユビキチンプローブの応用可能性について議論する予定である。

[1] *Molecules*, **2020**, 25, 5200.; [2] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2018**, 115, 1401-1408.; [3] *Mol. Cell*, **2016**, 64, 251-266.

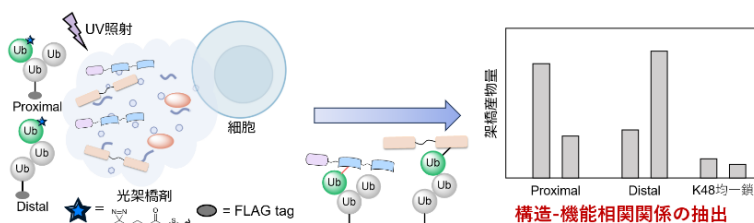


Fig. 1. 光架橋型不均一ユビキチンによる URP 捕捉と相互作用解析

Megavirinae Giant Virus 由来のタンパク質 GciS が持つ新規な 6 核鉄硫黄クラスターの構造と機能

○谷歩峻・野尻正樹（阪大院理）

Structure and function of a novel hexanuclear iron-sulfur cluster in the protein GciS from *Megavirinae Giant Virus*. (Graduate School of Science, Osaka University.) TANI, Hodaka; NOJIRI, Masaki

蛋白質分子内部に含まれる金属（クラスターを含む）の中で、生物界に最も広く存在するものの一つとして鉄硫黄クラスターが挙げられる。鉄原子を無機硫黄原子が架橋した配位構造をとり、一般的なものの詳細は広く調べられている¹⁾。最近、新規な鉄硫黄クラスターを保持する可能性が示唆された、*Megavirinae Giant Virus* 由来のタンパク質 Glycine cysteine rich iron-Sulfur protein (GciS) が報告された²⁾。[3Fe-4S]の組成であるが、一般的なキューバン構造とは異なり直線状に 3 つの鉄が並んだ珍しい構造の鉄硫黄クラスターである Linear 型[3Fe-4S] (Fig1 参照) の存在が各種分光法によって明らかにされた。この Linear 型[3Fe-4S]は 3 つの鉄が 3 価をとった酸化状態において $S=5/2$ をスピン基底状態にとることが ESR 測定から確認されており、キューバン型は同じ酸化状態において $S=1/2$ をとるのに対して、同じ[3Fe-4S]の組成であるが異なる特性を持つことがユニークな点である。このように一般的な鉄硫黄クラスターとは異なる構造と特性を持つ Linear 型[3Fe-4S]についての報告例は数少なく、その詳細はわかっていない。

[3Fe-4S]

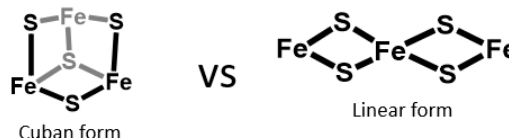
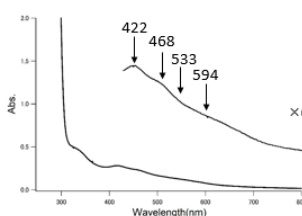


Fig1. [3Fe-4S]がとりうる構造

Spectroscopic

UV-vis



ESR spectrum

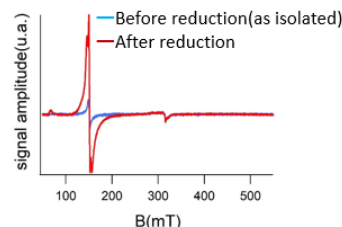


Fig2. MBP-GciSの分光学的解析

報告された Linear 型[3Fe-4S]保持する GciS は His₆-SUMO タグというタグを用いて精製されており、サイズ排除クロマトグラフィーから約 100 量体と凝集していた。本研究では、凝集を防ぐことを目的に His₆-SUMO タグに比べて大きな Maltose-Binding Protein (MBP) タグを付加させた GciS (MBP-GciS) の精製を行った。

得られた MBP-GciS の UV-vis 測定 (Fig2 参照) とサイズ排除クロマトグラフィーを行い、その状態について評価した。その結果から、報告と近い鉄硫黄クラスターを保持する MBP-GciS の精製に成功し、課題であった凝集を防ぐことができた。次に、MBP-GciS に保持された鉄硫黄クラスターを還元し電子スピン共鳴分光 (ESR) 測定 (Fig2 参照) を試みた。その結果、Linear 型[3Fe-4S]を想起させるスペクトル ($g=4.3$) ではあるが、既報のものとは異なるものだった。また、比色定量法を用いて MBP-GciS 分子中の鉄の定量を試みた。その結果、サイズ排除クロマトグラフィーの結果と合わせると、MBP-GciS 分子は 10 量体をとっており鉄が 6 個/10 量体であった。次に、鉄硫黄クラスターを取り除いた apo 型ではどのような状態をとっているかについて調査した。その結果、10 量体は保持したまま Linear 型[3Fe-4S]が一つ抜けたことに相当する鉄原子を 3 個保持した half-apo 型の MBP-GciS を精製できた。

今回、珍しい鉄硫黄クラスターである Linear 型[3Fe-4S]を 2 つ保持する GciS 分子の調製に成功した。今後、Linear 型[3Fe-4S]の詳細な電子構造の解析を行い、一般的な鉄硫黄クラスターとの違いを明らかにしていく。また最近、Linear 型[3Fe-4S]に鉄とは異なる金属を一つ導入したヘテロな 3 核金属クラスターを、今回精製した half-apo 型の GciS に挿入することにも成功した。今後、これも用いて Linear 型 3 核金属クラスターについての更なる理解を深めていく。

- 1) M.-E. Pandelia *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1853**, 1395 (2015).
- 2) Alejandro Villata. *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **145**, 2733. (2023).

相同組換え誘導が可能な Cas9 変異体取得法の開発

○松本 大亮^{1,2}・久保田 小茉利²・Ahmadi Shahram¹・濁川 清美^{1,2}・野村 渉^{1,2} (¹ 広大院医系科学、² 広大薬)

Development of a method for obtaining Cas9 mutants capable of inducing homologous recombination (Grad. Sch. of Biomed. and Health Sci., Hiroshima Univ.¹, Sch. of Pharm. Sci., Hiroshima Univ.²) MATSUMOTO, Daisuke^{1,2}; KUBOTA, Komari²; AHMADI, Shahram¹; NIGORIKAWA, Kiyomi^{1,2}; NOMURA, Wataru^{1,2}

CRISPR-Cas9 が利用され始めてから 10 年以上が経ち、CRISPR-Cas9 を用いた治療薬が承認されたことから、ゲノム編集を用いた遺伝子治療がより現実的なものとなった。一方で、その利用法は遺伝子破壊のみであり、疾患関連配列を健常者の配列に書き換えることは依然として困難である。CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集では、ガイド RNA による標的配列の認識と Cas9 による DNA 二本鎖切断を引き起こし、細胞の持つ DNA 修復機構を活性化する。利用される修復機構には大きく 2 つあり、一つは非相同末端結合、もう一つは相同組換えである。非相同末端結合は効率が高い一方で、ランダムな変異が導入される。相同組換えは、鋳型 DNA に沿った修復を行うため、任意の配列に書き換えることができる。この相同組換えを介した修復は効率が低いため、現在の CRISPR-Cas9 を用いた臨床応用に遺伝子配列修復を利用することのボトルネックとなっている。当研究室では、これまでに細胞周期依存的な活性化を行うことで相同組換え効率を向上させることに成功している (Matsumoto D. *et al. Commun. Biol.* **2020**)。また、既知の High Fidelity Cas9 変異体との組み合わせを検討する中で、一部の Cas9 変異体で野生型 Cas9 よりも高い相同組換え効率を有する可能性が示唆された (Matsumoto D. *et al. Mol. Ther. Nuc. Acids* **2024**)。そこで、本研究では相同組換えを誘発できる Cas9 変異体スクリーニング系の構築と、相同組換え誘発 Cas9 変異体の取得を目的とした。

ジフテリア毒素の受容体として機能することが知られるヒト HB-EGF を標的とし、相同組換えが起こることによってマウス HB-EGF 配列に書き変わることでジフテリア毒素耐性を得る系 (Li S., *et al. Nat. Commun.* **2021**) を利用した。SpCas9 のヌクレアーゼドメインを Error-prone PCR により増幅し、ランダムな変異を有するライブラリを構築した。レンチウイルスベクターに SpCas9 ライブラリ及び自己切断ペプチド配列 (P2A) 並びに緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を搭載した。ヒトテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子を初代培養細胞に導入して作製され、正常な二倍体の核型を有することが知られる細胞株である hTERT-RPE1 細胞に、作製したレンチウイルスを感染させた。SpCas9 変異体を発現する hTERT-RPE1 細胞に対して、エレクトロポレーション法により *HBEGF* 遺伝子標的ガイド RNA をコードするプラスミド DNA、鋳型 DNA、EGFP 遺伝子のオフターゲット配列のみを標的としたガイド RNA ライブラリを導入した。導入から 48 時間後にジフテリア毒素による選抜を行い、同時にノックインされる赤色蛍光タンパク質 (mCherry) の蛍光をもとに FACS にて細胞を分取した。SpCas9 の遺伝子をクローニングし、サンガーシーケンシングによって変異箇所を同定した。

スクリーニングの結果、野生型 Cas9 よりも相同組換え効率の高い傾向のある Cas9 変異体を取得できた。HEK293 細胞を用い、*AAVS1* 遺伝子、*EMX1* 遺伝子、*VEGFA* 遺伝子を標的とした際の相同組換え活性について、詳細に検証した。その結果、*VEGFA* 遺伝子を標的とした際に、一つの変異体において野生型の Cas9 と比較して相同組換え効率の向上 (0.25% → 4.5%) が見られた。また、標的配列における変異導入率に対する相同組換え効率の割合が 27 倍向上した。

今後、スクリーニング系の最適化に加え、相同組換えが向上した理由や標的配列によって相同組換えの活性が異なる理由について検討していく予定である。

Design of Cyborg Proteins by Loop Region Replacement With Oligo(ethylene glycol) (School of Life Science and Technology, Tokyo Inst. Technol.¹, AIMR, Tohoku Univ.², Graduate School of Life Science, Tohoku Univ.³, Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku Univ.⁴, IMRAM, Tohoku Univ.⁵, Medical Device Development and Regulation Research Center, School of Engineering, Univ. Tokyo⁶, Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, Univ. Tokyo⁷, Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, Univ. Tokyo⁸, Living Systems Materialogy Research Group, IRFI, Tokyo Inst. Technol.⁹) YOSPANYA, Wijak^{1,2}; MATSUMURA, Akari³; IMASATO, Yukihiro¹; ITOU, Tomoyuki⁴; AOKI, Yusuke¹; NAKAZAWA, Hikaru⁴; MATSUI, Takashi³; YOKOYAMA, Takeshi³; UI, Mihoko⁵; UMETSU, Mitsuo⁴; NAGATOISHI, Satoru^{6,7}; TSUMOTO, Kouhei^{6,7,8}; TANAKA, Yoshikazu³; KINBARA, Kazushi^{1,9}

Proteins are generally defined as high-molecular-weight polymers composed of amino acids polymerized through peptide bonds. If it were possible to design artificial molecules mimicking protein functions as desired, it would not only extend the applications of conventional proteins but also accelerate the discovery of new functions. However, natural proteins are elaborately designed to express their specific functions, and the majority of them are still too difficult to mimic by artificial compounds.

In this study, we synthesized a “cyborg protein,” wherein a synthetic molecule partially substitutes the main peptide chain by linking two protein domains with a synthetic oligomer. Green fluorescent protein (GFP) served as the model for constructing the cyborg proteins. We prepared circularly permuted GFP (cpGFP) with new termini between $\beta 10$ and $\beta 11$, where the original N- and C-termini were linked by a cleavable peptide loop. The cyborg GFP was constructed from cpGFP by linking the $\beta 10$ and $\beta 11$ with oligo(ethylene glycol) using maleimide-cysteine couplings, followed by the enzymatic cleavage of the N- and C-termini linking loop by thrombin. With the help of machine learning, we were able to obtain the cpGFP mutants that significantly alter the fluorescence activity by thrombin treatment, which splits cpGFP into two fragments (fragmented-GFP), and heat shock. When the cyborg GFP was constructed using this mutant, the change of fluorescence intensity after heat treatment was minimal, similar to cpGFP, and the behavior was significantly different from that of the fragmented-GFP. (Figure 1) This result suggests the possibility that the oligo(ethylene glycol) chain in the cyborg protein plays a similar role to the peptide in the main chain of the protein.

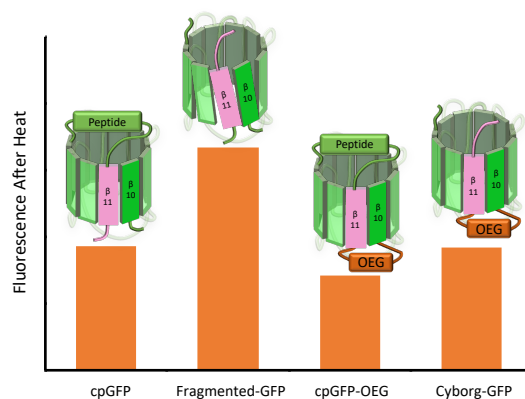


Figure 1. Fluorescence intensity of GFPs after heat treatment.

細胞骨格様 2 成分蛋白質チューブの創生

○野地真広^{1,2,3}・杉田征彦^{4,5,6}・山崎陽祐^{7,8}・宮崎牧人^{6,7,8,9,10}・鈴木雄太^{3,6,9} (1 学振 PD、2 京大院人環、3 京大 iCeMS、4 京大医研、5 京大院生命、6 京大白眉、7 京大院理、8 理研 BDR、9 JST さきがけ、10 信大院総合医理工)

Assembly design of two-component cytoskeleton-like protein tubes. (Research Fellow of JSPS¹, Grad. Sch. Hum. Environ. Stud., Kyoto Univ.², iCeMS, Kyoto Univ.³, Inst. Life Med. Sci., Kyoto Univ.⁴, Grad. Sch. Biostud., Kyoto Univ.⁵, Hakubi, Kyoto Univ.⁶, Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.⁷, RIKEN BDR⁸, PRESTO, JST⁹, Grad. Sch. Med. Sci. Tech., Shinshu Univ.¹⁰) NOJI, Masahiro^{1,2,3}; SUGITA, Yukihiro^{4,5,6}; YAMAZAKI, Yosuke^{7,8}; MIYAZAKI, Makito^{6,7,8,9,10}; SUZUKI, Yuta^{3,6,9}

近年、蛋白質デザインは急速に発展しており、種々の蛋白質高次集合体の構築にも成功している。これらの人工蛋白質高次集合体の多くは単一の蛋白質から成り、構造の均質性や剛直性、安定性に優れている。他方、天然の蛋白質高次集合体の中には複数種の蛋白質の協働によって構築されるものが普遍的に見られ、構造の多様性や柔軟性、動的平衡によって特徴づけられるものも多い。こうした両者の隔たりを埋めるような蛋白質高次集合体のデザインは未だ挑戦的な課題といえ、中でも複数種の蛋白質から成るチューブ状高次集合体のデザインはこれまでに例がない。そこで我々は **Nature-Inspired Protein Assembly Design (NIPAD)** と名付けた独自のデザイン手法によってこの課題に取り組んだ。NIPAD は天然由来の蛋白質の性質を最大限活かした分子のデザインに加え、集合体形成に大きな影響を及ぼす諸条件のデザインを包括しており、これにより我々は **PuuE-M** および **PuuE-p** と名付けた 2 種類の蛋白質から成る細胞骨格様チューブ状人工高次集合体の創生を達成した (図 a)。

透過型電子顕微鏡を用いた観察から、我々のチューブは 24 時間以内に μm オーダーの長さに伸長することが明らかとなった (図 b)。チューブ形成には塩濃度依存性があり、かつアクチン線維のように塩濃度に応じた分解と形成の可逆性をも示した。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析から、チューブ表面の市松模様が構成蛋白質の表裏交互の配向によるものであること、およびチューブには微小管のような対称性の異なる構造多形が存在することが見出された (図 c)。また、チューブを蛍光標識して全反射照明蛍光顕微鏡で観察し、持続長解析を行ったところ、アクチン線維と同程度の値が得られた。この結果から、我々のチューブがアクチン線維と類似の柔軟性を有していることが示唆された。さらに、アクチンの線維形成において重要な役割を果たすとされる **D-loop** を遺伝子工学的に **PuuE-M** に移植したところ、**PuuE-p** との混合で複数のチューブが互いにツイストした高次構造が新たに生じた (図 d)。このツイスト構造は低温で解離するという微小管のような特性を示し、高温では可逆的に再形成した。この結果から、ツイスト構造の形成は疎水性相互作用の寄与によるものであることが示唆された。以上の研究成果について、現在 *bioRxiv* にてプレプリントを公開している*。

*Noji, M. et al. *bioRxiv* 2024.04.17.589732

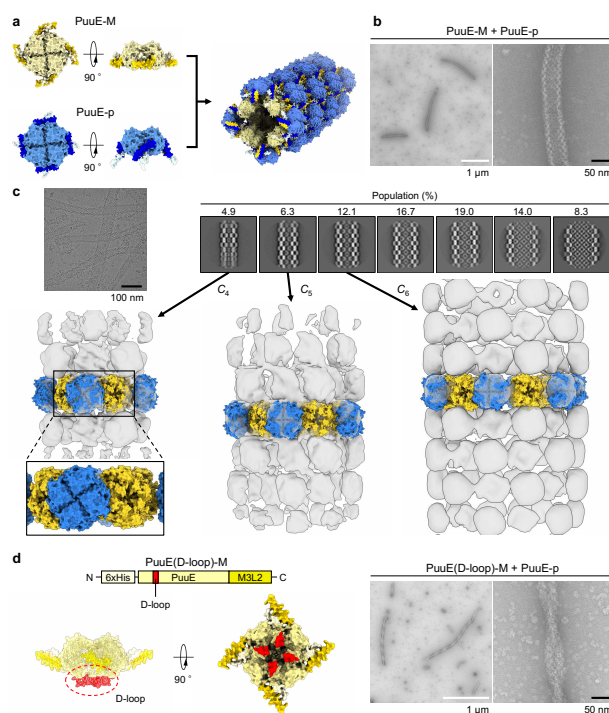


図 本研究の全体像

エピジェネティクスタンパク質を分解誘導する EpiTAC 技術の開発

○安田壮秀¹・森廣邦彦¹・岡本晃充¹（¹東大院工）

Development of EpiTAC to degrade epigenetic related proteins (Graduate School of Engineering, Univ of Tokyo¹) YASUDA, Soshu¹; MORIHIRO, Kunihiko¹; OKAMOTO Akimitsu¹

エピジェネティクスとは、ゲノム DNA の配列情報を超えて遺伝子発現を制御する生体内機構であり、分化、発生、そしてがん化までさまざまな生命現象に関わる。その一つであるシトシンのメチル化は、がんのブレーキ役であるがん抑制遺伝子のプロモーター配列で過剰に起きる。その後、メチル化は抑制遺伝子のサイレンシングによってがん悪性化を引き起こしている。したがって、この高メチル化状態を医薬で正常に戻すことができれば、がん抑制遺伝子を一挙に発現する有望ながん治療戦略となる¹。さらに、脱メチル化したゲノム DNA は微生物由来の核酸と同じように免疫原性を持つため、過度な脱メチル化は全身性エリテマトーデス（SLE）等の自己免疫疾患を引き起こす。それに加えて、脱メチル化はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に寄与することも知られている。以上の背景から、メチル化・脱メチル化の制御は疾患治療の観点で、喫緊の課題として研究されてきた。具体的には、図 1 のように DNMT がシトシンをメチル化し、TET と TDG が 5-メチルシトシンの脱メチル化を行うことから、これらのエピジェネティクス関連タンパク質が創薬標的となる。しかしながら、現在メチル化・脱メチル化を制御する方法はどちらも確立されていない。これは、低分子リガンドでアクセス可能なポケットがエピジェネティクスタンパク質に存在せず、低分子阻害剤の設計が困難なためである。

一方で、低分子阻害剤とは異なるモダリティの PROteolysis Targeting Chimera（PROTAC）技術が近年盛んに研究されている。PROTAC はタンパク質分解による機能喪失を引き起こす技術で、様々なタンパク質に対する PROTAC が従来の阻害剤を上回る治療効果を挙げている。PROTAC 分子は、①標的タンパク質に対するリガンドと②E3 ユビキチンリガーゼに対するリガンド、③両者を結ぶリンカー分子の 3 つからなる。このキメラ分子は、標的タンパク質と E3 リガーゼを強制的に接近させ、標的をユビキチン（Ub）化することで選択的にプロテアソーム分解に誘導する。一連のプロセスを生体内で完遂するためには、標的を強い相互作用でひきとめるリガンドが必須である。そのため、優れた低分子リガンドの発見が困難なエピジェネティクスタンパク質は、PROTAC による創薬標的化も達成されていない。そこで本研究では、DNMT タンパク質ファミリーを治療対象とした核酸ベースの医薬分子の設計及び合成、生体機能の評価を行い、新規エピジェネティクス治療薬の創出を目指す。

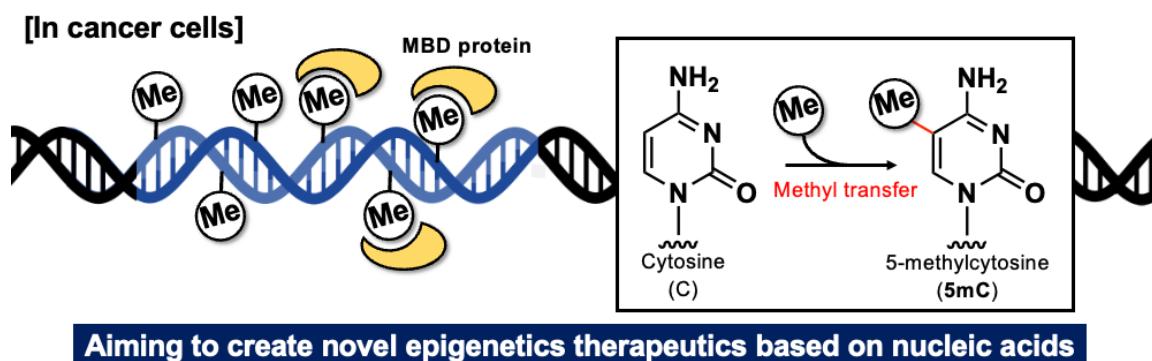


図. シトシン 5 位のメチル化

1. Mellisa, B. P. *et al.*, *Nat. Cancer*. **2021**, 2, 1002–1017

抗菌ペプチド天然物アシルデプシペプチド 1 (ADEP1) による細菌 プロテアーゼ ClpP の機能発現機構の解明および ADEP1 の構造 活性相関研究

○石川文洋¹・高橋幹士²・正林直人¹・秋永修佑¹・本間道夫³・内橋貴之²・田邊
元三¹ (¹近大薬、²名大院理、³名大院工)

A ClpP-activating mechanism of the antibiotic acyldepsipeptide 1 (ADEP1) and ADEP1 structure-activity relationships (Faculty of Pharmacy, Kindai University¹, Department of Physics, Nagoya University², Graduate School of Engineering, Nagoya University³) ISHIKAWA, Fumihiro¹; TAKAHASHI, Kanji²; SHOBAYASHI Naoto¹; AKINAGA Shusuke¹; HOMMA Michio³; UCHIHASHI Takayuki²; TANABE Genzoh¹

抗菌薬剤耐性菌の出現により既存の抗菌薬が効かない感染症が深刻になっており、これまでにない作用機序に基づく抗菌薬の開発が求められている。細菌のタンパク質分解は、タンパク質分解酵素複合体 Clp により高度に制御されている。*Bacillus subtilis* (Bs) の Clp は、セリンプロテアーゼ ClpP と ATPase から構成される (図 A)。¹ ClpP-ATPase 複合体では、ClpP の 7 量体リングが 2 つ積層することで 14 量体を形成し、その 7 量体のリングの両側に ATPase 6 量体リングが結合している (図 A)。ATPase が特定のタンパク質を選択的にほどこしながら、ClpP 内に引き込み、ClpP 14 量体内部でタンパク質を分解する (図 A)。

抗菌ペプチド天然物アシルデプシペプチド 1 (ADEP1) は ClpP に結合すると、ClpP 単独でのタンパク質分解活性を与える (図 BC)。ClpP-ADEP1 複合体による細胞分裂に必須である FtsZ の分解が、ADEP1 の特異な抗菌活性の一因であると考えられている。¹ BsClpP は、単独では単量体で存在しており、ADEP1 の結合により 14 量体形成が促進されることが単独でのタンパク質分解活性発現の要因であると推察されてきた。しかし、ADEP1 がもたらす BsClpP の構造への影響と機能の詳細な関係を解明することは創薬開発だけでなく、その機能を人為的に制御するうえで重要であるが、その詳細な関係は明らかにされていない。そこで、本研究では、まず ADEP1 が BsClpP の動的構造にもたらす影響について明らかにすることを目的として、生化学的実験および高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) による観察を行った。その結果、ADEP1 による BsClpP 14 量体形成過程には、単量体から 7 量体 (過程 A)、7 量体から 14 量体 (過程 B) の 2 段階が存在することが判明した (図 C)。² また、14 量体形成過程のうち、過程 A と B の引き起こしやすさは、ADEP1 誘導体で異なることが予想された。次に ADEP1 誘導体が BsClpP の構造やタンパク質分解活性にもたらす影響とこれらの関係を明らかにすることを目的に、ADEP1 の構造活性相関研究 (SAR) を行った。ADEP1 の *N*-アシルフェニルアラニン部は BsClpP が疎水性ポケットに結合し、BsClpP の活性型への構造変化を誘起する。¹ また、ADEP1 側鎖部は代謝安定性の低い求電子的な α,β -不飽和カルボニル基を備えたアミド型側鎖を有している。そこで、ADEP1 側鎖部の SAR を検討し、尿素結合を導入することで BsClpP との水素結合能を強化し、構造展開を行うことで、21 種類の ADEP1 誘導体を創製した。³ 現在、代謝安定性、抗菌活性、タンパク質分解活性や HS-AFM 観察などの評価を行っているところである。

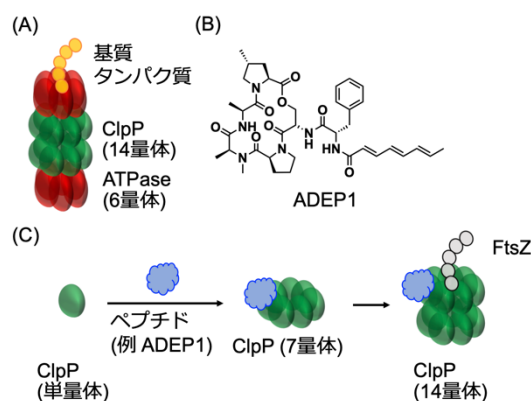


図. (A) 細菌のタンパク質分解系. (B) ADEP1 の構造. (C) ADEP1 の多量体形成機構.²

1. Malik *et al.* *Nat. Prod. Rep.* **2017**, 34, 815; 2. Ishikawa *et al.* *Manuscript in preparation*; 3. 石川 *et al.* 特願 2023-083850.

タンパク質化学修飾を指向した生理条件でのナイトレン発生法の開発研究

○豊島暖生・笠原彰友・山次健三（千葉大院薬）

Generation of nitrene under physiological conditions for protein modification (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University) TOYOSHIMA, Haruki; KASAHARA, Akitomo, YAMATSUGU, Kenzo

近年、タンパク質を化学修飾し、その性質や他のタンパク質との相互作用を解明する研究が盛んにおこなわれている。そのためには、水中中性、37℃などの生理条件下での反応が求められるが、タンパク質修飾に適用可能な化学反応は未だ乏しい。我々の研究室では、タンパク質の化学修飾を自在に行うための基礎となるような、生理条件下における分子の反応性や化学的特徴に興味を抱き研究を行っている。その中のひとつとして、我々はナイトレンに着目した。ナイトレンは、電気的に中性で6電子のみを持つ窒素原子であり、その不安定さから高い反応性を示す分子種である。現在用いられているナイトレン発生法のほとんどは、有機溶媒中で紫外線照射や加熱、加えて金属触媒を用いる条件が多く、タンパク質に適用した例は極めて限定的であるうえ、生理条件とは言い難い。そこで本研究では、生理条件下でナイトレンを発生させる方法を検討し、その特異な反応性や化学的特徴を探索することとした。

今回、ナイトレンの発生方法として、*N*-アリールヒドロキサム酸の *in-situ* *O*-スルホニル化を経由する方法と、*N*-スルホニルオキシカーバメイトの脱プロトン化を経由する方法との2つを検討した。また、発生したナイトレンがメチオニンとスルフィリイミン形成を行うと考え、メチオニンとの反応性を調べた。その結果、後者の方法において、緩衝溶液中でナイトレンが発生したと考えられ、メチオニンのスルフィリイミン化が進行することが確認された。本発表ではその詳細について説明する。

ウミホタルルシフェリンに対する SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の擬似ルシフェラーゼ活性

○西原諒^{1,2}・ドカイニッシュ・M・ヒッシュム^{3,4}・木原良樹^{1,5}・杉田有治^{4,6,7}・栗田僚二^{1,5} (¹ 産業技術総合研究所健康医工学研究部門、² JST さきがけ、³ 北海道大学大学院薬学研究院、⁴ 理化学研究所開拓研究本部、⁵ 筑波大学院数理物質科学研究群、⁶ 理化学研究所生命機能科学研究センター、⁷ 理化学研究所計算科学研究センター)

Pseudo-Luciferase Activity of the SARS-CoV-2 Spike Protein for *Cypridina* Luciferin (Health and Medical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)¹, PREST, Japan Science and Technology Agency (JST)², Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University³, Theoretical Molecular Science Laboratory, RIKEN Cluster for Pioneering Research⁴, Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba⁵, Laboratory for Biomolecular Function Simulation, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research⁶, Computational Biophysics Research Team, RIKEN Center for Computational Science⁷)
NISHIHARA, Ryo^{1,2}; DOKAINISH, M. Hisham^{3,4}; KIHARA, Yoshiki^{1,5}; SUGITA, Yuji^{4,6,7}; KURITA, Ryoji^{1,5}

発光生物の殆どは、発光基質(ルシフェリン)の酸化反応を発光酵素(ルシフェラーゼ)が特異的に補助する酵素反応によって発光する。酸化反応で自発的に光を産生する生物発光システムは、標的細胞または生体分子に発光生物由来ルシフェラーゼ遺伝子を予め導入する事で、その動態を非侵襲的に可視化できる¹。今では生命科学分野で欠かせない光イメージング技術の一つとして利用されている。

本発表では、「発光生物由来の酵素でしか、生物発光反応を触媒できない」という常識から脱却し²⁻⁶、SARS-CoV-

2 のスパイクタンパク質にもこれまで見出されてこなかった擬似的なルシフェラーゼ活性があることを発見した(図1)。この擬似ルシフェラーゼ活性を用いることで、発光生物由来ルシフェラーゼに頼らない、新たなウイルス発光分析技術の確立に成功した⁷。

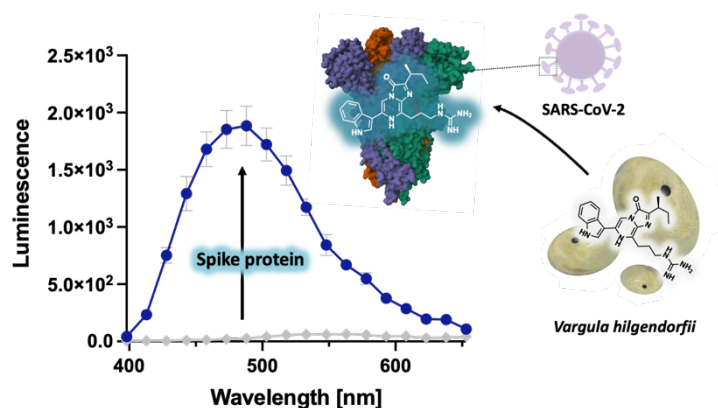


図1 擬似ルシフェラーゼ活性の発見：SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質がウミホタル由来発光基質の発光反応を触媒した。

- 1) Nishihara, R. *et al.*, *Theranostics* **9**, 2646-2661 (2019).
- 2) Nishihara, R.* *et al.*, *Bioconjugate Chem* **31**, 2679-2684 (2020).
- 3) Nishihara, R.* *et al.*, *IntechOpen* 13 pages (2021).
- 4) Nishihara, R.* *et al.*, *Analyst* **146**, 6139-6144 (2021).
- 5) Nishihara, R.*; *et al.*, *Chem Commun* **58**, 13317-13320 (2022).
- 6) Nishihara, R.* *et al.*, *J. Photochem. Photobiol. A Chem* **394**, 112459 (2020).
- 7) Nishihara, R.* *et al.*, *ACS Cent. Sci.*, **10**, 283-290 (2024).

人工細胞膜上で二量化可能な膜貫通人工核酸三重鎖の開発

○劉凱夫・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

Development of an artificial nucleic acid-based triplex capable of dimerization on artificial cell membranes

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) LIU Kaifu; MURAYAMA Keiji; ASANUMA, Hiroyuki

近年、細胞膜や人工細胞膜に機能を持たせるために、脂質二重膜に貫通する分子が盛んに研究されている。一方で我々は、新たな非環状型人工核酸 L-aTNA (acyclic L-threoninol nucleic acid)を開発しており、安定な二重鎖・三重鎖構造を形成することを明らかにした^[1]。そこで本研究では、主鎖骨格に疎水性分子を導入した改変型 L-aTNA 骨格^[2]を新たに合成し(Fig. 1)、膜貫通能を持つ三重鎖の開発を試みた。また、この三重鎖に対し膜外から DNA の入力シグナルを与えることで、二量化させることを検討した。

まずは、L-aTNA の T₁₁ 配列の中央にアルキン修飾型 L-aTNA を 2 つの異なる立体配置で導入し、クリック反応によってアジド化 Cholesterol を導入した(Fig. 2)。いずれの立体配置においても DNA の A₁₁ 配列と安定な三重鎖 (Tri-Cho 及び i-Tri-Cho) を形成することが確認された。次に、DNA の A₁₁ 配列の両側に 14mer の配列 14a、14b を連結し、Cy3 と FAM 色素で修飾した相補鎖 (14a'-Cy3、14b'-FAM) を合成した。14b'-FAM を内部に含むリポソームを作成した後、14a'-Cy3 を結合させた三重鎖を添加し、共焦点顕微鏡観察を行った。興味深いことに、Tri-Cho の場合、三重鎖が膜上で凝集しリポソーム内の FAM の蛍光はほとんど変化しなかったのに対し、i-Tri-Cho の場合、リポソーム内の FAM 蛍光及び三重鎖の Cy3 蛍光が膜上に局在したことから、i-Tri-Cho の 14b と 14b'-FAM が結合している、すなわち三重鎖が膜を貫通していることが確認された(Fig. 2)。

そこで、DNA の入力シグナルに応じて三重鎖が膜上で二量化するシステムを設計した(Fig. 3)。2 つの i-Tri-Cho はそれぞれ BHQ2 と Cy3 で修飾されており、二量化に伴って Cy3 が消光する設計となっている。共焦点顕微鏡観察の結果、設計通り、入力配列の添加によってリポソーム膜上の Cy3 蛍光強度が減少したことから、i-Tri-Cho を膜上で二量化させることに成功した(Fig. 3)。このシステムは、人工細胞膜上で DNA 配列を入力シグナルとして膜内にシグナルを伝達し反応を誘起するような、分子トランスデューサ・人工シグナル伝達系としての応用が期待できる。

[1] K. Murayama *et al.*, *Chem. Commun.* 2015, **51**, 6500. [2] 横山純也 日本化学会第 101 春季年会(2021).

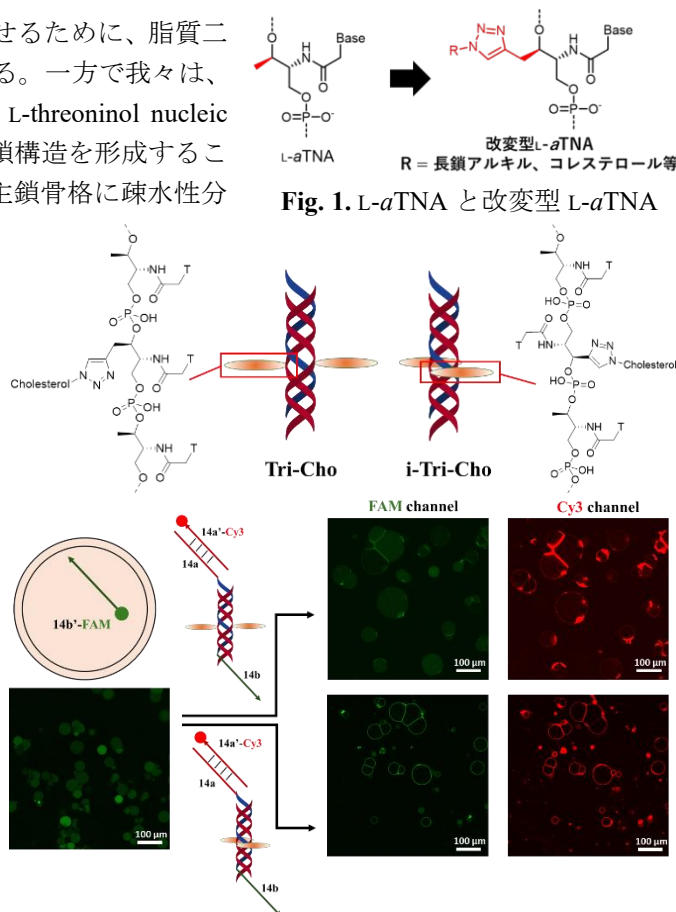


Fig. 1. L-aTNA と改変型 L-aTNA

Fig. 2. Tri-Cho と i-Tri-Cho の構造と膜貫通能力の比較

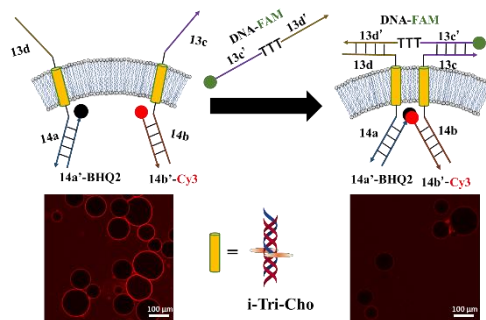


Fig. 3. i-Tri-Cho の膜上での二量化

光架橋性新規修飾塩基導入SNAの合成とSNA/RNA二重鎖の光制御

○池田彩華・佐藤史経・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

Synthesis of SNA involving photocrosslinkable novel modified base and photo-regulation of SNA/RNA duplex (Graduate School of Engineering, Nagoya University) IKEDA, Ayaka; SATO, Fuminori; MURAYAMA, Keiji; ASANUMA Hiroyuki.

<諸言> 骨格改変型人工核酸(XNA)は、高い酵素耐性を有することから様々な生物学的な応用が展開されている。当研究室では非環状型人工核酸 SNA および L-αTNA を開発し¹、これらが高い酵素耐性を有するのみならず、DNA および RNA と安定な二重鎖を形成することを明らかにした。さらに SNA に光応答性塩基である 8-Pyrenylvinyl adenine (PVA) を 2 残基導入することで、鎖内の PVA 同士の光架橋・開裂を介した SNA/RNA 二重鎖の解離・形成の光制御に成功している²。本研究では、Guanine に光応答性官能基を導入した新規修飾塩基 8-Pyrenylvinyl guanine (PVG)を開発し、PVA と同様に SNA/RNA 二重鎖の光架橋・解離による二重鎖の形成・解離の制御を試みた(Fig. 1)。もし PVG を利用した光制御が実現できれば、mRNA の G4 形成の制御による翻訳の光スイッチングなどへの応用が期待できる。

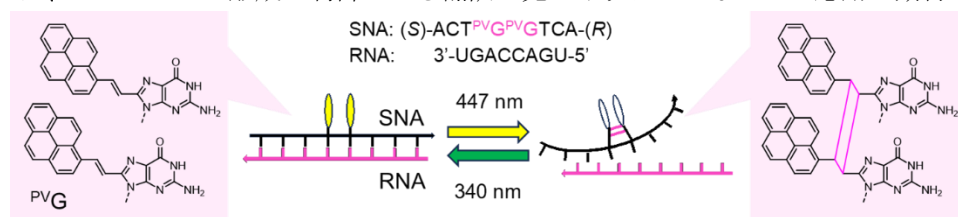


Fig. 1. Design of photo-regulation system using SNA involving PVG.

<結果・考察> PVG-SNA のホスホロアミダイトモノマーを合成し、DNA 合成機で 8 mer の SNA の中央部分に 2 残基導入した。一本鎖の SNA に 447 nm の光を照射したところ、PVG 由来のピークが減少し、新たにピレンのピークが観測された(Fig. 2a)。続いて 340 nm の光を照射したところ、PVG 由来のピークが回復したことから PVG の光架橋・開裂が可逆的に進行することが確認された(Fig. 2b)。しかし 340 nm 照射による開裂反応の速度は PVA と比較して大幅に低下した。変性 PAGE によって架橋反応を解析したところ、鎖内で架橋する PVA とは異なり、PVG の架橋反応は鎖間で進行していることが確認された。次に SNA/RNA 二重鎖の融解温度測定を行った。光照射前においてはシグモイドが見られ、二重鎖形成が確認されたが、447 nm 光を照射した場合にはシグモイドが消失し、PVG の光架橋により二重鎖が解離することが確認された。続いて 340 nm 光を照射したところ、シグモイドの明確な回復は観察されなかった。吸収スペクトルにおいても PVG の吸収は殆ど回復しなかったことから、二重鎖状態では開裂反応の効率が低いことが示された。これは、PVG が鎖間で架橋反応することが原因と考えられる。今後は、よりスタッキング相互作用の弱い分子設計により鎖間の架橋を抑制することで、可逆的な光制御を目指す。

1. K. Murayama *et al.*, ChemBioChem 22, 2507-2515 (2021)
2. K. Murayama *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 141, 9485-9489 (2019).

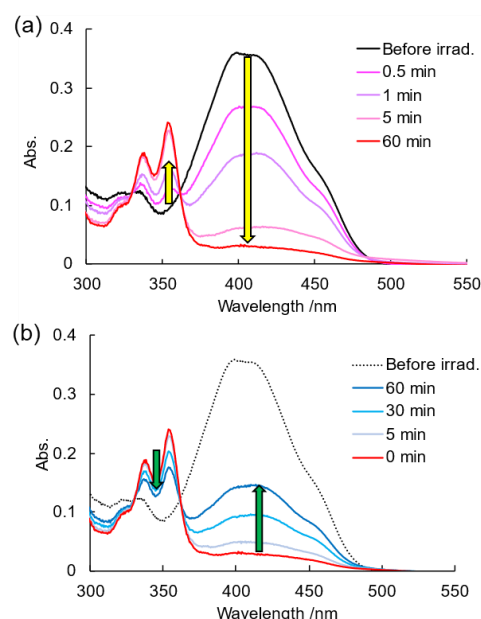


Fig. 2. Absorption spectra of PVG-SNA/RNA (a) after 447 nm light irradiation and followed by (b) 340 nm light irradiation.

リポソームで区画化した酵素代謝反応システム

○小松原 風汰^{1,2}・中田 栄司¹・Peng Lin¹・森井 孝^{1,3} (¹京都大学エネルギー理工学研究所、²京都大学大学院エネルギー科学研究科、³京都光華女子大学健康科学部)

Enzymatic metabolic reactions compartmentalized in liposome with a skeletal DNA nanostructure.

(Institute of Advanced Energy, Kyoto University¹, Graduate School of Energy Science, Kyoto University², Faculty of Health Science, Kyoto Koka Women's University³)

KOMATSUBARA, Futa^{1,2}; NAKATA, Eiji¹; LIN, Peng¹; MORII, Takashi^{1,3}

細胞内は、タンパク質、糖、脂質など様々な生体分子が高密度で共存した複雑な環境にあるにもかかわらず、高精度・高効率の代謝反応が秩序立って進行する。この優れた酵素代謝反応システムを支える仕組みとして、①近接した酵素の逐次反応による基質の素早い変換、②基質・酵素の区画（コンパートメント）への集積による局所的な反応中間体の濃度の上昇、が提唱されている。本研究では、これらの酵素代謝反応システムを *in vitro* で再構築し、その機能を定量的に評価するため、DNA ナノ構造体に分子数を制御して配置した酵素をリポソームに内包した人工細胞小器官の作製を試みた。

DNA ナノ構造体の一種である **DNA origami** は、鋳型となる一本鎖 DNA と複数の短い相補鎖 DNA (staple strand DNA) を加熱・冷却することで構築される[1]。リング状 DNA ナノ構造体は内周を脂質修飾することで、直径に応じた大きさのリポソームを構築することができる[2]。当研究室では、リング状 DNA ナノ構造体の直径方向に DNA 二重鎖 (Bridged DNA) を導入して (図 1)、リポソームで内包することに成功した[3]。これにより、分子数を制御して酵素や色素をリポソーム内に配置することができるようになった。

当研究室では、DNA 結合性タンパク質の **DNA 結合ドメイン**と**タンパク質タグ**を融合した**モジュール型アダプター融合酵素**を開発し、DNA ナノ構造体に共有結合を介して安定的に配置している[4,5,6,7]。

本研究では、これらの知見を活かして、キシロース代謝酵素 XR と XDH をリポソームで区画化する。さらに、大腸菌膜輸送体 **OmpF** を DNA ナノ構造体に導入したリポソームを構築する[8]。膜輸送体 OmpF は分子量 600 程度の分子のみを透過させるため、基質と生成物の輸送能は保持したまま、補酵素 NADH および NAD⁺は区画外への拡散が抑制される可能性がある。これにより補酵素の再利用を促進し、反応効率を向上させることが期待される。

[1] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, 440, 297-302.

[2] Y. Yang *et al.*, *Nat. Chem.* **2016**, 8, 476-483.

[3] H. Konishi, E. Nakata, F. Komatsubara, T. Morii, *Molecules*, **2023**, 28(2), 911.

[4] E. Nakata *et al.*, *Angew Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 2424-2424.

[5] T. A. Ngo *et al.*, *Methods* **2014**, 67, 142-150.

[6] E. Nakata *et al.*, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 1016-1019.

[7] T. A. Ngo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 3012-3021.

[8] S. Zhang *et al.*, *Chem. Eur. J.* **2023**, 29, e202302093.

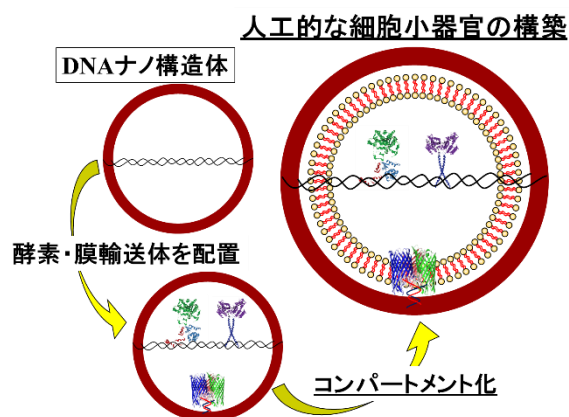


図1 酵素を内包したリポソームの構築.

DNA-Encoded Library における化学反応条件の拡張とリガンドの高純度・高収率を担保した合成サイクルの増加を実現可能とする化学合成型 DNA バーコード

○白川真純¹・植木亮介¹・森本淳平¹・山東信介¹ (¹ 東大院工)

Chemically-synthesized DNA barcodes to enable expansion of reaction conditions and increase in synthetic cycles ensuring high purity and high yield in DNA-Encoded Library (Graduate School of Engineering, The univ. of Tokyo¹) SHIRAKAWA, Masumi¹; UEKI, Ryosuke¹; MORIMOTO, Jumpei¹; SANDO, Shinsuke¹

DNA-Encoded Library (DEL) は DNA バーコードを化合物とリンクさせることで、そのバーコードから化合物の化学情報の読み取りを可能とする手法である¹。1992 年に Lerner と Brenner らによって提唱されたこの手法は、過去 30 年間で飛躍的な進歩を見せ、今日において特に新規生理活性リガンドの探索や化合物の進化には欠かせない手法となっている²。

一般的な DEL スクリーニングのワークフローは、①ライブラリーの構築と②セレクション、そして③セレクションから得られた Hit 化合物の同定と off-DNA での評価の 3 つから成る(図 1)。なかでもライブラリーの構築が根幹であり、実効的な DEL スクリーニングの実現にはライブラリーを構成する化合物の多様性と純度などの質を担保することが重要である。

これまでに DNA-templated synthesis や Encoded self-assembling chemical library、DNA routing など様々なライブラリー構築法が報告されてきた³。特にライゲーションでの DNA バーコードの伸長を応用した DNA recording⁴は、その手法の簡便性から多くの研究者に DEL へのアクセス性を高め、現在の DEL の主軸となっている。しかし、これら手法は共通して無保護の DNA をバーコードとして付した状態でのコンビナトリアルケミストリーによってライブラリーを構築する。DNA もアミノ基のような反応性の高い官能基をもつため、リガンド合成の際の化学反応によって DNA バーコードは損傷してしまう。従って、その損傷を防ぐためにライブラリー構築のサイクル数や応用可能な化学反応条件、試薬などが制限される。結果的に合成されるリガンドの多様性は制限され、かつ合成収率や純度も必然的に低くなる。この化学的脆弱性に対して、多くの化学者が DNA の損傷を抑える化学反応条件の探索や化学反応のためのプラットフォームを開発してきたが、根本的な解決には至っていない⁵。

我々は DNA を化学的に保護することで上記の問題の克服を試みた。結果として、リガンドの高い収率と純度を維持しつつ、DNA バーコードの損傷を抑えることに成功した。本発表では、最適化された保護化 DNA バーコードと我々が開発した本手法の応用について報告する。

1. S. Brenner and R. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 5381–5383. 2. A. A. Peterson and D. R. Liu, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2023**, 22, 699–722. 3. R. A. Goodnow Jr *et al.*, *Nat Rev. Drug. Discov.* **2017**, 16, 131–147. 4. M. A. Clark *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 647–654. 5. P. R. Fitzgerald and B. M. Paegel, *Chem. Rev.* **2021**, 121, 7155–7177.

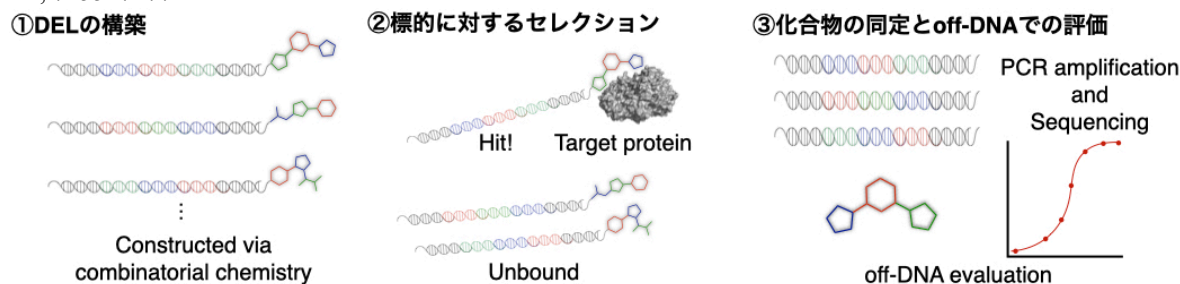


図 1. DEL スクリーニングの一般的なワークフロー

構造化したループ領域をもつグアニン四重らせん構造の液液相分離

○小坂 直暉¹・中田実紀¹・鶴田 充生¹・川内敬子¹・三好 大輔¹ (甲南大学 FIRST)

Liquid-liquid phase separation of DNA G-quadruplexes with structured loop region
(*Frontiers of Innovative Research in Science and Technology FIRST, Konan University*¹⁾)

○Naoki Kosaka¹, Minori Nakata¹, Mitsuki Tsuruta¹, Keiko Kawauchi¹, Daisuke Miyoshi¹

近年、生体分子の液液相分離(LLPS)が注目されている。LLPS によって細胞内で形成される液滴の代表例である核小体やストレス顆粒は転写や翻訳などを調節する¹⁾。また、LLPS の異常が発症につながる神経変性疾患に関与する FMR1 遺伝子や C9orf72 遺伝子には、核酸の非標準二次構造であるグアニン四重らせん構造(G4)を形成する配列が含まれている^{2,3)}。さらに、DNA や RNA の G4 が液滴の形成を促進することや、LLPS を介したクロマチンの凝縮を促進することで転写活性を阻害することも報告されている⁴⁾。以上の結果は、DNA の液滴形成及びそれに伴う遺伝子発現の調整において G4 の形成及び構造の安定化が重要であることを示唆している。

ヒトゲノムに存在する全ての G4 形成配列のうち、ループ領域内で塩基対を形成する G4 (ループ構造化 G4、Fig.1 左) が約 11% を占める。ループ構造化 G4 は、ループ領域が構造を形成していない G4 (Fig.1 右) よりも熱安定性が高く⁵⁾、がん細胞内に見られるカチオン濃度が低い環境においても安定な構造を形成できると考えられている。そのため、ループ構造化 G4 の LLPS を解明することで、G4 が誘起する LLPS を制御できる可能性がある。さらに、G4 とタンパク質の複合体形成にも、ループ領域が重要であるが、G4 のループ領域の LLPS や凝縮体形成における役割は明らかにされていない。そこで本研究では、ループ領域内の配列やヘアピン構造の形成が LLPS に与える影響を検討した。

種々の G4 を設計して LLPS 能を検討したところ、ループにヘアピン構造をもつ G4 は LLPS で液滴を形成するのに対して、構造を形成しないループをもつ G4 は、さらに凝縮体を形成することが明らかとなった (Fig.1)。構造を形成しない長鎖のループをもつ G4 はタンパク質と強く結合することで凝集体を形成するのに対し、ループ領域に形成されるヘアピン構造がタンパク質との結合を抑制して G4 とタンパク質の液滴を保持することが示唆された (Fig. 1)。

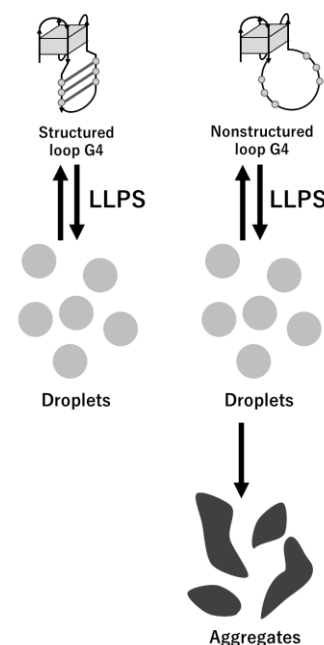


Figure 1. Effects of structured loop G4 on LLPS and aggregate.

- 1) B. Wang, et al., *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2021**, 6, 290.
- 2) B. Zamiri, et al., *Nucleic Acids Res.*, **2015**, 43, 10055-10064.
- 3) L. Menon, et al., *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 5379-5792.
- 4) M. Mimura, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 9849-9857.
- 5) K. W. Lim, et al., *Biochemistry*, **2014**, 53, 247-257.

2 種類の短鎖 DNA をビルディングブロックとした DNA 集合体の形態制御

○牧野哲直¹・田仲真紀子¹ (1 電通大院情報理工)

Control of DNA assembly using two pairs of short dsDNA as building blocks (Graduate Department of Engineering Science, The University of Electro-Communications¹) MAKINO, Tetsunao¹; TANAKA, Makiko¹

生命の設計図として知られる DNA は優れた配列認識能力を有している。核酸塩基は相補となる塩基同士に水素結合を形成する性質をもつため、加熱と徐冷という簡便な手法によって DNA 鎖同士の結合が可能である。この性質を利用し、数百種類の一本鎖 DNA を任意の DNA ナノ構造体に自己集合させる DNA オリガミの技術が発展してきた¹。一方で、我々は高濃度のポリエチレングリコール (PEG) と NaCl を含む環境において、1 種類の短い二本鎖 DNA (dsDNA) が幅 10 μm を超える薄くて平らな六角形構造 (図 1a) に自己集合することを発見している²。この構造体は六角形の側面に対してのみ光学異方性が確認されたため、六角形の面に対して DNA のらせん軸が全て垂直に配向していることが示唆されている。さらに、六角形構造を構成する DNA には配列の両端から相補な 2 塩基 (AA/TT) が突出しているため、DNA 鎖のらせん軸方向の連結が働く一方、隣り合う DNA 同士には高濃度の PEG による排除体積効果が働いたことにより DNA が密に隣接し、六角形構造に自己集合したと考えられる。

本研究では、この六角形構造体に着目し複数種類の dsDNA を用いた形態制御を目指した。六角形構造体は DNA の融解温度以上の加熱とその後の徐冷によって可逆的に自己集合する特徴を有しており、徐冷時に DNA が一本鎖から二本鎖へハイブリダイズする温度と DNA 自己集合の開始温度に関連性があることが我々の研究からすでに明らかになっている。したがって、ハイブリダイズする温度が異なる複数種類の dsDNA をビルディングブロックとすることで、DNA の集合様式が変化し六角形構造体とは別の構造体が形成すると考えた。そこで、塩基長が異なる 2 種類の短鎖 DNA によって形成する構造体を観測した結果、1 種類の DNA によって形成する平面状の六角形構造に比べ、六角形面が伸長したと想定されるシリンダー状の構造体を確認された (図 1b)。この傾向は、2 種類の DNA の融解温度の差が小さいほど顕著になったことから、異なる種類の DNA 同士のハイブリダイズする温度の違いによって段階的な自己集合を起こせることを示唆している。本研究の成果は、DNA をビルディングブロックとした新規材料の開発に繋がると考えている。

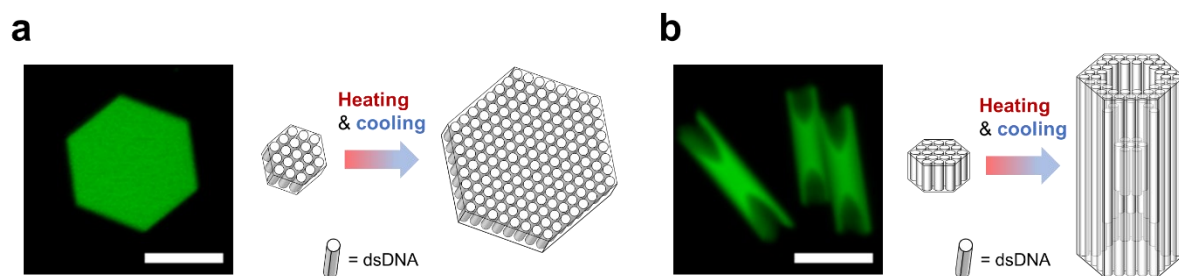


図 1. SYBR Green I で染色した DNA 集合体の蛍光画像と模式図 (a)一種類の短鎖 DNA で形成される六角形構造体および、(b)二種類の短鎖 DNA で形成されるシリンダー状の構造体。スケールバー：10 μm

1. F. Hong, *et al.*, *Chem. Rev.*, **117**, 12584-12640 (2017).
2. T. Makino, *et al.*, *ChemBioChem*, **23**, e202200360 (2022).

グアニン四重鎖結合タンパク質の分解を志向した G4-PROTAC リガンドの開発

○野原玲奈¹・棚谷 優磨¹・長澤 和夫¹・寺 正行¹ (¹東農工大院工)

Development of G4-PROTAC ligands for degradation of G-quadruplex binding proteins (Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology¹) NOHARA, Rena¹; TANAYA, Yuuma¹; NAGASAWA, Kazuo¹; TERA, Masayuki¹

グアニン豊富な核酸領域では、グアニン四重鎖 (G4) と呼ばれる特殊な高次構造が形成される。G4 は G4 結合タンパク質 (G4BP) との相互作用により転写、翻訳、複製といった重要な生物学的プロセスに関与している。しかし、G4BP が G4 に結合することで生じる生物学的機能は不明な点が多い。タンパク質の機能解明にはノックダウンの手法が用いられるが、G4BP の機能解明には G4 に結合している G4BP のみをノックダウンする手法の開発が求められる。本研究では、G4BP の機能解明を指向し、細胞内 G4 に結合する G4BP の分解を目的とした。PROTAC (PROteolysis TArgeting Chimera) は、ユビキチン-プロテアソーム系を介して特定の細胞内タンパク質を分解するように設計された化合物である。そこで、G4 リガンドに E3 リガンドを連結した G4-PROTAC リガンドを開発した (Figure 1)。

まず、E3 リガーゼであるセレブロン (CRBN) のリガンドであるポマリドミド (Pm) と、G4 リガンド (L2H2-60TD) を連結した G4-PROTAC リガンドを合成した (Figure 2a)。CRBN 結合のネガティブコントロールとなる *N*-メチル化 Pm を導入した **1b** も合成した。次に、合成した G4-PROTAC リガンド類が CRBN、G4、G4BP の 3 者を連結できることを *in vitro* で検証し、**1a** を HeLa 細胞に投与すると、G4BP の一種である DHX36 (G4 を解く酵素) の量が有意に減少することを見出した (Figure 2b)。一方、CRBN に結合しないコントロール分子である **1b** の添加では、DHX36 の減少が観察されなかったことから、DHX36 は **1a** によってユビキチン-プロテアソーム分解されることが示唆された。さらに、細胞溶解液からタンパク質を抽出してプロテオーム解析を行い、タンパク質の発現量を定量した。その結果、**1a** によって RIF1 (テロメア関連タンパク質) や SMARCA4 (クロマチンリモデラータンパク質) など、これまでに G4BP であると報告されている多くのタンパク質が減少していることがわかり、G4-PROTAC リガンドによる G4BP の分解に成功した。

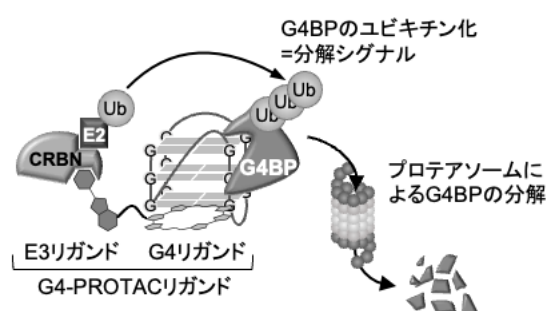


Figure 1. G4-PROTAC リガンドによる G4BP のノックアウトの概略図。

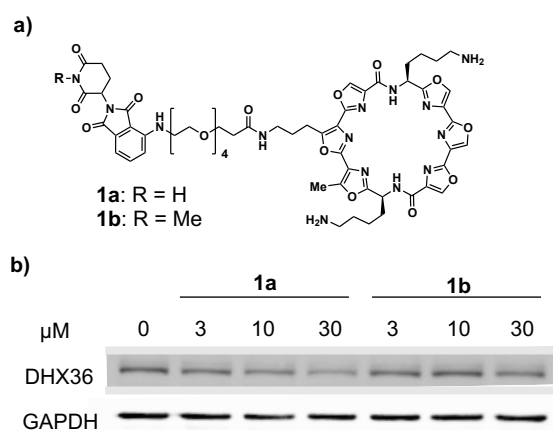


Figure 2. (a) **1a** と **1b** の構造式. (b) **1a** または **1b** を Hela 細胞に 24 時間処理した場合の DHX36 のウェスタンブロッティング解析の結果。

1) S. Balasubramanian *et al*, *Nat. Chem.*, **2021**, 13, 626

^{19}F 標識オリゴデオキシヌクレオチドを用いた ^{19}F NMR による標的 miRNA の検出

○飛田祐希¹・西原達哉¹・田邊一仁¹ (¹ 青学大院理工)

Detection of miRNAs using ^{19}F -labeled oligodeoxynucleotides by ^{19}F NMR (Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University ¹) HIDA Yuki¹; NISHIHARA Tatsuya¹; TANABE Kazuhito¹

MicroRNA(miRNA)は転写後の RNA に作用し遺伝子発現を制御する短鎖の RNA である。miRNA は細胞の発生、増殖、分化、アポトーシス、ストレス応答など、細胞周期の様々なプロセスで重要な役割を担う。また、miRNA はがん細胞内で発現量が変化することから、がん診断のバイオマーカーとして期待されている。近年、がん診断の精度向上に向けて、複数の miRNA の同時検出手法の開発が求められている。そこで本研究では、miRNA の多成分同時検出手法として ^{19}F NMR に着目した。 ^{19}F 元素は、NMR スペクトルにおいてシグナル感度が ^1H の約 83%と高いことに加えて、幅広い化学シフトを示す。また、生体内での ^{19}F 濃度は低いため、 ^{19}F 元素で標識したプローブを用いることで、複数の miRNA を複雑な組成を持つ生体内で明確に検出することが可能であると考えた。先行研究より、 ^{19}F 標識 ODN を用いて、一本鎖と二本鎖では ^{19}F NMR の化学シフトが変化することが報告されており、 ^{19}F NMR を用いた DNA 二重鎖形成による構造変化のモニタリングが可能となっている。¹ しかし、NMR を用いて miRNA を検出する場合、NMR の低い検出感度が課題として指摘されてきた。そこで本研究では、CHA (Catalytic Hairpin Assembly)反応による DNA の構造変化を利用することで ^{19}F シグナルの増幅と高感度検出を目指すこととした。CHA 反応は標的 miRNA 濃度に依存して 2 種類のヘアピン DNA の二重鎖形成が進行することから、 ^{19}F で標識したヘアピン DNA と二重鎖由来の ^{19}F シグナルの積分値を算出することで標的 miRNA の定量が可能であると考えた。

今回、5-ヨード-2'-デオキシウリジンに対し、菌頭カップリングを用いて 3', 5'-ビス(トリフルオロメチル)フェニルアセチレンを導入することで、 ^{19}F 標識ウリジン誘導体を合成した。合成したウリジン誘導体を、ホスホロアミダイト法を用いてヘアピン DNA のループ部位に導入した。得られた ^{19}F 標識ヘアピン DNA を用いて、標的 miRNA である miR-21 存在下において CHA 反応を引き起こし、 ^{19}F NMR を測定した。その結果、miR-21 非存在下と比較して、miR-21 存在下では CHA 反応後の二重鎖由来の ^{19}F シグナルが増加したことが確認された。

現在、複数標的 miRNA の多成分同時検出を行うため、構造の異なる ^{19}F 標識塩基を導入したヘアピン DNA を合成しており、併せて報告する予定である。

1. Tanabe, K.; Sugiura, M.; Nishimoto, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6690-6694.

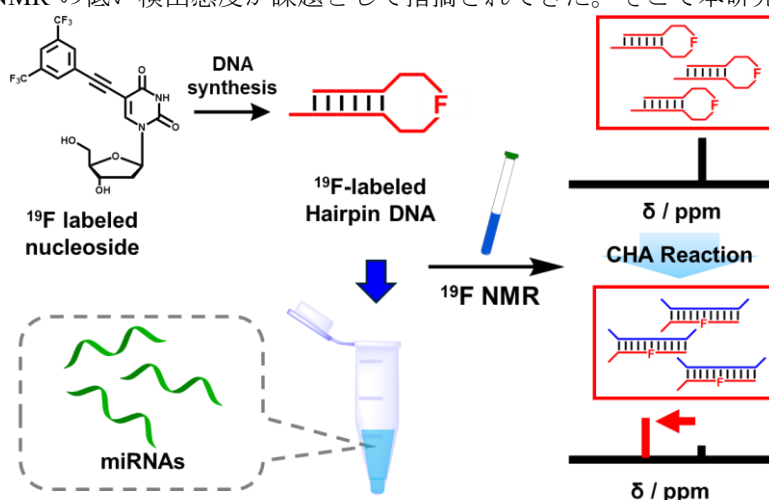


Figure 1. Schematic of miRNA detection using CHA reaction by ^{19}F NMR.

電位差計測で DNA 検出を行うための溶液条件の検討

○猪狩雅徳¹・古澤宏幸^{1,2} (¹山形大院有機材料システム、²山形大教育推進機構)

Investigation of solution conditions for DNA detection by potentiometry (Graduate School of Organic Materials Science, Yamagata Univ.¹, IPGE, Yamagata Univ.²) IGARI, Masanori¹; FURUSAWA, Hiroyuki^{1,2}

【はじめに】近年、ヒトの血中内に DNA 断片やマイクロ RNA など短鎖核酸が存在することが報告されている。その中でもがん細胞の DNA が細胞死などにより血中内に流れ出たものは循環腫瘍 DNA と呼ばれ、こうした DNA を検出することでがん細胞の存在を検知できることからがん診断のバイオマーカーの有力候補として注目されている。これまでの核酸を検出する方法として、核酸に吸着する蛍光標識剤を用いて光学装置によって検出する光学的方法や、核酸吸着メディエーターを用いて流れる電流を計測するアンペロメトリー法などが用いられてきた。溶液中の2つの電極間の電位差を計測するポテンシオメトリー法は、核酸のような電荷物質の場合には標識剤を用いずに検知ができると期待される一方、生体分子である核酸の二重鎖形成は生理食塩水と同等の塩溶液中である必要があり、こうした高塩濃度は電位差計測の妨げとなっていた。本研究では核酸本来の負電荷を一般的なポテンシオメトリー法で検出する溶液条件を検討することを目的として、DNA の二重鎖形成する際に一価の NaCl の代わりにポリアミンなどの多価塩を用いることができるか、その効果を評価した。

【実験】多価塩の効果を評価するために、ナノグラムオーダーの物質が吸着すると振動数が減少する水晶振動子マイクロバラン(s(QCM))を DNA 二重鎖形成評価として用いた(図1A)。QCM センサー表面にアビジンを固定し、10塩基のビオチン化一本鎖 DNA (Probe DNA) をアビジン-ビオチン相互作用によって固定した。センサーセルを多価塩としてスperlミンを含んだ測定溶液で満たし、Probe DNA の相補鎖である10塩基 DNA 鎖(Match DNA)もしくは1塩基だけ配列の異なる DNA 鎖(Mismatch DNA)を添加した際の振動数変化を観察した。

【結果・考察】多価塩として生体由来の四価のポリアミンであるスperlミンを用いたとこと、5 μ M のスperlミンの測定溶液中で、Match DNA を添加すると振動数の変化が観察されたが、Mismatch DNA を添加しても振動数の変化が観察されなかった(図1C)。生理食塩水と同等な濃度の150~200 mM 塩化ナトリウム測定溶液中での DNA 二重鎖形成の場合と比較(図1B)して四価のスperlミンは μ M オーダーの濃度で効果があることがわかった。実際にスperlミンを用いて DNA 二重鎖形成の電位差測定を行ったところ、電位変化を観察することができた。以上より、スperlミンなどポリアミンを用いることで電気化学的に DNA 検出できることがわかった。

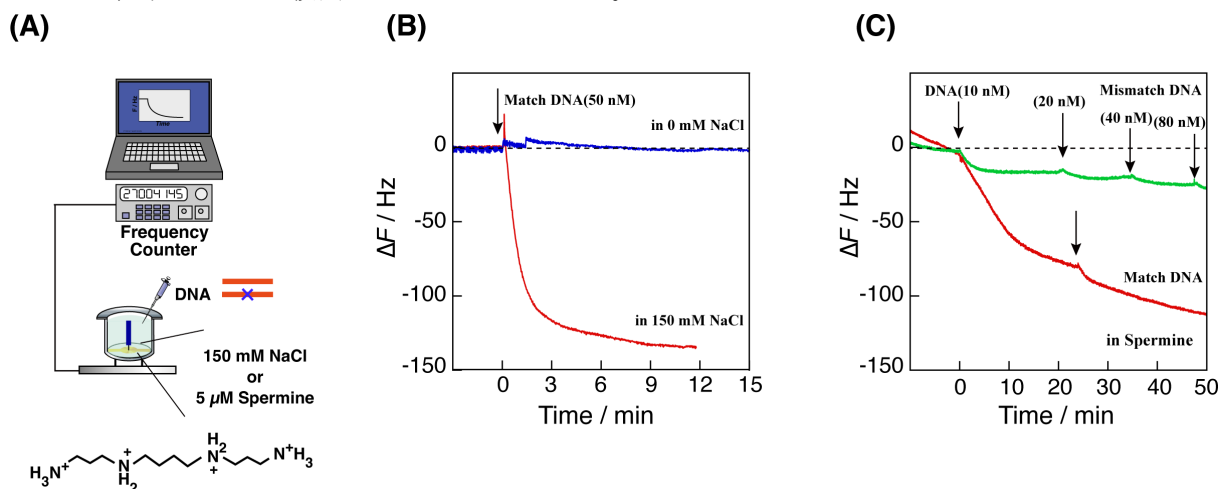


図1 (A) QCM 装置の模式図、(B) DNA 二重鎖形成の観察(10 mM Tris-HCl, pH8.0, 0 or 150 mM NaCl)、(C) スperlミン存在化での観察(1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 μ M スperlミン)

アゾラト架橋白金二核錯体の一本鎖 DNA 液滴形成能と核酸結合様式

○山田拓磨¹・田代竜²・植村雅子^{1, 2}・箕浦克彦³・米田誠治^{1, 2} (¹ 鈴鹿医療大院薬、² 鈴鹿医療大薬、³ 大阪医薬大薬)

DNA droplet formation ability and ssDNA-binding property of an azolato-bridged dinuclear platinum complex (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Suzuka Univ. Med. Sci.¹, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka Univ. Med. Sci.², Faculty of Pharmacy, Osaka Med. Pharm. Univ.³) YAMADA, Takuma¹; TASHIRO, Ryu²; UEMURA, Masako^{1, 2}; MINOURA, Katsuhiko³; KOMEDA, Seiji^{1, 2}

細胞内には数多くの生体分子が存在しているにも関わらず、生命活動の維持に重要な反応は、互いに干渉することなく適切なタイミングで進行している。近年、液-液相分離により生じる液滴が、反応の場としての役割を担っていることが報告され、注目を集めている。液滴は、温度、pH、イオン強度などの変化に応答して形成や溶解を繰り返す。^[1] このような反応の場を、生体分子を用いて人工的に作り出すことのできる化合物の探索は、生命の起源に関する研究や人工細胞の作成を試みる研究を行う上で、非常に重要である。カチオン性のホモポリマーである Poly-Lysine は、DNA 背後骨格の負電荷を中和することで、一本鎖 DNA (ssDNA) の液滴形成を引き起こす化合物として知られている。(Fig. 1)

ごく最近、我々は、44 量体 ssDNA にピラゾラト架橋白金(II)二核錯体 (AMPZ, Fig. 2) を添加すると、高効率に DNA 液滴が形成されることを確認した。Poly-Lysine により形成される液滴は高濃度の NaCl を添加することにより容易に溶解するが、AMPZ により形成される液滴は溶解しなかった (ゲル化)。本液滴のゲル化には、液滴形成に必要なリン酸背後骨格の負電荷の中和はもちろんのこと、AMPZ と核酸塩基の配位結合に起因する ssDNA 間の架橋形成が重要な役割を担っていると推定した。また、白金錯体と核酸塩基との反応性は核酸塩基によって大きく異なるので、ssDNA の塩基配列と液滴の性質には関連があると仮定した。実際に、様々な配列の ssDNA と AMPZ を混合して液滴形成を観察したところ、グアニン (G) リッチな ssDNA の液滴はゲル化したが、アデニン (A) リッチな ssDNA の液滴はゲル化しなかった。そこで、AMPZ と2つのプリンヌクレオシド (グアノシンとアデノシン) との反応を ¹H NMR で観察し、それらの主生成物の同定を行った。AMPZ とグアノシンとの反応では、過去の報告の通り 1 : 2 複合体 (Fig. 2) が得られ、^[2] アデノシンとの反応では 1 : 1 複合体 (Fig. 2、八員環キレート錯体) が得られた。上記より、G リッチな ssDNA でゲル化が進行するのは、ssDNA 間で白金錯体を介した架橋が形成されているからであり、A リッチな ssDNA 液滴のゲル化が進行しないのは、1 : 1 複合体の形成によって架橋形成頻度が大幅に低下するためであると考えられる。

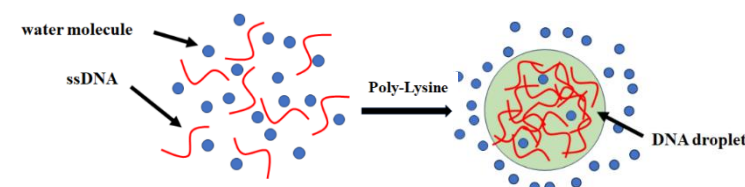


Fig. 1

Reference

(1) Alberti, S et al, *Cell* **2019**, 176 (3), 419-434

(2) Komeda, S. et al., *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, (24), 4828-4835

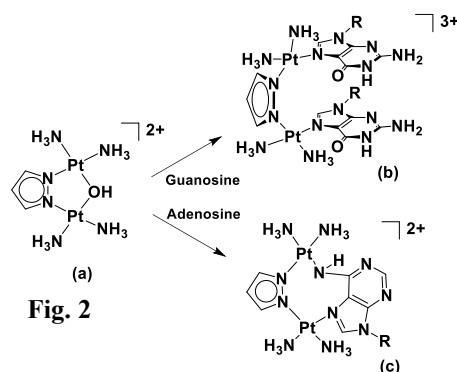


Fig. 2

人工基質 RNA を用いた ADAR2 の RNA 編集基質認識特性の解析

○嶋津尚輝¹・島内駿¹・緒方悠岐¹・福田将虎^{1,2} (¹福岡大学大学院理学研究科、
²福岡大学理学部化学科)

Analysis of RNA editing substrate recognition characteristics of ADAR2 using artificial substrate RNA
(Dept. Chem., Graduate School of Science, Fukuoka Univ.¹, Dept. Chem., Fac. Sci., Fukuoka Univ.²) SHIMAZU, Naoki¹; SHIMAUCHI, Shun¹; OGATA, Yuki¹; FUKUDA, Masatora^{1,2}

A-to-I RNA 編集機構は、二本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ(ADAR)によって、RNA 上の特定のアデノシン(A)が脱アミノ化されイノシン(I)へと変換される転写後修飾機構である。ヒト生体内では RNA 編集活性を有する 3 種類の ADAR アイソフォームが発現しており、いずれも、活性ドメインであるデアミナーゼドメイン(DD)と複数の二本鎖 RNA 結合ドメイン(dsRBD)を有する。その中の一つである ADAR2 は、DD と 2 つの dsRBD がそれぞれリンカーを介して連結した構造¹であり、長い二本鎖 RNA 中に存在する A を高効率に編集できることが知られている。一方で、ADAR2 基質構造は、単純な二本鎖構造のものだけでなく、ミスマッチやバルジ、ループなどを含む複雑な構造²もある。また、編集部位とは離れた位置で形成される二本鎖構造が RNA 編集活性に影響するケースも報告されており、ADAR2 の基質認識特性については未だ不明な点が多く残されている。

そこで本研究は、人工 ADAR2 基質 RNA をデザインし、それを用いて ADAR2 の最適な基質構造および ADAR2 の基質認識特性を明らかにすることを目的とした。ADAR2 は、そのドメイン構造から、DD が編集部位周辺に結合し、dsRBD がその結合を安定化させるためにいずれかの二本鎖構造と相互作用することで、高効率な編集が達成されていると考えられる。そこでまず、ADAR2 の DD 結合領域(DR)と dsRBD 結合領域(dRR)を 2 つの二本鎖構造で分離した ADAR2 基質 RNA を構築することにした。本設計では、~22bp で形成される 2 つの二本鎖構造を 0-1000 nt のリンカーで隔てた ADAR2 基質 RNA を構築した。合成したそれぞれの ADAR2 基質 RNA 対して、組換え ADAR2 を用いた in vitro RNA 編集反応を行い、編集効率と DR, dRR 間のリンカー長の関係を解析した。その結果、リンカーが 100 nt までは編集活性は維持されたが、200 nt になると急激に編集効率が低下することが明らかになった。次に、リンカーにハイブリダイズするアンチセンスオリゴ DNA(ASO)を用いて離れた DR, dRR 間の空間的距離を近づけると、先で編集が観測されなくなったリンカー 200 nt の基質 RNA の編集効率が、リンカー 0 nt と同程度まで回復した。これらの結果は、ADAR2 の編集には、DR, dRR 両領域間の空間的距離が大きく影響することを示している。本発表では、上記実験に加え、ADAR2-dsRBD 変異体を用いた編集解析の結果も併せて報告する。

1) Eifler, T. *et al. Biochem.* **52**, 7857-7869 (2013)

2) Rieder, L. E. *et al., Semin. Cell. Dev. Biol.*, 23, 281 (2012).

天然核酸塩基対 A/T と G/C のサイズを模倣したアルキニル C-ヌクレオチド二重鎖の開発

○山本こみち・千葉順哉・大石雄基・井上将彦（富山大・院薬）

Development of artificial DNA composed of alkynyl C-nucleotides that mimics the base pair size of natural A/T and G/C (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama) Komichi Yamamoto, Junya Chiba, Yuki Ohishi, Masahiko Inouye

これまでに実用化された核酸医薬品は、主にアンチセンスと siRNA であり、新たな作用機序の開拓も含めた開発研究が現在も盛んに進められている。当研究室では、糖骨格がアルキニルデオキシリボースからなる非天然核酸（アルキニル DNA）を既に報告している (Figure 1a) [1]。アルキニル DNA には 4 種類の人工核酸塩基が導入されており、天然 DNA と同様な相補的な塩基対形成 (A*/T*, G*/C*) による人工二重らせんの構築が確認された。一方 MacroModel 計算により、この人工二重らせんの直径 (約 23 Å) は、天然 DNA (約 20 Å) よりも大きいことが示唆された (Figure 1b)。そこで本研究では、天然二重らせんに直径も類似した人工二重らせん構造を形成する人工 DNA の開発を目指し、天然ピリミジン塩基由来にはアセチレン部位を有さない人工ヌクレオチド (sT*, sC*) の利用を考えた。これらのヌクレオチドと、従来の天然プリン塩基由来のアルキニルヌクレオチド (A*, G*) が塩基対を形成した場合、相補鎖のアノマー炭素間距離は天然二重らせんとほぼ同じになると予測される (Figure 1b)。本研究では、人工ヌクレオチド (A*, G*, sT*, sC*) のみからなる DNA 鎖を合成し、その人工二重らせんの形成について評価した。

各人工ヌクレオチドのアミダイト体を準備した後、回文配列のオリゴマー (d(A*sT*A*sT*G*G*sC*sC*A*sT*A*sT*)) を固相合成した。このオリゴマーの HEPES 緩衝液を調整し、UV スペクトルの温度依存性を調査した。その結果、270 nm 付近に観測される吸収バンドの昇温に伴う濃色効果が確認された (Figure 2a)。また、二状態間の平衡を示すシグモイド状の融解曲線が得られたことから、本オリゴマーが室温で二重らせんを形成していることが示唆された (Figure 2b)。その融解温度 (T_m) は 56 °C と見積もられ、対応する天然二重らせんの T_m (49 °C) よりも有意に高かった。これは、A*/sT* 間で形成される水素結合数 (3 点) が天然の A/T 間の場合 (2 点) よりも多いことに帰因すると考えられる。

[1] W. Shirato, J. Chiba, M. Inouye, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 7043-7046.

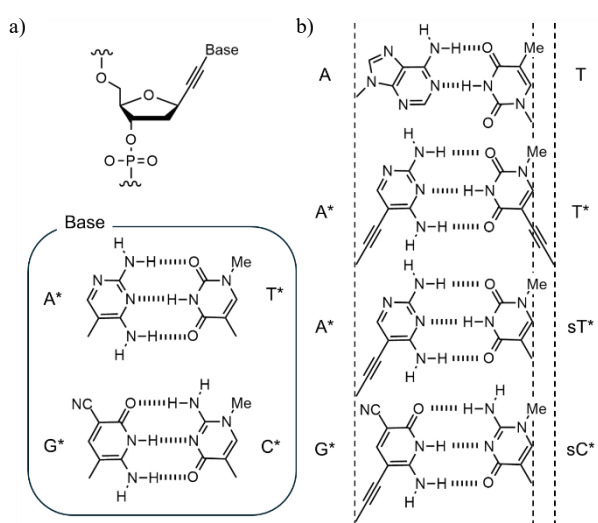


Figure 1. a) Alkynyl DNA
b) Comparison of distances between anomeric carbons of complementary strands

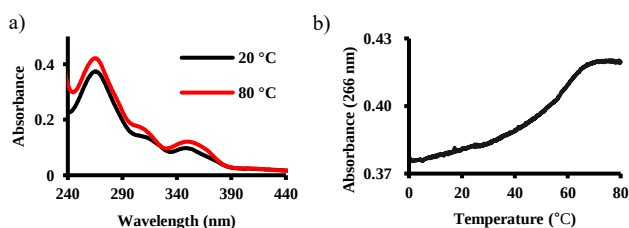


Figure 2. UV-vis and CD data for 5'-d(A*sT*A*sT*G*G*sC*sC*A*sT*A*sT*)-3' (4.0 μM) in 10 mM HEPES (pH 7.0), 10 mM MgCl₂ and 100 mM NaCl.

a) UV-vis spectra at 20 (black) and 80 °C (red)
b) UV melting curve monitored at 266 nm

RNase H を標的としたスプリットアプタマーの開発と検出系の構築

○成田侑生・小畑健太郎・松尾和哉・和久友則・小堀哲生 (京都工芸繊維大学大学院 工学科学研究科)

Development of split aptamers for recognition and sensing of RNase H (Graduate school of science and Technology, Kyoto Institute of Technology) NARITA, Yuuki; KOBATA, Kentaro; MATSUO, Kazuya; WAKU, Tomonori; KOBORI, Akio

生体分子のセンシングには、抗体や核酸アプタマーを認識素子として用いたサンドイッチ型の検出系が汎用されている。しかしながら、標的分子の2ヶ所を同時に認識する必要があるため、小分子や、複数個の認識部位が特定されていない生体分子への応用には困難が伴っていた。そこで近年、バイオセンシングや臨床診断における新たな分子認識素子として、スプリットアプタマーが注目されている。スプリットアプタマーは、標的分子と選択的に結合する核酸アプタマーを2つまたは3つに分割した核酸断片からなり、標的分子非存在下においてスプリットアプタマー複合体を形成しないように設計されている。一方、標的分子存在下においては分割した核酸断片が複合体を形成しながら標的分子に選択的に結合するという特徴をもつ。標的分子の有無で核酸断片の複合体化が制御されるという性質は、バイオセンシングの基本要素に合致するため、スプリットアプタマーは新たな分子認識素子として大きな期待を集めている。しかしながら、標的の有無に依存して複合体化を誘起するようなスプリットアプタマーを論理的に作成する手法が全く開発されていないため、アプタマーの報告例と比較して、スプリットアプタマーの報告例は極端に少ない。そこで本研究において我々は、新たなスプリットアプタマーの探索法の構築を目指して研究を実施した。

アプタマーのモデル標的分子には、核酸医薬の活性維持に必須である RNase H を選択した。2003 年に Cazenave らによって、RNase H に対して約 27 nM という高い結合親和性をもって結合する 40 塩基の DNA アプタマーが報告されている¹。この RNase H アプタマーを基本骨格とし、アプタマー配列を様々な位置で分割した核酸断片 (計 13 種類) からなるスプリットアプタマーを設計した。スクリーニングに用いた評価系の概要図を **Figure 1a** に示す。合成した Capture probe をアガロースビーズ上に修飾した後、スプリットアプタマーA および B、RNase H、Fluorescent probe を添加し、10 °C または 25 °C で1時間攪拌後、蛍光顕微鏡を用いてアガロースビーズ上の輝度を評価した。その結果、Split 8 を利用した場合、RNase H 存在下で蛍光強度が約2倍に増大した (**Figure 1b**)。このことより、Split 8 は RNase H に対するスプリットアプタマーとして機能することが示唆された。さらに、同定したスプリットアプタマーを利用することで、液相中で RNase H を検出可能なシステムを構築した。

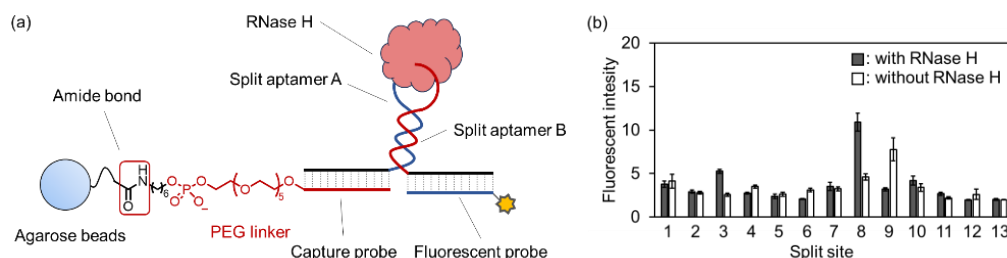


Figure 1. (a) Screening of split aptamers for recognition of RNase H. (b) Quantification of fluorescent intensity of agarose beads with each split aptamer.

1. C. Cazenave, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 5776–5788.

1 細胞内の転写活性を時系列に計測する、新生 RNA ラベルシーケンス法

○馬場峻^{1,2}・河崎史子¹・森本淳平³・山東信介³・泊幸秀¹ (¹東京大学 定量生命科学研究所、²東京大学 新領域創成科学研究科、³東京大学 工学系研究科 化学生命工学専攻/バイオエンジニアリング専攻)

Transcription activity profiling at single-cell resolution via dual metabolic labeling for RNA sequencing
(Institute of Quantitative Biosciences, University of Tokyo.¹, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo.², Department of Chemistry & Biotechnology, Department of Bioengineering, School of Engineering, University of Tokyo.³) Ryo, Baba¹; Fumiko, Kawasaki²; Jumpei, Morimoto³; Shinsuke, Sando³; Yukihide, Tomari¹

転写の活性は、時事刻々と変化しうる。しかし、個々の細胞の遺伝子の転写活性を時系列で追跡する技術は十分には確立されていない。本研究では、細胞内の新生 RNA をラベルする技術を基盤に、細胞ごとに複数タイムポイントにおける転写活性を計測する手法を提案する。

細胞内の転写活性を計測するために、修飾核酸である 4-thio-uridine (4sU) を用いて細胞内で新たに転写された RNA(新生 RNA)をラベルする手法が報告されている(Herzog et al., 2017)。たとえば、細胞から抽出した 4sU(4-thio-uridine)でラベルされた新生 RNA は、4sU を化学的にシトシン (C) 誘導体に変換することで次世代シーケンサー (NGS) を用いてトランスクリプトームワイドに検出できる。この新生 RNA ラベル法は 1 細胞計測にも応用されているが、細胞ごとに 1 つのタイムポイントでの転写活性の計測に限定される。そこで 2 種類の修飾核酸を使用し、異なる 2 つのタイムポイントで転写活性を測定する手法が報告されている(Gasser et al., 2020)。しかし、この修飾核酸の併用例では扱いにくい酸化オスmiumを用いており、1 細胞計測への応用も報告されていない。

本研究では、新生 RNA ラベル剤として独自に 5-formylcytosine(5fC)を見だし、5-formylcytosine(5fC)と 4sU の 2 種類の核酸アナログで時系列に細胞内の新生 RNA をラベルするシーケンス手法を提案する。まず、5fC 修飾を持つモデル RNA を合成し、RNA に malononitrile による化学的処理を行った後に次世代シーケンス(NGS)解析を行った。結果、非修飾 RNA と比較して、5fC 修飾を持つモデル RNA は 5fC 修飾部位にて C→T 変換に基づいて読み出せることがわかった。さらに、4sU と 5fC の 2 つの修飾を持つモデル RNA を合成し、1 細胞計測で用いる細胞バーコードビーズ(Qiu et al., 2020)に捕捉させ、シーケンスライブラリーを作製し、4sU と 5fC の修飾塩基シグナルの読み出しを NGS 解析で検証した。結果、塩基置換シグナル(4sU→C、5fC→T)を同時に読み出すことが出来、新生 RNA として区別できることを示した。これらの結果から、4sU と 5fC でラベルされた新生 RNA は並列で読み出すことができ、さらに 1 細胞計測の実験系と互換性があることが示された。また、5fC が細胞内 RNA に導入されるかについて、5fC を含む培地で HEK293T 細胞を培養し、RNA を抽出した後にモノヌクレオシド単位に分解し、LC/MS 解析で細胞内 RNA へ導入率を定量した。5fC ラベル下(2000 μM)では導入率が 0.25 %である一方、5fC 濃度が 0 μM (コントロール)の条件下では 5fC のシグナルは確認されなかったことから、5fC が細胞内 RNA をラベル可能である核酸アナログであることがわかった。

本研究で独自に見出した 5fC により、複数タイムポイントでの遺伝子の転写活性を 1 細胞レベルで計測することができる。これにより、細胞の遺伝子発現制御メカニズムの理解が一層深まることが期待できる。特に、細胞分化やストレス応答など時系列に転写活性が変動するプロセスの理解に貢献できる可能性がある。

3'UTR を標的とした RNA hacking によるハプロ不全関連遺伝子の 発現量増加

○五木結愛¹・勝田陽介^{1,2}・佐藤慎一^{1,2}・北村祐介¹・井原敏博¹ (¹熊本大学院先端、²株式会社 StapleBio)

Enhancement of Haploinsufficiency-related Gene Expression via RNA hacking Targeting 3'UTR (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University¹, StapleBio Inc.²) ITSUKI, Yua¹; KATSUDA, Yousuke¹; SATO, Shin-ichi^{1,2}; KITAMURA, Yusuke¹; IHARA, Toshihiro¹

多くの疾病は遺伝子発現が過剰になる・不足するなど発現“量”の異常が原因で生じる。そのため遺伝子発現量を「減らす」「増やす」ことで制御する技術はバイオエンジニアリングツールとしてだけでなく、多くの疾患の新規治療戦略を拡張するツールとしても非常に有用である。しかし、次世代シーケンサなど生体機能を解析する機器の爆発的な進化に伴い遺伝子発現制御メカニズムが詳細に解明されつつあるのに対して、それらを利用した遺伝子発現制御技術の開発は遅れをとっていると言わざるを得ない。

もちろん、siRNA や ASO といった標的 mRNA を切断することによって標的遺伝子の発現を「減らす」確立した技術は存在する。しかし標的遺伝子の発現を「増やす」技術は翻訳活性化を行う SINEUP や転写活性化を行う saRNA など数少ない開発例にとどまっている。ただ、これらの技術も汎用性が高いとはいえず、誰しもが簡単に扱えるツールではない。さらに、核酸ツールを核酸医薬として扱う場合では外部から導入する核酸は生体内の防御機構などにより速やかに分解されてしまうため、人工核酸で置き換える必要がある。しかし、複数のタンパク質と結合して作用する SINE-UP や、生体内の酵素と共働して作用する saRNA といった方法は、使用する核酸を人工核酸化すると天然核酸とは異なった高次構造を形成し、結果として酵素に認識されず効果を発揮できない可能性が生じる。

そこで我々は誰しもが簡単に扱うことが可能かつ、人工核酸化が容易な「RNA hacking (RNAh)」を提案する。RNAh は Staple 核酸と名付けた短鎖核酸により、mRNA 上に存在するグアニンの連続配列を近接させて強固な高次構造である RNA G-quadruplex (RGq) 形成を誘起する。この手法を 3'UTR に適応させると、3'UTR に形成誘導した RGq が 3'-to-5' exonuclease の進行をはじめとする様々な mRNA 分解経路を阻害し、mRNA の安定性を向上させることで結果としてタンパク質量を増やす効果が期待できる (Fig.1)。また、Staple 核酸が効果を発揮するためには標的配列との相補鎖形成能のみが必須であり、タンパク質との結合や酵素認識を必要としないため種々の人工核酸の利用が可能である。

本手法による遺伝子発現増加技術が確立すれば、ハプロ不全など特定のタンパク質発現量が不足することが原因となる疾患の新規治療戦略となり得る。本発表ではハプロ不全による疾患の原因遺伝子を標的として RNAh によるタンパク質発現量の増加を試みた。動物体内において RNAh による標的遺伝子の発現量が増加したこと、及び人工核酸を用いても同様の結果が見られたことを報告する。

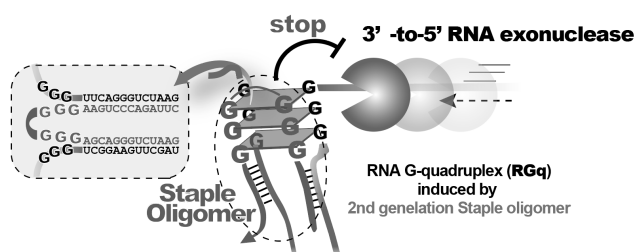


Fig. 1 Staple 核酸による mRNA 分解耐性獲得の概略図。Staple 核酸によって 3'UTR に形成された RGq が 3'-to-5' exonuclease の分解反応を阻害することによって mRNA の分解耐性が向上し、生体内半減期が延長されることによるタンパク質発現増加効果が期待される。

RNA hacking 技術を基盤とした DNA Polymerase のスリップ現象 制御

○嘉藤美来¹・勝田陽介^{1,2}・北村裕介¹・佐藤慎一^{1,2}・井原敏博¹ (¹ 熊本大学大学院先端科学研究部、² StapleBio Inc.)

Controlling slip phenomena in DNA Polymerase by applying RNA hacking technology

(Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University¹, StapleBio inc.²) KATO, Miko¹; KATSUDA, Yousuke^{1,2}; KITAMURA, Yusuke¹; SATO, Shin-ichi^{1,2}; IHARA, Toshihiro¹

生物は DNA の複製により遺伝情報を細胞間に引き継ぎ、RNA に転写してタンパク質へと翻訳することで生命活動を維持している。各過程にはポリメラーゼやリボソームなどの酵素が関与しており、近年これらの酵素が安定な核酸構造に衝突すると一部配列を読み飛ばすスリップ現象が起きることがわかってきた。ポリメラーゼのスリップ現象は **Slippage** という名称で知られており、強固な高次構造が存在する際に発生する。仮にこの **Slippage** を制御することが可能になれば遺伝子疾患治療などの点において新しい可能性が生まれる。

例えば未成熟終止コドンの出現に基づく遺伝子疾患の治療などであろう。疾患の原因である遺伝子変異は体内で頻繁に発生しているが、適切に修復が行われなかった場合にはデュシャンヌ型筋ジストロフィーなどの重篤な症状を引き起こす。現状、多くの製薬業界がこのような疾病に対する治療法としてエクソンスキッピングによる変異部位をエクソンごと読み飛ばす技術の確立を目指しているものの欠損範囲が大きすぎるといった問題点があった。つまり、**Slippage** の制御が可能になれば任意の位置で遺伝子配列を読み飛ばせるため、欠損範囲の小さい治療技術を確立することが可能になる。

そこで我々は独自に開発を進める RNA hacking (RNAh) を応用し、安定な核酸高次構造形成を人工的に誘導し、**Slippage** を制御する手法の開発に取り組んでいる。RNAh は Staple 核酸と名付けた短鎖核酸が、標的遺伝子上の遠位に存在するグアニン連続配列 (G-tracts) を近接させ、G-quadruplex (Gq) の形成を誘導する技術である (Fig. 1a)。Staple 核酸により誘導した Gq 前後で **Slippage** を誘発することができれば、G-tracts 間配列に存在する変異遺伝子を読み飛ばし遺伝子疾患への治療応用が可能となる。

本発表では Staple 核酸の Gq 形成誘導に基づいた、複数種の DNA ポリメラーゼの **Slippage** 現象制御に関して報告する。まず我々は Staple 核酸を加えた場合のみ Gq を形成する DNA 配列を準備し、ポリメラーゼ伸長反応を行った。得られた伸長反応産物を **Slippage** が起きた場合のみ増幅するプライマーセットで増幅反応を行ったところ、目的位置にバンドが確認された (Fig. 1b)。さらにシーケンス解析により **Slippage** 後の配列であることが確認され、Staple 核酸の Gq 形成誘導による **Slippage** の誘起が示唆された。今後は **Slippage** を任意の位置で制御するための Staple 核酸の更なる最適化を試みる。

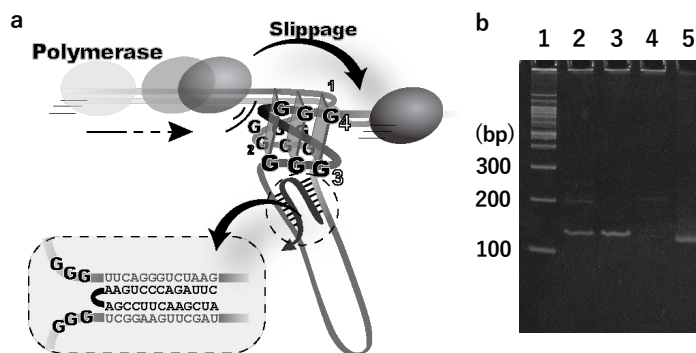


Fig. 1 a. Staple 核酸による Gq 誘導と **Slippage** の模式図。 **b.** PCR 増幅による **Slippage** の確認結果。レーン 2, 3 の 120 bp 付近に見えるバンドが **Slippage** によるバンドと考える。

蛍光色素導入 SNA らせん増幅系の評価

○杉山乙珠・浅沼浩之・樫田啓（名大院工）

Evaluation of helical amplification system of SNA tethering fluorescent dyes (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.) SUGIYAMA, Itsumi; ASANUMA, Hiroyuki; KASHIDA, Hiromu

超分子キラル増幅（らせん増幅）とは、アキラルな超分子に少量のキラル分子を添加した際に、そのキラルティがらせんを介して増幅される現象である。これを利用することで、分子のキラルティの情報が円二色性（CD）や円偏光発光（CPL）シグナルとして得られるため、キラル分子検出法として注目されている。しかしながら、従来のらせん増幅系は有機溶媒中で機能するものが大半であり、水中で機能するものの報告は少ないのが現状であった。

それに対し、当研究室ではこれまでに非環状型人工核酸セリノール核酸（SNA; 図1）とトレオニノール核酸（*a*TNA）からなるらせん増幅系を開発した。SNAは対称配列がアキラルになるという非常にユニークな性質を持つ。そこで、半分ずれて相補的、かつ対称配列をもつSNAを二重鎖形成させることでアキラルなナノワイヤーを調製した（図2）。ここに少量のキラル核酸*a*TNAを添加したところ、そのキラルティが増幅されることが明らかになった¹。また、SNA中にピレニルウラシル（U_p）を導入することで、*a*TNAのキラルティをCDだけでなくCPLシグナルに変換することに成功した²。しかしながら、蛍光色素を導入したらせん増幅系はこの系のみであり、導入する蛍光色素の種類や数、位置とSNAのらせん増幅能の関係性については明らかになっていない。

そこで本研究ではU_p以外の蛍光塩基として新たにピレニルアデニン（A_p）を設計した。U_pやA_pを導入したSNAを合成し、CD測定を行うことで増幅能の高い配列を発見することを目指した。A_pを2mer導入したSNAについてCD測定を行った結果を図3に示す。その結果、SNA単独ではCDが観察されなかったのに対し、L-*a*TNAの添加に伴いCD強度の増大が観察された。また、CD強度がL-*a*TNAの添加量に対し、非線形的に増加したことから、設計通りらせんが増幅していることが確認された。しかしながら、U_pを2mer導入した配列と比較するとらせん増幅能は低下することが示唆された。従って、らせん増幅能は核酸塩基の化学構造に強く依存することが明らかとなった。本発表では、他の配列のCD測定結果についても詳細を報告する予定である。

1. H. Kashida, *et al.*, *Chem. Sci.* 12, 1656-1660 (2021)
2. H. Kashida, *et al.*, *Chem. Eur. J.* 27, 14582-14585 (2021)

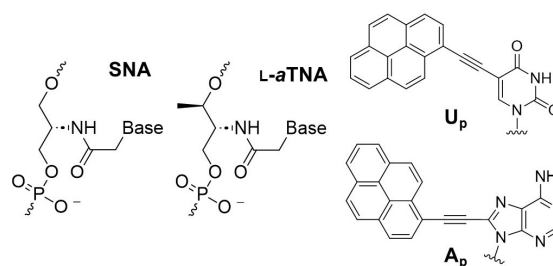


図1 非環状型人工核酸と蛍光塩基の構造

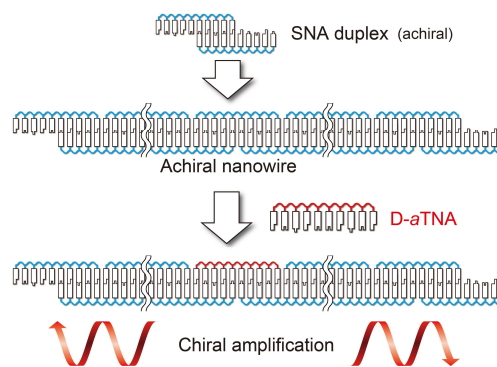


図2 SNA らせん増幅系の模式図

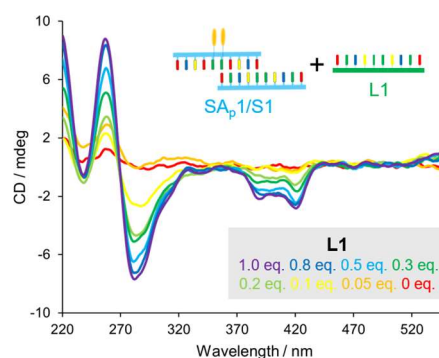


図3 SNA ナノワイヤー (SA_p1/S1) に対して L-*a*TNA (L1) を添加した際の CD スペクトルの変化

高モジュール性・高活性の自己切断型アプタザイムを基盤とした 真核系無細胞リボスイッチ

○藤川真広・大西和希・高橋萌・小川敦司（愛媛大プロテオサイエンスセンター）

Eukaryotic Cell-Free Riboswitches based on Highly Modular and Efficient Self-Cleavage Aptazymes
(Proteo-Science Center, Ehime University) FUJIKAWA, Masahiro; ONISHI, Kazuki; TAKAHASHI, Hajime;
OGAWA, Atsushi

リボスイッチは、分子応答性の *cis* 作用型遺伝子発現制御 RNA であり、任意の標的分子（リガンド）に結合するアプタマー（*in vitro* selection によって獲得可能）を mRNA の非翻訳領域（UTR）に上手く挿入することで、人工的にも構築できる。特に、真核の無細胞系で機能する人工リボスイッチは、環境負荷が少なく室温で機能するため、バイオセンサーの素子として有力な候補となり得る。これまでに当研究室では、真核無細胞系の一種である「小麦胚芽抽出液（WGE）」で機能する真核系人工 ON リボスイッチを多数創出してきた。中でも、自己切断型アプタザイム（アプタマー + 自己切断リボザイム）基盤の真核系人工 ON リボスイッチは、モデルリガンドであるテオフィリン（喘息薬, *theo*）に対して、非常に高い制御効率（ON/OFF 比）を示した（約 50 at 500 μM *theo*）^[1]。しかし、当該リボスイッチが基盤とする自己切断アプタザイムは低 Mg^{2+} 濃度（翻訳条件下）で低活性であるため、切断と翻訳反応を分ける必要があった。さらに、リガンド特異性の変更には、異種リガンド応答性アプタザイムを別途 selection で獲得しなければならない。そこで本研究では、低 Mg^{2+} 濃度で高活性なリボザイムを用いて、高いモジュール性を持つように新規アプタザイムを設計し、当該アプタザイムを mRNA に上手く挿入することで、「反応分割不要でリガンド特異性変更が容易な自己切断型真核系人工 ON リボスイッチ」の構築を試みた。

初めに、低 Mg^{2+} 濃度でも高活性なハンマーヘッドリボザイム（HHR）^[2]と *theo* のアプタマー^[3]を、単純な（構造変化が必要ない）コミュニケーションモジュール（CM）を介して結合させ、数種の *theo* 応答アプタザイム候補を設計した。これらをコードする DNA を、低 Mg^{2+} 濃度条件下において 1 mM *theo* 非存在下 or 存在下で転写したところ、候補の 1 つが高い切断 ON/OFF 比を示した。

つぎに、当該 *theo* 応答アプタザイムの遺伝子融合箇所および切断後 mRNA の翻訳効率を最適化するために、数種の *theo* 応答リボスイッチ候補を設計した。なお、制御遺伝子には、黄色蛍光タンパク質（YPet）を選択した。各候補をコードする DNA を、WGE 基盤の IVTT（転写-翻訳共役系）条件下において 1 mM *theo* 非存在下 or 存在下で反応させたところ、候補の 1 つが非常に高い ON/OFF 発現比を示した（図 1）。また、当該リボスイッチは反応分割が必要ないのにも関わらず、先行研究の（反応分割が必要な）自己切断型リボスイッチ^[1]よりも高い感度で *theo* 用量依存的に応答した。

当該リボスイッチの基盤アプタザイムの CM は、制御に構造変化を必要としないため、アプタマー部位を交換するだけでリガンド特異性を変更できる。実際、*theo* アプタマーを tetracycline（抗生物質, *tc*）に結合するアプタマー^[4]に変更したところ、*tc* に対して高感度・用量依存的に応答した。

無細胞系は凍結乾燥による保管・輸送が容易なため、本研究で構築したリボスイッチはフィールドワーク利用が可能なバイオセンサーの素子として幅広い応用が期待される。

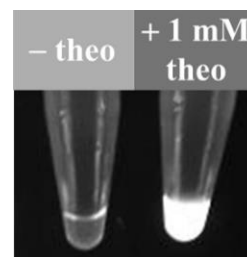


図 1: 最適 *theo* 応答リボ
スイッチの YPet 発現

[1] *ChemBioChem* **2009**, 10, 2465. [2] *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2604.

[3] *Science*, **1994**, 263, 1425. [4] *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 2607.

速度論的機構で IRES 媒介翻訳を制御する真核リボスイッチの構築

○高橋 萌, 藤川 真広, 小川 敦司 (愛媛大プロテオサイエンスセンター)

Construction of eukaryotic riboswitches that regulate IRES-mediated translation through a kinetic trapping mechanism (Proteo-Science Center, Ehime Univ.) TAKAHASHI, Hajime; FUJIKAWA, Masahiro; OGAWA, Atsushi

【緒言】リボスイッチは、*cis* 作用型・分子応答性の発現制御 RNA であり、天然では主に原核生物 mRNA の非翻訳領域 (UTR) に存在する。当該 RNA は、分子認識部位である「アプタマー」と発現制御部位である「発現プラットフォーム」で構成されており、前者とリガンド分子との結合が、後者の構造変化 or 異なる構造への折り畳みを誘起することで、遺伝子の発現を制御する。単純な制御機構や高い分子特異性から、汎用的な遺伝子発現制御素子としての応用が期待されているが、天然のリボスイッチの場合は、リガンドが内在性の代謝物に限定されてしまう。一方で、*in vitro* selection によって獲得されたアプタマーを mRNA に上手く挿入することで、「ユーザー定義のリガンドに応答するリボスイッチ」を人工的に構築できる。実際に我々は、独自の合理設計法を駆使することで、真核発現系で働く希少な人工リボスイッチを (構築が困難な促進 (ON) 型を含めて) これまでに幾つか構築してきた。しかし、これらは全て平衡機構で機能するリボスイッチ (eq-リボスイッチ) であるため、その殆どは、原核系において速度論的トラップ機構で機能するリボスイッチ (kt-リボスイッチ) に比して、スイッチング効率 (ON/OFF 誘導比) が低いという問題点があった。ただ、kt-リボスイッチは eq-リボスイッチよりも制御機構が遥かに複雑で、ゼロから合理的に設計することは極めて困難である。そこで本研究では、以前にスクリーニングによって獲得された原核系の kt-ON リボスイッチの特徴を利用するとともに、アプタマー部位を発現プラットフォームから上手く分離することで、真核系人工 kt-ON リボスイッチの合理的構築を試みた。

【実験】最初に、原核系人工 kt-ON リボスイッチであるリボスイッチ C¹⁾ の構造的な特徴を精査した上で、アプタマーの不要領域を上手く利用した部位分割法を考案して、それらを組み合わせることで、真核系人工 kt-ON リボスイッチの合理的設計法を導出した。なお、発現プラットフォームには、チャバネアオカメムシ腸管ウイルス (PSIV) 由来の IRES を選択した。次に、当該設計法に基づき、3 種の小分子 (テオフィリン or テトラサイクリン or FMN) に応答する真核系人工 kt-ON リボスイッチを、それぞれに結合するアプタマーを用いて設計した。最後に、各リボスイッチ及びレポーター遺伝子をコードする DNA 鋳型を、小麦胚芽抽出液 (WGE) 基盤の転写-翻訳共役系 (IVTT) において、各リガンド存在下 or 非存在下で反応させて (at 26°C for 3 h)、レポータータンパク質の発現活性により ON/OFF 誘導比を評価した。

【結果】構築した 3 種の kt-ON リボスイッチは、同じく PSIV IRES 媒介翻訳を制御する真核系 eq-ON リボスイッチ²⁾に比して、3~7 倍高い誘導比 (最大誘導比は約 90) を示した³⁾。PSIV IRES は (生細胞を含めて) 様々な真核発現系で機能するため、同タイプの kt-リボスイッチは、主要な真核系発現制御素子としての応用が期待できる。また、確立した設計法は、kt-リボスイッチの本質的特徴に基づいているため、原核系で機能するものも含め、様々な人工 kt-リボスイッチの合理構築に適用可能だろう。

今後は、当該設計法により構築した kt-ON リボスイッチ群を、WGE 基盤の転写-翻訳共役系と共にリポソーム等のカプセルに封入し、外界の各リガンドに応答する人工細胞型のバイオセンサーの開発を目指す。

1) Topp S, Reynoso CMK, Seeliger JC, *et al. Appl. Environ. Microbiol.*, **2010**, 76, 7881. 2) Ogawa A. *RNA* **2011**, 17, 478. 3) Takahashi H, Fujikawa M, Ogawa A. *RNA* **2023**, 29, 1950.

金属錯体形成によるヒドロキシウラシル-アデニン塩基対の不安定化を利用した DNA ナノチューブの形成制御

○竹澤悠典¹・大西雄登¹・森圭太¹・塩谷光彦^{1,2} (¹ 東大院理、² 東理大総合研究院)

Metal-mediated Control of DNA Nanotube Assembly based on Destabilization of Hydroxyuracil-Adenine Base Pairs (Graduate School of Science, The University of Tokyo¹, RIST, Tokyo University of Science²)
TAKEZAWA, Yusuke¹; ONISHI, Yuto¹; MORI, Keita¹; SHIONOYA, Mitsuhiro^{1,2}

DNA の塩基配列特異的な自己集合を活用して、様々な二次元・三次元のナノ構造体が構築されてきた^[1]。なかでも、外部刺激に応答して構造を変換できる DNA ナノ構造体の開発は、DNA を基盤とした分子機械や機能材料への応用が期待されている。我々は、金属配位能を有する人工・修飾核酸塩基を導入した DNA 鎖を用いて、金属イオンに応答して構造・機能を制御できる金属イオン応答性 DNA 超分子の開発を行ってきた^[2,3]。たとえば、5-ヒドロキシウラシル(U^{OH})塩基の金属錯体形成^[4,5]に基づき、 Gd^{III} イオンの添加・除去に応答して駆動する DNA 鎖交換反応や DNA 分子ピンセットを開発した^[6]。

本研究では、直径約 10 nm の中空チューブ状構造体である「DNA ナノチューブ」^[7]に着目し、金属イオンを入力刺激とする DNA ナノチューブの形成制御を行った (図 1)。具体的には、 U^{OH} 塩基と天然アデニン(A)塩基が形成する Watson-Crick 型の U^{OH} -A 塩基対が、 Gd^{III} などの金属イオンの U^{OH} 塩基への結合により不安定化すること^[4,5]を利用した。DNA ナノチューブを構成する「DNA タイル」の粘着末端の一つに、 U^{OH} を 3 個含む相補鎖 (ブロッカー鎖) を会合させ、DNA ナノチューブの形成を阻害した。ここに Gd^{III} イオンを加えると、 U^{OH} -A 塩基対の不安定化によりブロッカー鎖が解離し、露出した粘着末端の二重鎖形成により DNA タイルが集合すると考えた。 Gd^{III} イオンの当量などの条件検討の結果、(i) DNA タイルに対して 2 当量のブロッカー鎖の添加によりナノチューブ形成を完全に阻害でき、(ii) 次いで U^{OH} 塩基に対して 2 当量 (DNA タイルに対して 12 当量) の Gd^{III} を添加することでナノチューブ形成を誘起できたことが、蛍光顕微鏡観察およびアガロースゲル電気泳動により示された。特に 25 °C の等温下では、 Gd^{III} イオン添加 1 時間後には DNA タイルの集合が見られ、24 時間後には最長 30 μm の DNA ナノチューブの形成が確認された。以上のように、 U^{OH} 塩基を含むブロッカー鎖を用いることで、 Gd^{III} イオン添加に応答した DNA ナノチューブの形成を実現した。 U^{OH} 含有ブロッカー鎖を用いる戦略は、様々な DNA ナノ構造体の形成制御に応用できると期待される。

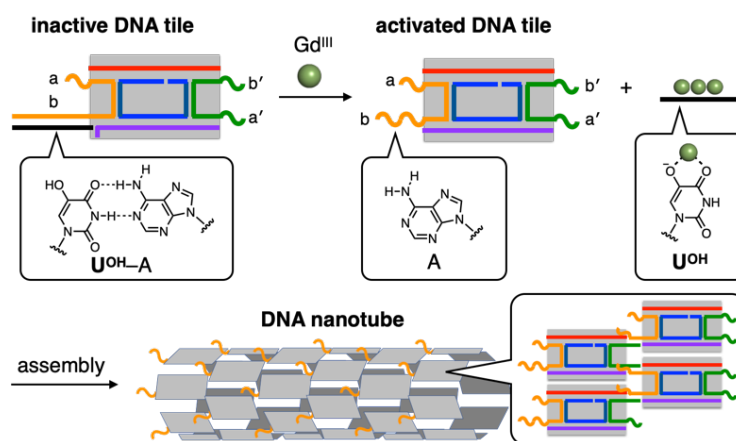


図 1 Gd^{III} イオン添加による DNA ナノチューブ構造の形成。ブロッカー鎖 (黒) は、3 個の U^{OH} 塩基を含む。相補的な粘着末端(a-a'および b-b')の二重鎖形成により、DNA ナノチューブが形成する。蛍光顕微鏡観察には、蛍光色素で修飾した DNA タイルを用いた。

[1] N. Jonoska, E. Winfree (eds.), *Visions of DNA Nanotechnology at 40 for the next 40: A Tribute to Nadrian C. Seeman*, Springer, **2023**. [2] Y. Takezawa, M. Shionoya, In *Modern Avenues in Metal-Nucleic Acid Chemistry (Metal Ions in Life Science, Vol. 25)*, J. Müller, B. Lippert Eds., CRC Press, **2023**, pp. 257–289. [3] Y. Takezawa, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2024**, DOI: 10.1007/s10847-024-01224-6. [4] Y. Takezawa et al., *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 14713. [5] K. Nishiyama et al., *Chem. Commun.*, **2021**, *57*, 2487. [6] Y. Takezawa et al., *Nat. Commun.*, **2023**, *14*, 4759. [7] P. W. K. Rothmund et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16344.

人工塩基導入 PNA 配列解析法の開発

○稲垣和真¹・愛場雄一郎²・荘司長三²・浅沼浩之¹・樫田啓¹ (¹名大院工、²名大院理)

Novel sequencing method of peptide nucleic acid bearing artificial bases (¹Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Graduate School of Science, Nagoya University²) INAGAKI, Kazuma¹; AIBA, Yuichiro²; SHOJI, Osami²; ASANUMA, Hiroyuki¹; KASHIDA, Hiromu¹

ペプチド核酸 (PNA; Fig. 1) は Nielsen らによって開発された人工核酸であり、DNA・RNA と安定な二重鎖を形成可能であることに加え、他の天然・人工核酸と異なり、電荷を持たずアキラルであるという特徴を持つ¹⁾。従って、もし PNA によるアプタマーを開発することが出来れば、細胞導入効率の向上など、従来のアプタマーが持ち得ない様々な機能を持つことが期待できる。しかしながら、これまで PNA の配列解析法が報告されていないために、PNA によるアプタマーを開発することは困難であった。

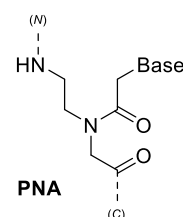


Fig. 1. Chemical structure of PNA.

それに対し、当研究室では DNA との二重鎖形成を利用することで PNA の配列を解析する新しい配列解析手法を開発した。具体的には、ランダム配列をもつ DNA と PNA を二重鎖形成させ、二重鎖形成した DNA のみを分離し、次世代シーケンサーで配列を解析することで PNA と相補的な DNA の配列情報が得られることを明らかにした (Fig. 2)。これまでに、この手法を利用することで、天然塩基を持つ PNA10 量体の配列解析に成功している。本手法は酵素反応を利用せず二重鎖形成のみを利用しているため、様々な人工塩基を導入した PNA であっても配列解析が可能であることが期待される。そこで本研究では、上述の手法を用い、様々な人工塩基導入 PNA の配列解析を試みた。

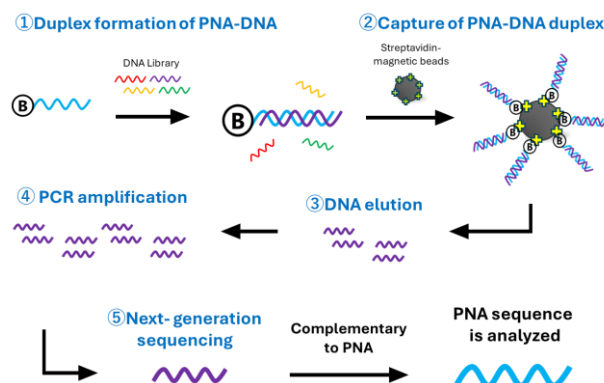


Fig. 2. Novel sequencing method of PNA using duplex formation.

本研究で使用した修飾塩基を Fig. 3 に示す。まずシアヌル酸 (Y) 及びピレニルウラシル (U_p) を PNA に導入した。これらは、チミン同様の水素結合部位を持つことから、アデニンとの水素結合が期待できる。また、Y は水素結合性、U_p は蛍光性をもつため、これらを導入したアプタマーを開発することが出来れば、より高機能なアプタマーの開発が期待できる。そこで、本研究ではまずこれらの塩基を導入した PNA の配列解析が可能かどうか検討した。まず、Y を 1mer 及び 3mer 導入した PNA の配列解析を行ったところ、問題なく配列解析できることがわかった。また、U_p を 1mer 導入した PNA も配列解析できることがわかった。従って、開発した配列解析法を利用することで修飾塩基を導入した PNA の配列解析も可能であることがわかった。本発表では、ピレンをアミド基を介してウラシルに導入した U_{ap} 導入 PNA の配列解析結果についても併せて報告する予定である。

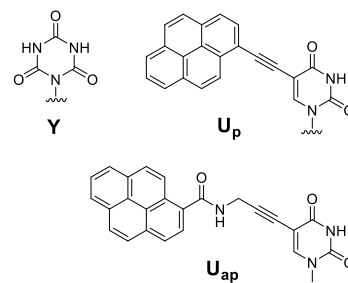


Fig. 3. Chemical structures of Y, U_p and U_{ap}.

1) P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt, *Science*, **1991**, 254, 1497-1500.

二重鎖形成を利用した非環状型人工核酸 SNA の配列解析

○日比野希美・浅沼浩之・檜田啓（名大院工）

Sequence analysis of acyclic artificial nucleic acid SNA by utilizing duplex formation (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.) HIBINO, Nozomi; ASANUMA, Hiroyuki; KASHIDA, Hiromu

人工核酸を用いたアプタマーは、高い酵素耐性や化学的安定性を持つことから近年注目されている。当研究室で開発された非環状型人工核酸であるセリノール核酸（SNA）は、天然核酸と比べて遥かに安定な二重鎖形成や高い酵素耐性など、優れた性質を持つ（Fig. 1）¹。また、配列に応じたキラリディ制御が可能であるという非常にユニークな特徴を持つ。従って、SNA を利用したアプタマーを開発することが出来れば、従来の核酸アプタマーが持ち得ない機能を持つことが期待できる。しかしながら、SNA の配列を解析する手法は報告されていないため、SNA を利用したアプタマーを開発することは不可能であった。

それに対し、当研究室ではこれまでに二重鎖形成を利用した SNA の配列解析法を開発した（Fig 2）。具体的には、まず末端をビオチン修飾した SNA とランダム配列をもつ DNA ライブラリを混合し、二重鎖を形成させた。この二重鎖をストレプトアビジンビーズに固定化し、相補的でない配列を除去した後、水中で加熱することで二重鎖から DNA を溶出した。この DNA を PCR 増幅後、次世代シーケンサーによって配列解析を行うことで、元の SNA と相補的な DNA の配列情報を取得することができる。実際、本手法を用いてこれまでに天然塩基のみをもつ SNA10 mer の配列解析に成功した。本手法は酵素反応を必要とせず、二重鎖形成のみによって SNA の配列情報を DNA に転写しているという特長を持つ。そのため、天然塩基だけではなく修飾塩基を導入した SNA の配列解析が期待できる。

そこで、本研究では修飾塩基を導入した SNA の配列解析を目指した。具体的には、ピレニルウラシル（Up）及びシアヌル酸（Y）を導入した SNA 配列を合成した。これらはチミン同様の水素結合部位を持つため、アデニンと選択的に塩基対を形成することが期待できる。また、Up は蛍光色素であるピレン部位をもち、Y は水素結合部位を両面に持つ特徴がある。そのため、これらを導入したアプタマーを開発することができれば、天然塩基のみでは持ち得ない機能の付与が期待できる。本研究ではこれらの修飾塩基をもつ SNA の配列解析が可能かどうか検討を行った。本発表では、人工塩基による配列解析結果の違いや、人工塩基導入数による配列解析結果への影響などを詳しく報告する。

1. H. Kashida, K. Murayama, T. Toda, H. Asanuma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 1285-1288.

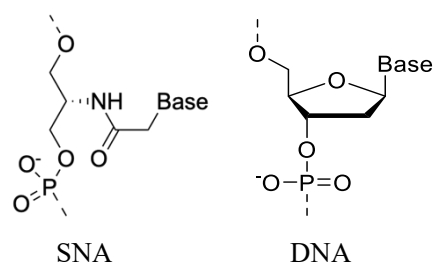


Fig. 1. SNA と DNA の構造

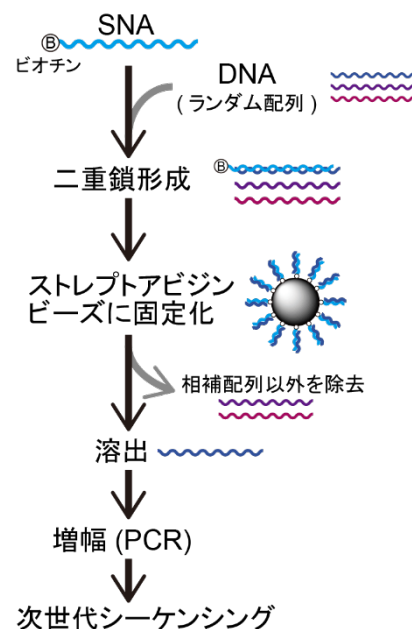


Fig. 2. 開発した配列解析法

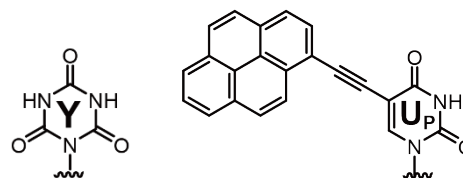


Fig. 3. シアヌル酸及びピレニルウラシルの構造

ケージド相分離液滴の光応答挙動

○坂東晃成¹、渡邊和則¹、高原茉莉¹、藤原誠一¹、金崎佑紀²、北松瑞生²、大槻高史¹

(¹岡大院統合科学、²近大総合理工)

RNA encapsulation and photo-responsive release in caged coacervates (¹Grad. Sch. of Interdiscip. Sci. and Eng. in Health Sys., Okayama Univ, ²Dept. of Mol. and Mat. Eng., Grad. Sch. of Sci. and Eng., Kindai Univ.)
Akinari Bando¹, Kazunori Watanabe¹, Mari Takahara¹, Seiichi Fujiwara¹, Yuuki Kanazaki², Mizuki Kitamatsu², Takashi Ohtsuki¹

最近、液-液相分離による微小液滴（コアセルベート）を形成できる His-rich ペプチドが報告されている。我々は、このコアセルベートの形成および解消を光で制御しようと考えた。本研究では、His-rich ペプチドを改変し、光分解性保護基のついたケージド SCP(self-coacervating peptide)を設計・作製し、光依存的制御ができる仕組みを検討した。

具体的には、光を当てない間はコアセルベートを形成し、光を当てるとコアセルベートが解消するようなケージド SCP の開発を試みた（図1）。上記 His-rich ペプチドを微妙にコアセルベート形成しないように改変しつつ、光分解性保護基である 7-(ジエチルアミノ)-4-(ヒドロキシメチル)クマリン（DEACM）付加すると、DEACM 基が付加している状況ではコアセルベートを形成し、DEACM 基が外れるとコアセルベートが解消するという設計である。さらに、ケージド SCP がコアセルベートを形成する際に、薬物や核酸やタンパク質などの内包が可能になれば、コアセルベートに対して光照射を行った際に、内包物を放出できるようなツールになる。本研究では、内包物として RNA に関して検討を行った。

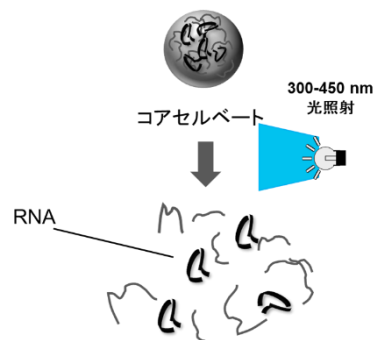


図1 コアセルベートの光依存的分散

現在のところ、DEACM 基によるケージド SCP を用いた、リン酸ナトリウムバッファーと NaCl を用いて、pH と塩濃度を変化させた結果、中性付近かつ生理的塩濃度より少し高塩濃度においてコアセルベートを形成させることができた。光照射による DEACM の脱離については、電気泳動および蛍光観察により確認できた。また、このケージドコアセルベートには siRNA の搭載が可能であり、光照射後にコアセルベート外への siRNA の放出を蛍光測定により観測することができた。本発表では、これらの結果をもとに、さらに効率的な光制御と内包核酸のリリースに向けたケージド SCP の改良と今後の応用について議論したい。

ペプチド固定化ビーズを用いた環境中の鉛イオンの簡便な検出

○吉田秀平・吉田光輝・鶴岡孝章・臼井健二（甲南大院 FIRST）

Easy-handling detection of lead ions in the environment using lead ion-binding peptide-immobilized beads

(Graduate School of Frontiers of Innovative Research in Science and Technology (FIRST), Konan University)

YOSHIDA, Shuhei; YOSHIDA, Koki; TSURUOKA, Takaaki; USUI, Kenji

近年、重金属による環境汚染が世界的に深刻な問題となっている。中でも重金属の環境中への排出を原因とする水質の汚染が深刻となっている¹。特に、鉛イオン (Pb^{2+}) による水質汚染と鉛中毒の拡大は世界保健機関が警鐘を鳴らすほど深刻な問題となっている。環境水の安全性を確認するために誘導結合高周波プラズマ原子発光分光分析 (ICP-AES) 測定が用いられる。ICP-AES 測定では、環境中の数 ppm 程度の重金属イオンを検出することができるため、微量で人体に有害な重金属イオンの検出に有効である。しかしながら、ICP-AES などの微量分析では、有機物などの高濃度の夾雑物を含む試料を測定することができない。そのため、測定前に高温、低 pH の処理が必要という課題がある。そこで、我々は高濃度の夾雑物を含む溶液中から、目的の金属イオンを生理条件などの温和な条件で分離することができれば、容易な重金属イオンの検出が可能になると考えた。生理条件で重金属イオンを選択的に分離する方法として生体分子の金属の配位がある。生体内のタンパク質の一部は金属イオンが配位することで適切な立体構造を保っていることが知られており、その部分配列であるペプチドも金属イオンと選択的に結合できることが報告されている^{2,3}。また、自然界に存在する酵素などは L 体のアミノ酸を認識しやすいが、D 体のアミノ酸でペプチドを作製することで分解耐性も付与することができ⁴、環境測定にも利用できる。さらに、ペプチドはマイクロサイズのビーズに固定化できることも知られており⁵、ペプチド固定化ビーズを用いた金属イオンの選択的な分離が可能になると考えた。

そこで本研究では、 Pb^{2+} 結合ペプチド³を固定化したマイクロビーズを作製、混合溶液中から Pb^{2+} を選択的に分離し、 Pb^{2+} を EDTA で簡便に検出するシステムの構築を試みた (図 1)。まず、 Pb^{2+} と選択的に結合できるペプチドのアミノ酸を D 体のアミノ酸に変更し⁴、N 末端に化学修飾⁶を行うことで分解耐性を付

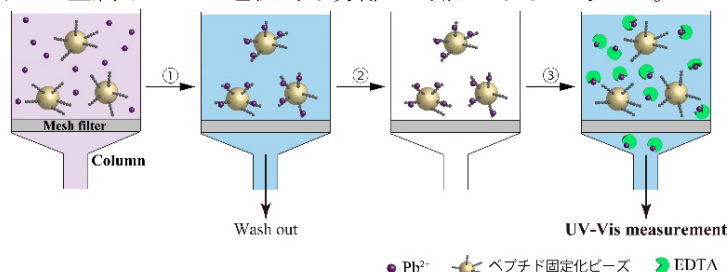


図 1 本実験の操作手順

与した配列を設計した。これらのペプチドを 2 種類の固相合成用のマイクロビーズに合成、固定化した。作製したペプチド固定化ビーズを用いて溶液中の Pb^{2+} のペプチド固定化ビーズへの分離を行った。その後、1 mM の EDTA を添加し、ペプチド固定化ビーズ上に分離した Pb^{2+} と EDTA で EDTA- Pb(II) 錯体を形成させて溶液中に溶出した。溶出した EDTA- Pb(II) は 240 nm 付近に吸収をもつため、UV 吸収を測定することで溶液中の Pb^{2+} の定量ができる。その結果、500 nM の Pb^{2+} を池の水などの環境水中から検出・定量できることが明らかとなった。この定量限界は ICP-AES に匹敵しており、測定の簡便化を実現することができた。現在は、さらなる低濃度での Pb^{2+} の定量を試みている。今後はペプチド配列を改変することで他の金属イオンを検出する手法としての応用も期待できる。さらに、ペプチド固定化ビーズへの重金属イオンの分離を利用し、水質浄化などの環境分野だけでなく、重金属中毒の治療などの医療分野への応用も期待できる。

1. S. Bolisetty *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **48**, 463-487 (2019). 2. S. Yoshida *et al.*, *Chem. Commun.*, **59**, 13239-13244 (2023). 3. R. Nian *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1217**, 5940-5949 (2010). 4. X. Li *et al.*, *Langmuir*, **28**, 13512-13517 (2012). 5. H. Miyazaki *et al.*, *Analyst*, **145**, 3211-3216 (2020). 6. S. He *et al.*, *Acta Biomater.*, **164**, 175-194 (2023).

自己集合球状錯体への閉じ込めによるアミロイド β 疎水性断片の会合構造の NMR 解析

○小野寺悠太¹・中間貴寛¹・矢木真穂²・藤田大士³・加藤晃一²・藤田誠^{1,2,4}

(¹東大院工、²分子研、³京大 iCeMs、⁴東大国際高等研)

NMR analysis of dimeric structures of amyloid β hydrophobic fragments by confinement in a self-assembled spherical coordination cage (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹, Institute for Molecular Science², iCeMS, Kyoto University³, UTIAS, The University of Tokyo⁴) ONODERA, Yuta¹; NAKAMA Takahiro¹; YAGI-UTSUMI, Maho²; FUJITA, Daishi³; KATO, Koichi²; FUJITA, Makoto^{1,2,4}

アミロイド β ($A\beta$)は凝集性のタンパク質であり、認知症の半数以上を占めるアルツハイマー病の発症に深く関わりとされる。 $A\beta$ の凝集の初期段階で形成される会合体は高い神経毒性を持つことが強く示唆されてきたが¹、その過渡的で不均一な会合中間体は単離が難しく構造は未解明である。

当研究室では、Pd(II)イオン(M)とビスピリジン配位子(L)の自己集合で形成される $M_{12}L_{24}$ 球状錯体にタンパク質を包接し、その一義孤立空間への閉じ込めを活用したタンパク質の不安定構造の解析に取り組んできた^{2,3}。球状錯体に $A\beta$ を内包することで、その凝集を抑制しアミロイド線維形成前の中間体構造を単離することができる。以前 $A\beta$ の疎水性領域の断片ペプチド2分子を包接した際には、錯体内での選択的な二量体形成が示唆された⁴。

本研究では、球状錯体への閉じ込めにより単離された $A\beta$ 疎水性断片($A\beta_{16-23}$, KLVFFAED)会合体の NMR 構造解析を行った(Fig. 1)。 $A\beta_{16-23}$ を N 末端で2分子縮合した配位子を合成し、無修飾の配位子と Pd(II)イオンとの錯形成により2分子の $A\beta_{16-23}$ を $M_{12}L_{24}$ 錯体へ包接した⁴。 $A\beta_{16-23}$ の疎水性5残基(LVFFA)を ^{13}C , ^{15}N 安定同位体で標識することで、水性条件(50% H_2O/CD_3CN (v/v))での会合体構造を解析した。 1H - ^{15}N HSQC スペクトルでは、標識された5残基に対し主ピークに加えて副ピークが観測された(Fig. 1b)。3次元 NMR で主鎖・側鎖の隣接残基間の相関を調べると、HSQC ピークは主に2組のコンフォメーションに帰属され、会合に伴う $A\beta_{16-23}$ 二分子の非対称化が示唆された。NOESY (nuclear Overhauser effect spectroscopy) NMR により、異なるコンフォメーション間、すなわち会合 $A\beta_{16-23}$ における分子間の NOE 相関が観測された。本発表では、クロスピークの帰属と NOE 相関解析により明らかになった $A\beta_{16-23}$ 会合体の NMR 構造について議論する。

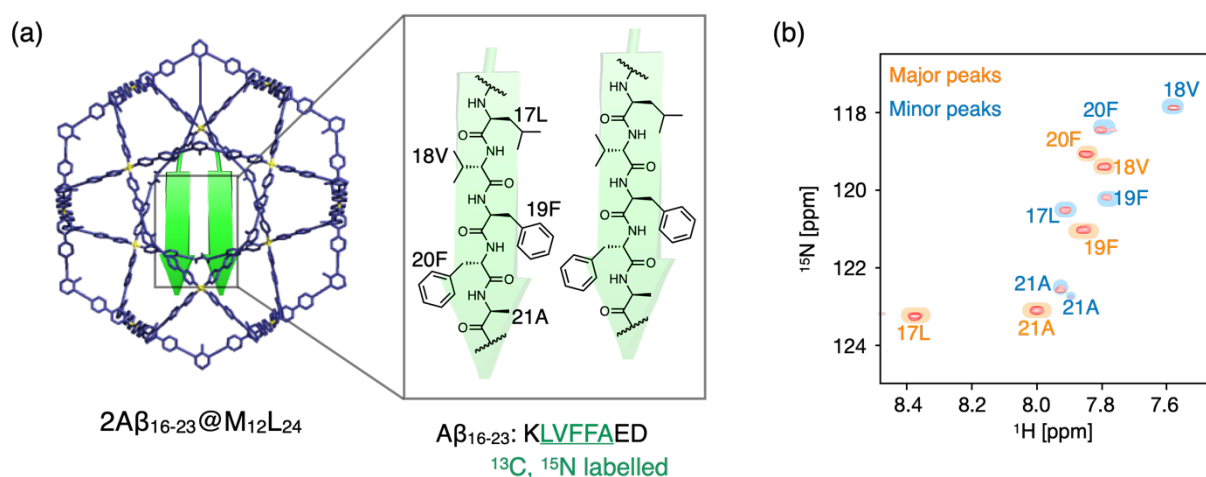


Fig 1. NMR analysis of the dimeric structure of $A\beta$ fragments ($A\beta_{16-23}$) by confinement in a self-assembled $M_{12}L_{24}$ cage. (a) Structure of two $A\beta_{16-23}$ fragments encapsulated in the cage ($2A\beta_{16-23}@M_{12}L_{24}$). (b) 1H - ^{15}N HSQC NMR spectrum of $2A\beta_{16-23}@M_{12}L_{24}$ (500 MHz, H_2O/CD_3CN = 1:1, 300 K).

1) C. Haase, D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2007**, 8, 101-112. 2) D. Fujita *et al.*, *Chem* **2021**, 7, 2672-2683. 3) T. Nakama *et al.*, *Chem. Sci.* **2023**, 14, 2910-2914. 4) 第17回バイオ関連化学シンポジウム **2023**, 2PA-33.

酵素耐性と細胞内移行性の向上を指向した二重架橋ヘリカルペプチドの開発

○安力川哲也, 千葉順哉, 大石雄基, 横山悟, 周越, 井上将彦 (富山大・院薬)

Development of doubly-crosslinked peptides with improved proteolytic resistance and intracellular uptake
(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama) YASUKAGAWA Tetsuya, CHIBA Junya, OHISHI Yuki, YOKOYAMA Satoru, ZHOU Yue, SAKURAI Hiroaki, INOUE Masahiko

タンパク-タンパク間相互作用 (PPI) 場に見られる α -ヘリックス構造を模倣した架橋ヘリカルペプチドは、標的タンパクに対する PPI を制御できる。そしてこれらのペプチドは、抗体と比較して高い膜透過性を有することから、細胞内 PPI を標的とした次世代医薬品の候補として注目されている。

以前我々は、イソフタル酸型架橋剤 **X** を用いてアポトーシス誘導因子 Bad のヘリックス構造を模倣した架橋ヘリカルペプチドを報告した (図 1)¹⁾。このペプチドは標的のリコンビナントタンパク Bcl-xL と強く結合 ($K_d = 6.7$ nM) したが、実際にがん細胞のアポトーシスを誘導するには $10 \mu\text{M}$ 以上のペプチドを投与する必要があった。本研究では、架橋ユニットをペプチドの二箇所を導入することで、酵素耐性の向上と脂溶性の増加による膜透過性の向上を期待し、より低濃度で効果を発揮できる二重架橋ヘリカルペプチドの開発に取り組んだ。

プロテインキナーゼ A 調節サブユニットと選択的に結合する **R1AD** ペプチドの配列を基に、単架橋ペプチド **S1** と二重架橋ペプチド **D1** を設計した。**D1** の合成では、二ペアのオルニチン (Orn:O) の側鎖アミノ基に直交性の高い別個の保護基を導入し、選択的かつ段階的に脱保護し架橋することで高収率での合成に成功した (HPLC 収率 = 77%)。代表的な消化関連酵素のキモトリプシンとトリプシンに対する分解耐性を評価したところ、**D1** は双方の酵素に対して **S1** と **R1AD** よりも顕著に長い半減期を示した (表 1)。これは、キモトリプシンとトリプシンの切断する両方のアミノ酸残基を架橋ユニットで被覆することで分解されにくくなったためだと考えられる。また、蛍光標識化したペプチドの細胞内移行性を評価したところ、**D1** は **S1** よりも高い細胞内移行性を示した (図 2)。

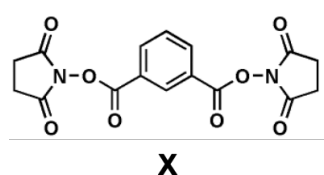


図 1 イソフタル酸型架橋剤

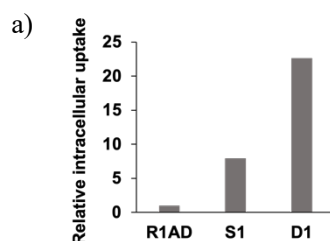
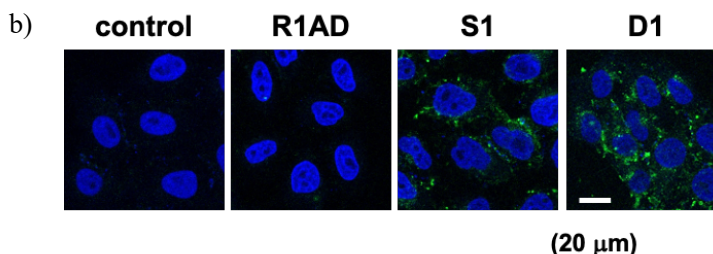


図 2 a) フローサイトメトリーによる細胞内移行性評価 b) 共焦点レーザー顕微鏡画像

Peptides	Sequences	$T_{1/2}$ (h)	
		Chymotrypsin	Trypsin
R1AD	Ac-LEQYANQLADQIIK EATE-NH ₂	0.7	5.7
S1	Ac-OELEQYAOQLADQIIK EATE-NH ₂	31	16
D1	Ac-OELEQYAOQLADQIIK EATE-NH ₂	37	41

表 1 酵素耐性評価



1) M. Inouye et al. *ChemBioChem* 2014, 15, 2571–2576; *Chem. Commun.*, 2017, 53, 12104–12107.

D アミノ酸を利用した大環状ヘキサデカペプチドの合理構築

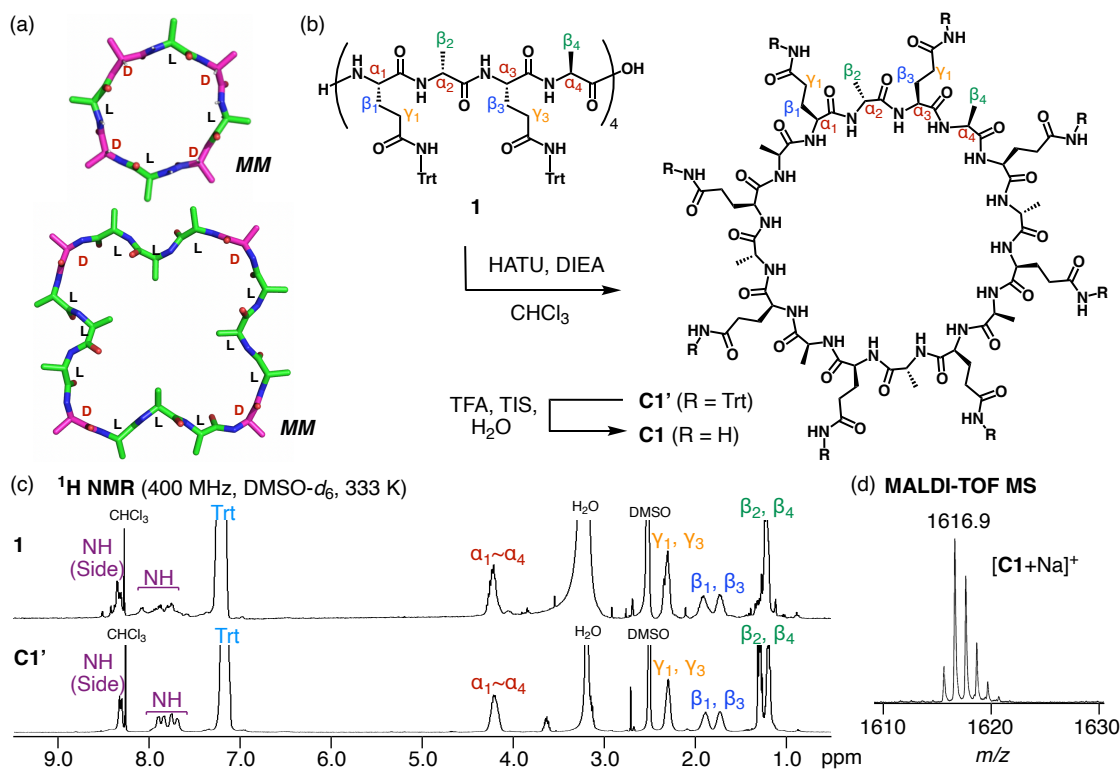
○照岡大岳¹・吉沢道人¹・澤田知久^{1,2} (¹東工大化生研、²JST さきがけ)

Rational Construction of a Macrocyclic Hexadecapeptide with D-Amino Acids (Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech¹, JST PRESTO²) TERUOKA, Hirotake¹; YOSHIZAWA, Michito¹; SAWADA, Tomohisa^{1,2}

L および D-アミノ酸の交互配列をもつ環状オクタペプチドは、主鎖の全てのアミド結合に分子間水素結合が働き、中空構造をもつペプチドナノチューブへと自己組織化する^[1]。このチューブ構造内では、環状ペプチドは β ストランド配座をとっており、D 体の残基で β ストランド配座に湾曲が生じていると考えることができる (図 a 上)。そこで本研究では、より大きな環状ペプチドの合理構築を目指した。L 体のペプチド配列中に D-アミノ酸を周期的に配置した環状ペプチドでは、周期的な湾曲をもつ特異な β ストランド配座の大環状構造となり (図 a 下)、それが集積することで拡張ペプチドナノチューブが生成すると考えた。今回、周期的に D-アミノ酸を組み込んだ 16 残基の鎖状ペプチド **1** から、 C_4 対称の環状構造の四隅に D-Ala と外側に L-Gln と内側に L-Ala を配置させた環状ヘキサデカペプチド **C1** の構築を達成したので報告する。

まず、ペプチド固相合成法を用いて、側鎖をトリチル (Trt) 基で保護した 16 残基の鎖状ペプチド **1** を合成した。**1** に対して、2.5 当量の HATU、5 当量の DIEA をそれぞれ添加し、1 mM の希釈条件下で分子内環化反応を行った (図 b)。環化反応後の ¹H NMR スペクトルでは、主鎖のアミドシグナルが対称化され (図 c)、MALDI-TOF MS 測定からも環化体の分子イオンピークを確認した。得られた環状ペプチド **C1'** に対して、TFA による Trt 基の脱保護を行ったところ、MALDI-TOF MS 測定から目的の環状ペプチド **C1** に由来する分子イオンピークが観測された (図 d)。以上より、D 体を周期配列させた 16 残基の環状ペプチドの合成に成功した。

[1] M. R. Ghadiri, *et.al.*, *Angew. Chem Int. Ed.* **2001**, 40, 988.



オリゴアルギニン付与により生じる細胞毒性を軽減する方法

○荒川主真¹・加藤舞子¹・井上靖道²・林秀敏²・久松洋介¹・梅澤直樹¹・(¹名古屋市立大学大学院薬学研究科・精密有機反応学分野, ²名古屋市立大学大学院薬学研究科・細胞情報学分野)

Methods to reduce cytotoxicity caused by oligoarginine conjugation

(Bioorganic-inorganic Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City Univ.¹; Cell Signalling, Grad. School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City Univ.²) Kazuma Arakawa¹; Maiko Kato¹; Yasumichi Inoue²; Hidetoshi Hayashi²; Yosuke Hisamatsu¹; Naoki Umezawa¹

ペプチドは、タンパク質間相互作用の阻害など低分子化合物では達成が難しい生物活性を示すため、化学ツールや医薬品としての利用が期待されている。ペプチドは細胞膜透過性が低いいため、細胞膜透過ペプチド (CPPs) を付与する方法がよく用いられる。CPP を付与することで、ペプチドやタンパク質などのカーゴ分子が細胞内に移行し、細胞内標的に作用させることが可能となる。これまでに、非常に多くの CPP が報告されているが、Tat (YGRKKRRQRRR) やオリゴアルギニン(R₈, R₁₀)などのカチオン性に富む CPP が汎用されている。

筆者らは、既知の p53/MDM2 タンパク質間相互作用阻害ペプチドに Tat やオリゴアルギニンなどの CPP を付与すると細胞毒性が生じ、細胞内の p53/MDM2 タンパク質間相互作用の阻害が認められないことを明らかにしている。また、細胞内に導入されるとアポトーシスを誘導するペプチド (proapoptotic domain peptide; PAD, ^D[KLAKLAK]₂) に R₈ を付与しても細胞毒性が生じた。毒性を低減するため種々の化学修飾を進めたところ、オリゴエチレングリコール構造の導入により、細胞毒性が低減する傾向が認められた。本発表では、分岐構造をもつ PEG を導入することによる効果について報告する。

既知の p53/MDM2 タンパク質間相互作用阻害ペプチド 4 種に R₈ と PEG 構造を付与したペプチド **1**~**4** を設計・合成した (図 1)。導入した PEG 構造は、ペプチドの proteolysis に対する安定性向上に用いられた、既知の構造である (Y. Fujiwara, Y. Yamanashi, A. Fujimura, Y. Sato, T. Kujirai, H. Kurumizaka, H. Kimura, K. Yamatsugu, S. A. Kawashima, M. Kanai, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 118 (4) e2019554118)。コントロールとして、PEG 構造をもたないペプチド **5**~**8** も検討した。蛍光偏光アッセイを用いて p53/MDM2 相互作用の阻害活性を評価したところ、PEG の付与により 2.6~3.2 倍活性が低下したが (図 1)、**1** は 119 nM と強い IC₅₀ 値を維持していた。細胞系での p53/MDM2 阻害活性を評価するレポーターアッセイを行ったところ、PEG をもたないペプチド **5**~**8** はいずれも阻害活性を示さなかった。一方、**1** は 20 μM で若干、50 μM で強い活性を示し、**2** も 50 μM で若干活性を示した。MTT アッセイで細胞毒性を評価したところ、PEG をもたないペプチド **5**~**7** は 10 μM、**8** は 50 μM で強い細胞毒性を示した。ペプチド **1**~**4** は高濃度で細胞増殖抑制を示したが、p53 ノックダウン細胞を用いた結果と違いが見られ、p53/MDM2 阻害に起因する結果と考えられる。以上のように、PEG を付与することで細胞毒性が軽減する可能性が示唆された。アポトーシスを誘導する PAD の結果についても併せて報告する予定である。

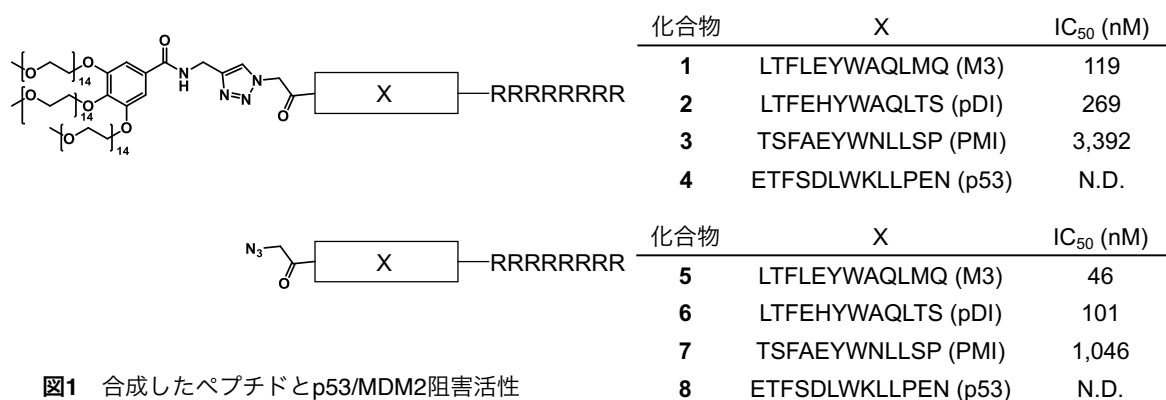


図1 合成したペプチドとp53/MDM2阻害活性

浸透圧応答的な YK ペプチド融合 sfGFP の細胞内液滴形成

○清水雅俊¹・相田卓三¹・三木卓幸¹ (¹ 東大院工)Osmotic pressure-responsive droplet formation of de novo YK peptide-fused sfGFP in living cells (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹) SHIMIZU, Masatoshi¹; AIDA, Takuzo¹; MIKI, Takayuki¹

生体内で浸透圧ストレスは、血液を透析する腎臓のみならず炎症部位でも生じ、血圧調節や免疫活性にも関係する重要な生理現象である。また細胞レベルでは、浸透圧変化は細胞の増幅や分化にも影響を与えることが知られる。しかし、浸透圧を細胞内でセンシングする分子技術や浸透圧ストレスに応じたタンパク質の操作技術は十分に開発されておらず、分子レベルでの浸透圧ストレスの理解が困難である。

これまで我々は、液滴形成機構の解明と細胞工学への応用を目指し、人工的に細胞内に液滴を形成させる設計ペプチドタグの技術開発に取り組んできた。具体的には、疎水性アミノ酸チロシン (Y) と親水性アミノ酸リシン (K) が交互に並ぶ両親媒性 13 残基のペプチド (YK13) が液滴形成を誘導することを発見した[1]。YK ペプチドは ATP (アデノシン三リン酸) などのポリアニオン存在下で自己集合し、細胞内で融合タンパク質を集積化するタグとして機能する。具体的には、NES (核外排出シグナル) と YK13 ペプチドを融合した sfGFP (緑色蛍光タンパク質) である NES-YK13-sfGFP を COS-7 細胞で発現させると、液滴を形成した。

その研究の過程で、鎖長の短い NES-YK11-sfGFP が、浸透圧変化に応じて液滴を形成することを見つけた。NES-YK11-sfGFP の大部分は等浸透圧条件下 (300 mOsm/L) では、サイトゾルで均一に分散したが、高浸透圧条件下 (700 mOsm/L) で液滴を形成した (図 1)。逆に、等浸透圧条件で形成されていた NES-YK13-sfGFP の液滴は、低浸透圧条件で崩壊し均一に分散した。本実験では、浸透圧変化に応じた YK-sfGFP による人工液滴の形成について、その詳細を検討した。

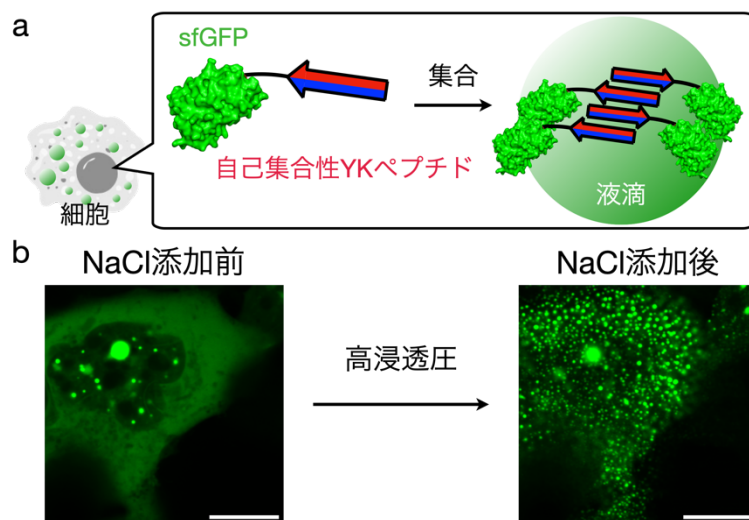


図 1. 浸透圧変化に応じた YK ペプチド融合蛋白質の細胞内液滴の形成

(a) 自己集合性ペプチド YK 融合 sfGFP による液滴形成

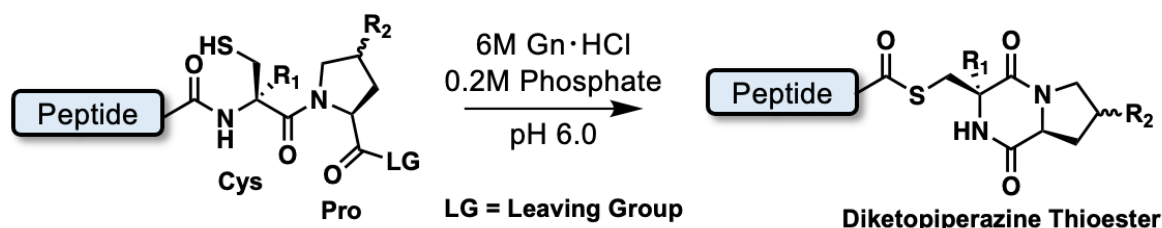
(b) 高浸透圧に応じた NES-YK11-sfGFP の液滴形成. NaCl を osmolyte として添加した 700 mOsm/L D-MEM 培地の添加前では、NES-YK11-sfGFP は細胞質で分散状態であるが、添加後 1 min で多くの液滴が形成した。(scale bar 10 μ m)

アミノ酸への置換基導入によるペプチドチオエステル合成の効率化 とチオエステル形成反応機構の解析

○中村元紀¹・中津幸輝¹・林剛介¹・村上裕^{1,2} (¹名大院工、²名大ナノライフ研)

Efficient Synthesis of Peptide Thioesters via Introduction of Substituents into Amino-acids and Evaluation of Thioester Formation Mechanism (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.¹, Institute of Nano-Life-Systems, Nagoya Univ.²) NAKAMURA Genki¹; NAKATSU Koki¹; HAYASHI Gosuke¹; MURAKAMI Hiroshi^{1,2}

Native Chemical Ligation (NCL)はペプチドの C 末端チオエステルと N 末端システインを反応させて、ペプチド鎖を連結する反応¹である。ペプチドチオエステルは NCL 反応に不可欠な活性種であるが、最も汎用されるペプチド合成法である Fmoc 固相合成法では、Fmoc 基の脱保護で使用する塩基性条件にチオエステル構造が不安定なため、チオエステルそのものの合成は困難であり、チオエステル前駆体として合成する必要がある。我々はチオエステル前駆体として C 末端に「Cys-Pro-脱離基」構造をもつチオエステル前駆体の開発を行ってきた^{2,3}。このチオエステル前駆体は Cys 残基の N-S アシルシフトおよび分子内 6 員環形成反応を伴い、最終的にジケトピペラジン構造を有するペプチドチオエステルへと変換される (図)。本研究では、Cys 残基や Pro 残基に置換基を導入し、その置換基がチオエステル形成反応に与える影響について比較・検証することにした。置換基は、Cys の α 位および Pro の γ 位に導入することとし、Cys α 位にはメチル基を、Pro γ 位には様々な置換基を導入した。



初めに α 位にメチル基を有するシステイン (MeCys) を有するモデルペプチドを Fmoc ペプチド固相合成によって合成を試みた。しかし、目的のペプチドに加えて MeCys-Pro が欠損したペプチドが同程度生成したため、合成条件の最適化を行った。その後、得られた「MeCys-Pro-ピラゾール (脱離基)」構造含有ペプチドを用いてチオエステル化反応を行ったところ、メチル基を含まないペプチドと比較して反応速度の顕著な向上が観測された。一方 Pro 残基の γ 位に置換基を導入したペプチドにおいてもチオエステル化を加速する修飾が複数見つかった。特にヒドロキシ基やアミド基を修飾した場合、これらの置換基に含まれるプロトンが隣接カルボニル基に対して水素結合ドナーとして機能することでジケトピペラジン形成を加速することが明らかとなった。さらに反応機構の詳細な解析により、ジケトピペラジンチオエステル形成反応機構が従来考えられてきた「N-S アシルシフト→6 員環 (ジケトピペラジン環) 形成」ではなく、「分子内 7 員環形成→6 員環 (ジケトピペラジン環) 形成→N-S アシルシフト」という経路を通る確率が高いことが示唆され、新たな反応機構を提唱するに至った。

1. P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* 1994, **266**, 776-779.
2. M. Yanase, K. Nakatsu, C. J. Cardos, Y. Konda, G. Hayashi, A. Okamoto, *Chem. Sci.* 2019, **10**, 5967-5975.
3. K. Nakatsu, M. Yanase, G. Hayashi, A. Okamoto, *Org. Lett.* 2020, **22**, 4670-4674.

分割インテインを用いた標的タンパク質結合ペプチドの探索

○信澤佳奈、渡辺雄太郎、高橋剛（群馬大院理工）

Selection of peptides that bind to target proteins using an engineered split intein (Graduate School of Science and Technology, Gunma University) NOBUSAWA, Kana; WATANABE, Yutaro; TAKAHASHI, Tsuyoshi

近年、バイオ医薬品に関する研究が盛んに行われている。中でもペプチドなどの中分子を用いた医薬品は、合成が容易で低コストで製造できる点から注目されている。ペプチドライブラリから目的とする標的タンパク質に結合する分子を探索する方法として、ファージディスプレイ法や、mRNA 法などが開発されている。これらの方法は、試験管内で標的タンパク質との親和性に依存したスクリーニングを行う必要がある。そのため、固相単体であるビーズなどに非特異的吸着を起こしてしまう可能性がある。

当研究室では、タンパク質トランススプライシング (PTS) 活性をもつ改良型分割インテインを用いたペプチド探索法の開発を行ってきた。Npu DnaE インテインを改変後¹、分割位置を変更することで、分割インテイン同士の自発的な会合を抑制した。N 末端側の分割インテイン (Int_N) に標的となるタンパク質を配置し、C 末端側の分割インテイン (Int_C) に標的タンパク質と相互作用するペプチドを配置した。これにより、ペプチド-タンパク質間相互作用に依存して PTS 反応が進行し、分割インテインの両末端に連結しているエクステイン (Ext) が再構成する系を構築した (図)。実際に、PTS 反応の生成物として、TEM-1 β -lactamase が生成する系を用いると、タンパク質-ペプチド間相互作用が β -lactamase 活性を指標として検出できることが分かった²。

本研究では、PTS 反応の生成物としてカナマイシンキナーゼである aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) を用いることで、カナマイシン含有培地中での大腸菌の生育により、標的タンパク質に結合するペプチドの探索を目的とした。murine double minute 2 (MDM2) と Kelch-like ECH associating protein 1 (Keap1) を標的タンパク質として、MDM2 および Keap1 に結合するペプチドの探索を試みた。

標的タンパク質である MDM2 や Keap1 遺伝子上流に APH の N 末端側および Int_N の遺伝子を配置した。12 アミノ酸からなるペプチドライブラリ遺伝子の下流に Int_C と APH の C 末端 7 残基のアミノ酸をコードする遺伝子を配置した。構築したプラスミドで大腸菌を形質転換し、isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) でタンパク質の発現を誘導した。18°C で 4 時間培養した後、kanamycin 含有寒天培地で大腸菌を塗布し、18°C で数日間培養した。得られたコロニーからプラスミドを抽出し、配列解析した。MDM2 を標的とした実験では、MDM2 と強く結合するペプチドの獲得に成功した。

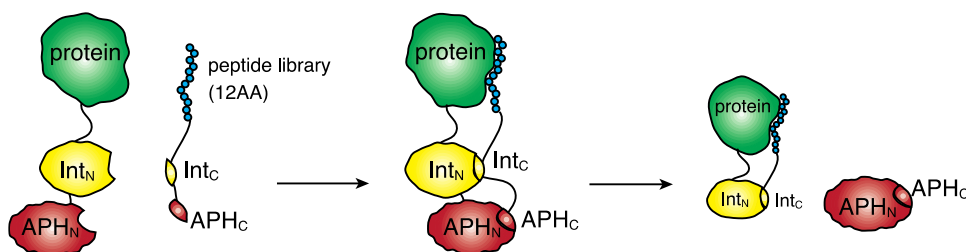


図 タンパク質-ペプチド間相互作用に依存した PTS 反応

1. Kawase, M., Fujioka, M., Takahashi, T. (2021) *ChemBioChem*, **22**, 577-584.
2. Hagiwara, H., Fujii, E., Iwabuchi, T., Takahashi, T. (2024) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **97**, uoae019.

分割インテインを用いた特定のペプチド配列を認識するタンパク質の探索

○清水もも花・信澤佳奈・高橋剛（群馬大院理工）

Selection of proteins that bind to a peptide sequence using an engineered split intein (Graduate School of Science and Technology, Gunma University) SHIMIZU, Momoka; NOBUSAWA, Kana; TAKAHASHI, Tsuyoshi

タンパク質間相互作用（protein-protein interaction; PPI）は、生物機能の発現において重要な役割を担っている。PPI では、特定の三次構造を形成したタンパク質間で相互作用するものだけでなく、タンパク質中の特定の立体構造をとらない天然変性領域（intrinsically disordered region; IDR）内にある、短鎖のペプチドモチーフ（short linear motif; SLiM）を介した相互作用が多く存在することが知られている。このような、短鎖のペプチドとタンパク質間の相互作用を理解することは、生物機能の理解だけでなく、創薬においても重要である。

当研究室では、タンパク質トランススプライシング（protein trans-splicing; PTS）活性をもつ分割インテインを利用したペプチド-タンパク質間相互作用検出法の開発を行っている。この方法では、自発的な PTS 活性を示さないよう改変した分割インテインに、ペプチドと標的タンパク質をそれぞれ配置し、ペプチド-タンパク質間相互作用に依存して PTS 反応が進行する。PTS 反応の生成物として、TEM-1 β -lactamase を用いることで、ペプチド-タンパク質間相互作用の有無を大腸菌の抗生物質耐性を指標として判断することができる¹。本研究では、カナマイシンを無毒化する aminoglycoside 3'-phosphotransferase（APH）と分割インテインを用い、特定のペプチド配列を認識するタンパク質の探索法の開発を目的とした。

ペプチド配列として、Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) に結合することが知られている、nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の 73 残基目から 84 残基目の配列（QLQLDEETGEFL; Nrf2 ペプチド）を用いた。Nrf2 ペプチドは、C インテインおよび C 側 APH との融合体として発現させた。タンパク質ライブラリは、ヒト胎盤由来 cDNA ライブラリをもとに、N インテインおよび N 側 APH との融合体として発現させた。大腸菌をカナマイシン含有培地で培養し、Nrf2 ペプチドと相互作用するタンパク質を発現する大腸菌のスクリーニングを行った（図）。

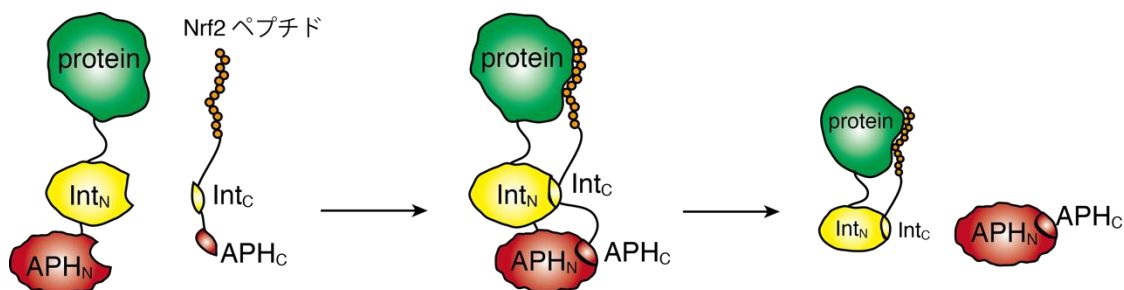


図 分割インテインと分割 APH を用いた Nrf2 ペプチドに結合するタンパク質の探索の模式図

1. Hagiwara, H., Fujii, E., Iwabuchi, T., Takahashi, T. (2024) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **97**, uoae019.

分割インテインとルシフェラーゼを用いた脱糖鎖酵素 ENGase 活性を発光検出するプローブの開発

○相京碧¹・高橋諭²・石井希実²・松尾一郎²・吉田雪子³・鈴木匡⁴・高橋剛²

(¹群馬大理工、²群馬大院理工、³東京都医総研、⁴理研)

Development of a luminescent probe for detecting the activity of the deglycosylating enzyme ENGase using split intein and luciferase (Department of Science and Technology, Gunma University¹, Graduate School of Science and Technology, Gunma University², Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science³, RIKEN⁴) AIKYO, Midori¹; TAKAHASHI, Satoshi²; ISHII, Nozomi²; MATSUO, Ichiro²; YOSHIDA, Yukiko³; SUZUKI, Tadashi⁴; TAKAHASHI, Tsuyoshi²

タンパク質の翻訳後修飾の一つである *N* 結合型糖鎖は、タンパク質の安定性や機能などの制御に重要な役割を果たしている。小胞体で機能的なフォールディングができなかった糖タンパク質は、細胞質へと逆輸送され、細胞質で分解される。この小胞体関連分解 (ERAD) 経路において、細胞質ペプチド: *N*-グリカナーゼ (PNGase) は、糖鎖の根元とアスパラギン側鎖の結合を切断し、遊離した糖鎖は、エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) などにより処理される。ENGase は、糖タンパク質にも直接作用し、タンパク質上に *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 1 残基を残して糖鎖を遊離する。そのため、細胞質の PNGase 活性が低下すると、ENGase が直接糖タンパク質に作用する割合が高くなると予想される。

当研究室では、タンパク質トランススプライシング (PTS) 活性をもつ分割インテインの開発を行っている。エクステインに発光特性に優れた NanoLuc ルシフェラーゼを用いることで、PTS 反応の進行をルシフェラーゼ発光で評価する系を構築した¹。この系を応用して、PNGase の最小基質である GlcNAc 2 残基からなる *N,N'*-diacetylchitobiose を導入したペプチドを用いて、PNGase 活性を細胞内で発光検出する方法を開発した²。本研究では、トリマンノシルコア 5 糖 (Man3GlcNAc2) を導入したペプチドとインテインを利用した ENGase 活性検出系の構築を試みた。

分割インテインとして、11 アミノ酸からなる *N* インテイン (IntN11) と、*Npu* DnaE インテインを改良した IntCmut3 C インテインを用いた¹。IntN11 配列中に糖鎖を導入することで、ENGase による脱糖鎖反応により生成したペプチドが IntCmut3 と相互作用することで、PTS 反応が進行することを期待した。ENGase の脱糖鎖反応により生成するペプチドには GlcNAc 1 残基が残るため、*N* インテインに GlcNAc をもつペプチドと効率よく反応する C インテインの設計を試みた。IntCmut3 中の *N* インテインとの結合部位近傍の 67 番目のアルギニンや、114 番目のグルタミンを糖との相互作用でよく見られるトリプトファンに置換した C インテインを設計した。

GlcNAc および Man3GlcNAc2 を側鎖にもつアスパラギンを合成し、Fmoc 固相合成法により、ペプチドを合成した。IntCmut3 変異体は、大腸菌で発現させ、Ni-NTA およびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。NanoLuc の発光測定から、トリプトファンを導入した IntCmut3 は、Man3GlcNAc2 をもつペプチドよりも GlcNAc をもつペプチドとの反応で高い発光値を示した。この結果から、設計したペプチドと IntCmut3 変異体は、ENGase 検出プローブとして利用できることが示唆された。

1. Kawase, M., Fujioka, M., Takahashi, T. (2021) *ChemBioChem*, **22**, 577-584.

2. Takahashi, T., Uchibayashi, T., Ishii, N., Matsuo, I., Yoshida, Y., Suzuki, T. (2022) *Chem. Commun.*, **58**, 13282-13285.

ナノポアライブラリの構築および測定・解析手法の確立

○小林 もえ¹・仮屋 拓斗¹・栢森 史浩¹・彭 祖癸²・川村 出³・川野 竜司²・臼井 健二¹ (甲南大 FIRST¹、東京農工大工²、横浜国立大工³)

Construction of Nanopore peptidic library and Analysis Methods for Nanopore Formation (¹*Faculty of Frontiers of Innovative Research and Technology (FIRST), Konan University*, ²*Department of Biotechnology, Tokyo University of Agriculture and Technology*, ³*Graduate School of Engineering Science, Yokohama National University*) KOBAYASHI, Moe¹; KARIYA, Takuto¹; KAYAMORI, Fumihiko¹; ZUGUI, Peng²; KAWAMURA, Izuru³; KAWANO, Ryuji²; USUI, Kenji¹

一分子認識能を有するナノポア (数 nm の細孔) は単一分子センサーやシーケンサーとしての開発が進められており、医療や環境などの様々な分野での応用が期待されている。ナノポアの分子選択能は、設計されたナノポアの構造やサイズに依存する。しかし、現状のナノポア作製法では、ナノポアの形状やサイズの制御や、機能をもつ官能基の付与などが難しい。そこで我々は、タンパク質の小型版であるペプチドを用いたナノポアに着目し、最近、 β シートペプチドから成る β -バレル型ナノポアを開発した¹⁾。このペプチドは、自己集合により比較的安定な機能性ナノポアの形成が可能であり、電気計測や分子シミュレーションによって会合数も見積もられている。本研究では、様々な機能性官能基を付与できるペプチド固相合成の利点を活かし、ナノポアペプチドライブラ리를構築し、それらのナノポア形成における網羅的な各種測定・解析手法の確立を目指す。

まず、ライブラリ作製のための簡便な合成手法の確立を行った。これまでのナノポア形成 β シートペプチドの合成では、凝集を抑制するために、*O*-アシルイソペプチド法²⁾を用いていたが、配列設計に制限がかかる上、煩雑な実験操作が必要であった。そこで、光照射のみで簡便にペプチドを脱樹脂できる光開裂リンカーを導入し、通常のペプチド合成によってライブラ리를構築し、測定の直前でペプチドを脱樹脂できる手法を考えた。樹脂には Amino PEGA Resin、光開裂リンカーとして *O*-フェニルプロピオニルリンカー³⁾を用いて、固相合成により樹脂に担持されたナノポアペプチドを得た。この樹脂担持ペプチドへの光照射後、CD 計測や電気計測などの各種分析を行ったところ、*O*-アシルイソペプチド法により合成したペプチドと同様の結果が得られた。よって、本手法を用いることにより、従来では不可能であったペプチドの高純度合成と簡便なナノポア解析が可能であることが示唆された。

次に、様々な機能性官能基を付与したペプチドを作製するため、ペプチドの N 末端にアジド基を導入し、様々なアルキン化合物とのクリック反応を用いることを検討した。現在、膜中でのナノポア形成時におけるジベンゾシクロオクテン (DBCO) を用いた銅フリーのクリック反応⁴⁾を試みている。MALDI-TOF MS にて目的物の分子量の確認を行ったほか、蛍光測定によりペプチド配列に含まれているチロシン由来の蛍光の消光が確認されたことから、クリック反応の進行が示唆された。

さらに、ナノポア形成ペプチドの各種解析手法の確立においては、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた会合数の評価や、臨界凝集濃度⁵⁾の算出も試みている。今後は、ナノポアペプチドライブラ리를構築し、ライブラリ配列と実際のナノポアの立体構造や機能、サイズの相関を網羅的に解析することにより、様々な分子選択能をもつナノポアペプチドの設計が可能となることが期待できる。

1) K. Shimizu et al. *Nat. Nanotech.*, **17**, 67–75 (2022), 2) Y. Sohma et al. *Chem. Commun.*, 124–125 (2004), 3) K. Usui, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8332 (2020), 4) J. Nicholas, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15046–15047 (2004), 5) K. Usui et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 18563–18568 (2009)

細胞認識部位含有ペプチドによる金ナノロッドの修飾と

疎水環境による抗ガン剤の担持性能評価

○山岡湖ノ波¹・今井崇人¹・浅野昌弘²・富崎欣也¹ (龍谷大先端理工)

Modification of gold nanorods with peptides containing a cell recognition site and evaluation of anti-cancer drug loading performance by the hydrophobic environment of the composites (¹*Department of Materials Chemistry*, ²*Ecology and Environmental Engineering Course, Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University*) ○Conoha Yamaoka¹, Takahito Imai¹, Masahiro Asano², Kin-ya Tomizaki¹

近年、腫瘍を標的とする併用療法が注目されている。その中でも、化学療法と光熱療法(PTT)の併用は効果的であると考えられる。本研究では、ガン細胞に過剰発現しているインテグリンの $\alpha 5 \beta 1$ を認識し細胞接着を誘発する RGDS ペプチド及び 11-メルカプトウンデシルテトラエチレングリコール (MUTEG) により金ナノロッドを修飾し、金ナノロッド表面の MUTEG が形成する疎水環境に抗ガン剤ドキシソルビシン(Dox)を担持させた。本研究では、Dox の担持性能と近赤外照射による放出能を目指す。

まず、CTAB(ヘキサデシルトリメチルアンモニウム)法を用いて金ナノロッドの合成を行った。得られた金ナノロッドにポリエチレングリコールメチルエーテルチオールと MUTEG を加え 30 分間水溶液中で反応させ表面修飾した。次いで、RGDS ペプチドと 24 時間水溶液中で反応させ表面修飾した。最後に、Dox と 48 時間水溶液中で反応させることにより AuNR-PEG-MUTEG-peptide-Dox(AuNR-P-U-p-Dox)を合成し、物性評価を行った。

まず、UV-vis スペクトル測定により、金ナノロッドの最大吸収波長が 725 nm から 732 nm へ赤方偏移したことから、金ナノロッド表面の誘電率変化を確認した。また、PEG:MUTEG を変化させ得た AuNR-P-U-p では凝集が確認された (Fig. 1.)。次に、蛍光測定により、AuNR-P-U-p-Dox の Dox 担持率が PEG:MUTEG 比で変化することを確認した(Fig. 2.)。

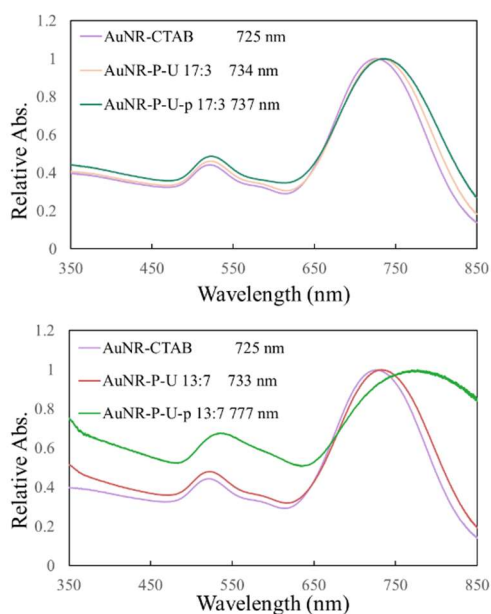


Fig. 1. 各複合体の UV-vis 吸収スペクトル

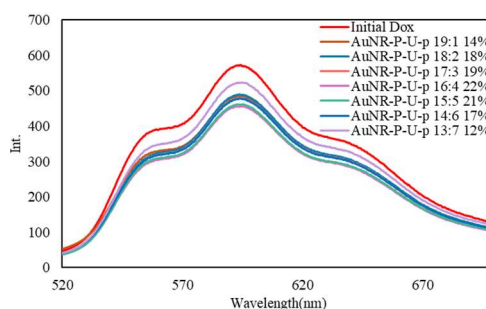


Fig. 2. 蛍光スペクトル

肝細胞ガン標的ペプチドで修飾した金ナノロッドによるフォトサーマル効果の検証

○藤本翔也¹・今井崇人¹・浅野昌弘¹・山崎正幸²・富崎欣也¹(龍谷大先端理工¹・龍谷大農²)

Photothermal Effects of Gold Nanorods Modified with Hepatocellular Carcinoma Targeting Peptides
(Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University¹, Department of Food Sciences and Human Nutrition, Ryukoku University³) FUJIMOTO Shoya¹ ; IMAI Imai¹ ; ASANO Masahiro¹ ; YAMASAKI Masayuki² ; TOMIZAKI Kin-ya¹

近年、光熱変換特性をもつ金ナノロッドを用いたフォトサーマル療法(PTT)が低侵襲治療戦略としてガン細胞の選択的治療に注目されている [1]。本研究では、肝細胞ガンの細胞膜上に多く存在するグルコース制御タンパク質である GRP78 と特異的に結合する SP94 ペプチドを用いた DDS を指向している。そこで、本研究では SP94 の構造を含む RU188 ペプチドを用いて金ナノロッドを優先的に肝細胞ガンに送達し、外部から近赤外光を照射することによる金ナノロッドの発熱を用いて肝細胞ガンに損傷を与えることを目的とし、金ナノロッドと RU188 ペプチドの複合体評価と二種類のガン細胞を用いた PTT の検証を行った。

RU188 ペプチドを Fmoc 固相合成法により合成し、HPLC で精製、MALDI-TOF-MS で同定した。このペプチドはシステイン残基の側鎖に配置されたチオール基が金ナノロッド表面に結合し、アミノオクタン酸により金ナノロッド表面に自己組織化単分子膜の形成を期待した。次いで、CTAB 法を用いて金ナノロッドを合成し mPEG-SH を 30 分間水溶液中で表面修飾した。次いで RU188 ペプチドにより 24 時間水溶液中で表面修飾し目的物の合成を行い、UV-vis、ゼータ電位測定、IR 測定によって物性評価を行った。さらに TEM により金ナノロッドの形態観察を行った。また、近赤外光照射による光熱変換特性を評価した。まず、TEM 画像からロッド形態の金ナノロッドが確認でき、その平均幅は長軸 58.5 ± 1.5 nm、短軸 20.0 ± 0.6 nm、アスペクト比 3.0 ± 1.0 であることが確認された。また、808 nm NIR を $2\text{W}/\text{cm}^2$ の強度で 5 分間照射した。金ナノロッド-ペプチド複合体溶液は 5 分間の照射で最大 43°C まで上昇した(Fig 1)。

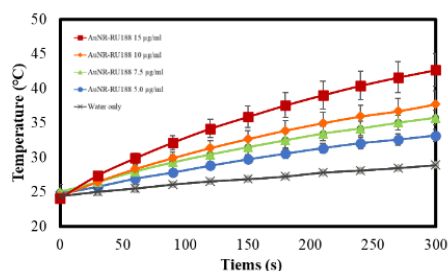


Fig 1 .AuNR-P-RU188の照射実験

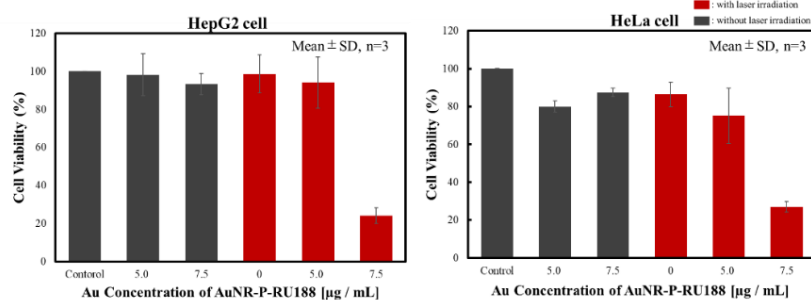


Fig 2 .AuNR-P-RU188の細胞毒性評価

In vitro において金ナノロッド-ペプチド複合体を 3 時間インキュベーション後に 808 nm NIR を $2\text{W}/\text{cm}^2$ の強度で 5 分間照射した際の細胞毒性評価を行ったところ、HepG2 cell、HeLa cell とともに金ナノロッド濃度が $7.5\mu\text{g}/\text{mL}$ で PTT の効果を示した(Fig 2)。しかし、二種類のガン細胞間で顕著な毒性の差は見られなかった。これは、遊離金ナノロッドの発熱の影響が考えられる。今後は、金ナノロッドの細胞送達量の評価を行う。

[1] Ying Zhang. et al. Anal. Chem. 2020, 92, 3882-3887

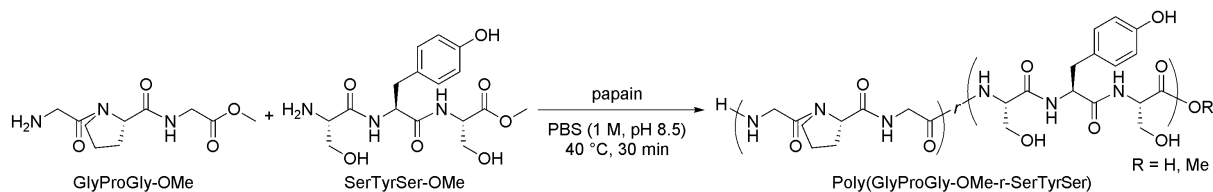
ジチロシン架橋によるレジリン様ポリペプチドの化学酵素合成

○寺田佳世¹・武村翔吾¹・辻優依¹・土屋康佑²・沼田圭司^{1,3} (¹京大院工、²東大院工、³理研)

Chemoenzymatic synthesis of resilin-like polypeptides by dityrosine crosslinking (Graduate School of Engineering, Kyoto Univ. ¹, Graduate School of Engineering, Univ. of Tokyo ², RIKEN ³) **TERADA, Kayo**¹; **TAKEMURA, Shogo**¹; **TSUJI, Yui**; **TSUCHIYA, Kousuke**²; **NUMATA, Keiji**^{1,3}

レジリンは、昆虫の羽や脚の付け根などに存在する弾性タンパク質で、架橋されたレジリンはレジリエンスおよび疲労寿命に優れている[1, 2]。レジリンの架橋は、チロシン (Tyr) 残基が側鎖間で結合したジチロシンにより形成されており、このジチロシン架橋がレジリンの弾性的な網目構造の構築に寄与している。2005年に初めて、レジリンの繰返し配列を用いたレジリンの人工生成 (Rec1-resilin) が報告された[1]。以降、Rec1-resilin を始めとした resilin-like polypeptides (RLPs) の幅広い研究がなされている[3]。しかし、アミノ酸配列に由来する高次構造と物性の相関が未解明であることや、生合成では分子設計に制限があるといった問題がある。そこで本研究では、これらを解決する手法として、RLPs の化学酵素合成に注目した。弾性タンパク質のエントロピー弾性に寄与することが知られるグリシン (Gly) とプロリン (Pro) [4]を含む GlyProGly 配列と、水酸基を有するセリン (Ser) とジチロシン架橋に利用される Tyr を含む SerTyrSer 配列を有する共重合体、poly(GlyProGly-*r*-SerTyrSer)を設計した。

共重合体の合成には、繰返し配列を有するポリペプチドを容易に合成できる化学酵素合成法を用いた (Scheme 1)。パパインを触媒として、GlyProGly エステル誘導体 0.30 M、SerTyrSer エステル誘導体 0.70 M、pH 8.5、40 °C、30 分の条件で共重合を行うと、沈殿が収率 15% で生じた。MALDI-TOF MS により、沈殿と上澄溶液の成分を調べると、沈殿には最大重合度 (DP_{max}) 9、上澄溶液には DP_{max} 16 の poly(GlyProGly-*r*-SerTyrSer)が含まれており、沈殿は SerTyrSer 配列を、上澄溶液は GlyProGly 配列を多く含むことが分かった (それぞれ、SYS rich 共重合体、GPG rich 共重合体)。



Scheme 1. Chemoenzymatic copolymerization of GlyProGly-OMe and SerTyrSer-OMe using papain

得られた共重合体について WAXD、FT-IR、および CD スペクトル測定による二次構造解析を行った。SYS rich 共重合体は β -シート構造を形成して沈殿し、GPG rich 共重合体はランダムコイル構造を形成して水に溶解したことが示唆された。

次に、poly(GlyProGly-*r*-SerTyrSer)のジチロシン架橋を、過酸化水素存在下、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の酵素反応を利用して行った。反応溶媒である水への溶解性に鑑み、得られた共重合体のうち GPG rich 共重合体を用いた。反応前後の共重合体について、紫外可視および蛍光分光測定を行うと、それぞれ 300 nm より長波長側での吸収強度、410 nm 付近での蛍光強度の増大が見られ、ジチロシン架橋の進行が確認された。共重合体の動的粘弾性測定を架橋前後で行ったところ、架橋前は G'が G''よりも大きく、主鎖または側鎖間の水素結合や Tyr 側鎖間の π - π 相互作用などの物理架橋によって網目構造が形成された可能性が示唆された。一方、架橋後は G'と G''がともに向上した。これは、ジチロシン架橋により網目構造がより多く形成されたためと考えられる。以上により、レジリンを模倣したジチロシン含有ポリペプチドの化学合成を達成した。

[1] Elvin, C. M. et al. *Nature*, **2005**, 437, 999-1002. [2] Qin, G. et al. *Nat. Commun.* **2012**, 14, 1003. [3] Balu, R. et al. *Nat. Commun.* **2021**, 12, 149. [4] Sogawa, H. et al. *Polym. Chem.* **2020**, 11, 3152.

MTS 誘導体を用いたがん選択的なペプチドの合成と特性評価

(¹ 龍谷大先端理工,² 龍谷大農) ○齋田颯心¹、山崎正幸²、富崎欣也¹

Synthesis and characterization of a mitochondria transfer signal peptide derivative.

(¹ Ryukoku University Department of Materials Chemistry, ² Ryukoku University Department of Food Sciences and Human Nutrition) ○SAITA Soshin¹, YAMASAKI Masayuki², TOMIZAKI Kin-ya¹

【緒言】ミトコンドリアは ATP の産生やアポトーシスに関与する細胞小器官である。がん細胞のミトコンドリアを攻撃してシトクロム c を放出させることで意図的にがん細胞でのアポトーシスを誘発する事ができる。先行研究では、ミトコンドリア移行シグナル(MTS)配列を自己集合化ペプチドのN末端に結合した MTS-pA を用いた細胞毒性評価により、がん細胞への優位な毒性発現が確認された(Fig. 1)。このことは、MTS が α -ヘリックス構造を形成する際、カチオン性の側鎖と疎水性の側鎖が分離配置される両親媒性 α -ヘリックス構造となり、これがヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフをもつことでがん選択性が発現したのではないかと考えられる。本研究では、がん選択性に重要な二次構造モチーフを特定するために、MTS-pA 配列の一部を欠損させたペプチドを2種合成し、それらの構造および細胞毒性について調べた。

【実験】MTS は2つのヘリックス部位を有することから、どちらのヘリックスが細胞毒性に寄与しているかを調べるため、MTS 部の C 末端側ヘリックスを欠損させたペプチドを MTS Δ C-pA、N 末端側ヘリックスを欠損させたペプチドを MTS Δ N-pA として設計した(Fig. 1)。ペプチドを固相合成法により合成し、HPLC にて精製、MALDI-TOF-MS により同定したペプチド濃度を 100 μ M とし、PBS 緩衝液 (pH 7.4)、トリフルオロエタノール (TFE) 及び 20 mM SDS 含有 PBS 緩衝液の3種類の溶媒を用いて、CD スペクトルによるペプチドの二次構造評価を行った。また、細胞毒性評価では、先行研究において優位性が顕著であったペプチド濃度 10 μ M とし、がん細胞として HeLa 細胞を用いて細胞生存率を測定し、毒性を評価した

MTS-pA : Ac-M-L-R-A-A-L-S-T-A-R-R-G-P-R-L-S-R-L-L-G-G-G-A-A-K-A-2Naf-K-A-A-NH₂
MTS Δ C-pA : Ac-M-L-R-A-A-L-S-T-A-R-R-G-P- -G-G-G-A-A-K-A-2Naf-K-A-A-NH₂
MTS Δ N-pA : Ac- -G-P-R-L-S-R-L-L-G-G-G-A-A-K-A-2Naf-K-A-A-NH₂

Fig. 1 ミトコンドリア移行シグナルペプチド誘導体のアミノ酸配列

【結果と考察】CD スペクトル測定の結果(Figs. 2 and 3)、MTS Δ C-pA は PBS 中ではランダムコイル構造を形成し、TFE や SDS 含有 PBS 中では MTS-pA と同程度の α -ヘリックス性を形成していることがわかった。MTS Δ N-pA も MTS Δ C-pA と同じ傾向にあった。また CCK-8 をもちいた細胞毒性評価の結果、HeLa 細胞(がん細胞)に対して両ペプチドともに MTS-pA に近い毒性を示した。COS7 細胞(正常細胞)に対しては MTS Δ C-pA では MTS-pA に近い低毒性を示したが、一方で MTS Δ N-pA では MTS-pA や MTS Δ C-pA と比較してより高い毒性を示した。

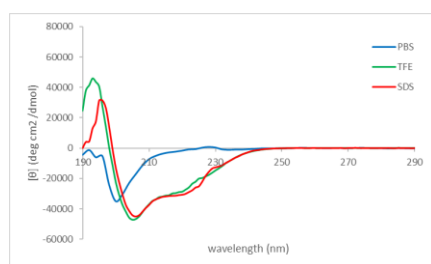


Fig. 2 MTS Δ C-pA の CD スペクトル

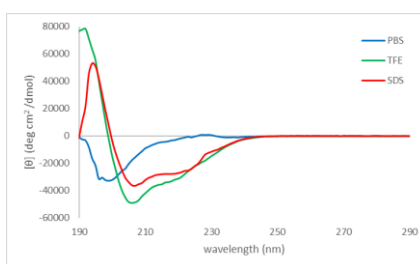


Fig. 3 MTS Δ N-pA の CD スペクトル

電気化学発光による脂質二分子膜に対する抗菌ペプチド作用の評価

○高橋一吹¹・平本薫^{2,3}・阿部博弥^{1,2}・平野愛弓³・伊野浩介¹・珠玖仁¹(¹東北大学大学院工学研究科、²東北大学学際科学フロンティア研究所、³東北大学電気通信研究所)

Assessment of antimicrobial peptide action on lipid bilayers by electrochemiluminescence (Graduate School of Engineering, Tohoku University¹, Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University², Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University) **TAKAHASHI, Ibuki¹; ABE, Hiroya^{1,2}; HIRAMOTO, Kaoru³; INO, Kosuke¹; HIRANO-IWATA, Ayumi²; SHIKU, Hitoshi¹;**

支持脂質二分子膜(Supported lipid bilayer:SLB)とは基板の上に構成するリン脂質を主とする二分子膜であり、細胞膜の基本構造を再現しているが、精度の高い測定法が不足していた。SLBの従来法に代わる新たな測定法として、電気化学発光(Electrochemiluminescence:ECL)が挙げられる。ECLとは、電極上で酸化された発光試薬が共反応物と反応することで励起する際に発光する現象であり、光源が不要で低バックグラウンド、高感度な分析が可能である(Fig. 1)。本研究ではECLを用いたSLBの観察及びSLBを破壊する作用を持つペプチドである抗菌ペプチドを加えた際の観察によるECL計測の実証を試みた。

酸化インジウムスズ(ITO)電極上に、中心に直径6mmの孔のあるPolydimethylsiloxane (PDMS) ウェルを貼り、孔の中心に直径1mmのPDMSピラーを立て、SLBのない領域を作った。0.2 mg/mL 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) または DOPC/コレステロール (モル比 7:3) PBS 溶液をウェルに加え、40℃のホットプレート上で1時間インキュベートし、SLBを展開したのちPDMSピラーを外し、PBS1 mLでピペッティングし余分な脂質を洗い流した。その後、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ /トリプロピルアミン(TPA)溶液をウェル中に加え、顕微鏡にセットし作用極:ITO 電極、参照極:Ag/AgCl 電極、対極:Pt 電極で電位を走査しながらECL画像を撮影した。また、同じ領域で抗菌ペプチドのメリチンを添加し、時間経過に伴うECL画像の変化を見た。

Fig. 2 に結果を示す。DOPC 及び DOPC/コレステロールのどちらでもSLBの存在によりECL強度が低下したことからSLBが電極反応を阻害したと考えられる。また、Fig. 3 よりメリチン添加前後で、ECL画像に乱れが見られた。ECL強度プロットを行ったところ、メリチン添加後に狭い範囲でのECL強度の変化を確認した。このことからメリチンによりSLBが破壊された可能性が示唆されたが、実証にはさらなる検討が必要である。

ECLを用いた高精度なSLBの観察に成功したことから、SLBに対する精度の高い測定方法を提案できた。抗菌ペプチドのSLBへの作用については、メリチンのECLへの影響等の検討が求められる。

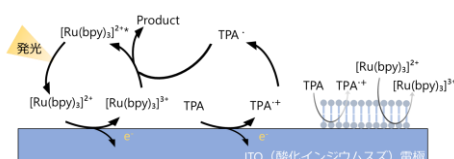


Fig. 1 ECLの発光原理

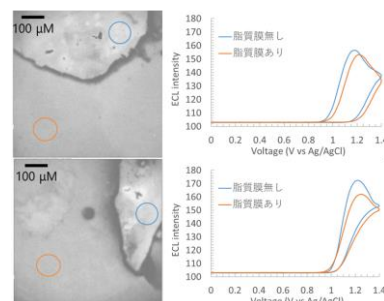


Fig. 2 DOPC (上)、DOPC/コレステロール (下) のECL画像及び強度

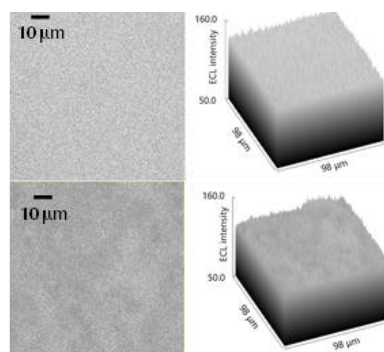


Fig. 3 メリチン添加前(上)と15分後(下)のDOPCのECL画像およびECL強度プロット

赤血球ゴーストを反応場とした光水素生成反応の制御

○坂本大芽・越山友美（立命館大院生命科）

Photocatalytic hydrogen evolution system using red blood cell ghosts for catalytic reactors (Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University) SAKAMOTO, Taiga; KOSHIYAMA, Tomomi

水素ガスは、持続可能なエネルギー社会の実現において重要なエネルギー源であり、これまでに可視光を利用した様々な水素生成システムが報告されている。水素生成反応には光増感剤、電子伝達体、犠牲還元剤、触媒といった複数の化合物が関与しており、それらを集積させることで反応効率を向上させることが期待できる。現在、化合物を集積する場としてリポソームやタンパク質などの生体分子を用いた系が報告されており、均一系に比べて反応効率が向上することが知られている。そこで我々は、化合物を集積する新たな場として脂質膜と蛋白質から成る赤血球ゴースト (RBCG) に着目した。RBCG は、赤血球の内容物を低張溶液を用いた溶血操作によって取り除いたものであり、直径が約 5 μm で高い表面積を有する空間である。さらに、RBCG 膜は、内部表面のみに蛋白質から成る網目状細胞骨格が存在する非対称膜構造を有し、細胞骨格を足場として内部表面に様々な化合物を担持することができる。本研究では、RBCG を反応場として、光増感剤としてルテニウム錯体 ($[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$)、電子伝達体としてメチルビオローゲン (MV)、触媒として白金ナノ粒子 (Pt NPs)、犠牲還元剤として EDTA を用いた光水素生成反応の制御を目指した (Fig. 1)。

本実験では、白金ナノ粒子を細胞骨格に担持した RBCG (Pt@RBCG)、または、白金ナノ粒子とルテニウム錯体を細胞骨格に担持した RBCG (Pt•Ru@RBCG) を作製した。Pt@RBCG は、RBCG 溶液に白金イオンを添加した後、 NaBH_4 で還元することで作製した。また、Pt@RBCG とルテニウムマレイミド錯体を反応させることで、細胞骨格のシステイン残基へルテニウム錯体を化学修飾した Pt•Ru@RBCG を得た。光水素生成反応の評価では、(i) Pt@RBCG / $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / MV / EDTA 混合水溶液、(ii) Pt•Ru@RBCG / MV / EDTA 混合水溶液に白色 LED 光を照射し、発生した水素をガスクロマトグラフで定量した。(i) と (ii) とともに水素発生が確認され、Pt@RBCG、Pt•Ru@RBCG のいずれも光水素生成反応を触媒することがわかった。加えて、比較対照の RBCG 非存在下で作成した Pt NPs を用いた系に比べて、両サンプルともに水素発生量は多く、特に Pt@RBCG は 3 倍程度高かった。これは、Pt@RBCG、Pt•Ru@RBCG では、触媒である Pt NPs が RBCG 膜上に分散し、Pt NPs 同士の凝集が抑制されたためだと考えられる。さらに、(i) と (ii) とともに反応溶液が青色に変化し (Fig. 2)、MV が還元された MV ラジカルカチオンが生成していることが確認された。しかしながら、(i) の溶液がより濃い青色を呈し、(i) と (ii) では MV ラジカルカチオンの生成量が異なった (Fig. 2)。現在、MV ラジカルカチオンの生成量と水素発生量の経時変化測定などにより、詳細な反応過程の解析を進めている。

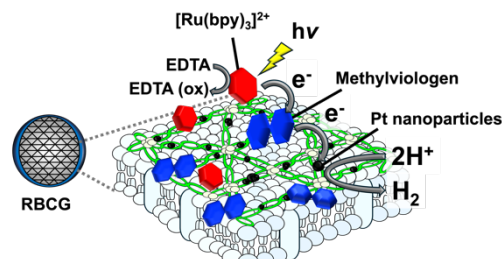


Fig. 1. Photocatalytic hydrogen evolution reaction using Pt@RBCG or Pt•Ru@RBCG.

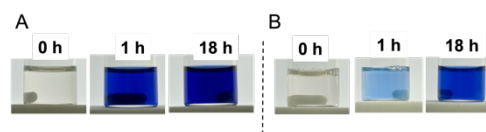


Fig. 2. Images of (A) Pt@RBCG / $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / MV / EDTA suspension and (B) Pt•Ru@RBCG / MV / EDTA suspension under light irradiation at 0, 1, and 18 h.

アジド修飾ヒアルロン酸を用いたダブルクリック架橋による細胞の凝集と遊走の促進

○佐藤史也¹・Hernandez Paniagua Liliana Alejandra¹・竹前等²・稲垣奈都子³・伊藤大知³・寺正行¹ (1東農工大院工、2東農工大院農、3東大院工)

Enhancing Cell Aggregation and Migration via Double-Click Crosslinking with Azide-Modified Hyaluronic Acid (Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology¹, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology², Graduate School of Engineering, The University of Tokyo³) SATO, Fumiya¹; Hernandez Paniagua Liliana Alejandra¹; TAKEMAE, Hitoshi²; INAGAKI, Natsuko³; ITO, Taichi³; TERA, Masayuki¹

【目的】細胞凝集体は平面培養細胞と比較し、生体組織に近い機能を示すため、創薬研究における生体モデルや再生医療への応用が期待されている。細胞凝集体を構築する手法として、細胞接着タンパク質を利用する手法があるが、当該タンパク質の発現が低い細胞種への適用が難しいという課題がある^[1]。一方で、細胞表面でのクリックケミストリーは細胞接着タンパク質の発現に依存せず、細胞凝集を誘導する有望な戦略である。当研究室では、代謝的にアジド基を導入した細胞表面に対して、カチオン性側鎖を有する二価の水溶性歪みアルキン (WS-CODY) を作用させることで細胞凝集体の作製に成功した^[2]。しかしこの手法では細胞の接触面積を大きくするために30分間の遠心処理を必要とし、さらに培養48時間で凝集構造が分散するという課題があった。そこで本研究ではアジド標識細胞表面を高い柔軟性と生体適合性を併せ持つアジド修飾ヒアルロン酸 (HA-N₃) と生体不活性な sulfobetaine WS-CODY (1) でクリック架橋することにより、効率的かつ強固な細胞凝集体の構築を目指した (Fig. 1)。

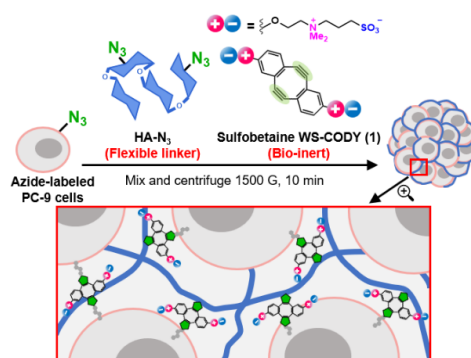


Fig.1 Schematic representation of cell aggregate formation.

【結果】まず、代謝的にアジド基を導入した難接着性肺がん由来細胞の PC-9 細胞株をモデル細胞とし、HA-N₃ (アジド修飾率: 18%) と 1 のハイドロゲル形成における最適濃度を検討した。その結果、0.0025 w/v% の HA-N₃ と 100 μM の 1 が最適濃度であり、10 分間の遠心処理により細胞凝集体の作製に成功した。細胞凝集体の培養を行ったところ、培養5日後まで形態を維持した。これは、HA-N₃ の柔軟かつ多数のアジド基により細胞表面のクリック反応効率が向上したことによると考えられる。培養96時間以降の細胞凝集体は凝集体の周辺部で分散を示した (Fig. 2a)。そこで凝集構造の分散に影響を与える遺伝子の変動を調べるため、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、「細胞遊走」や「細胞接着」に関連する遺伝子である *HYAL1*、*ICAM-1*、*CEACAM5* および *RHOB* の mRNA 量の変動が確認された (Fig. 2b)。この結果より、HA-N₃ を介した細胞凝集は細胞—マトリックス相互作用に関連する細胞応答を誘導することが示唆された^[3]。

[1] M. C. Decarli *et al.*, *Biofabrication*, **13**, 032002 (2021); [2] K. Kitagawa *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, **34**, 638–644 (2023); [3] F. Sato *et al.*, *manuscript submitted*.

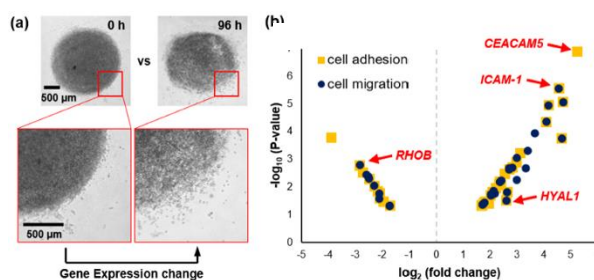


Fig.2 (a) Representative images depicting cell migration from the aggregates at 96 hours. (b) Volcano plots of genes related to "cell migration" and "cell adhesion" of cell aggregates after 96h of culture, using cell aggregates immediately after preparation as control.

ナノ構造脂質キャリアを用いた ^{19}F MRI 造影剤の開発研究

○杉浦志帆¹・山本智也^{1,2}・菊地和也^{1,2} (¹阪大院工、²阪大免フロ)

Development of nanostructured lipid carrier for ^{19}F NMR probe (Graduate School of Engineering, Osaka Univ.¹, Immunology Frontier Research Center, Osaka University²) SUGIURA, Shiho¹; TOMOYA, Yamamoto^{1,2}; KAZUYA, Kikuchi^{1,2}

磁気共鳴画像法 (Magnetic Resonance Imaging; MRI) は、高い空間分解能で非侵襲的に生体深部のイメージングが可能な手法である。 ^1H 核を観測核とした ^1H MRI は 40 年以上にわたり臨床応用され、観測対象を強調するための造影剤も開発されてきた。しかし、造影剤を用いた場合でも、造影剤由来のシグナルが生体内の水分子や脂質由来の ^1H 核からのバックグラウンドシグナルと重なってしまうため、コントラストの向上には限界がある。高コントラストの画像を得る有用な手法として、 ^{19}F 核を観測核種とした ^{19}F MRI が挙げられる。 ^{19}F 核は内因性のバックグラウンドシグナルが小さく、 ^1H MRI 画像と ^{19}F MRI 画像を重ね合わせることで、高い空間分解能で ^{19}F MRI 造影剤の局在を観測することが可能である。これまでに、 ^{19}F 化溶媒を内包したナノ粒子の表面をシリカで被覆した ^{19}F MRI 造影剤が開発されてきた¹⁾が、生体内への残存や肝臓への集積といった問題点があった。

我々は、生体適合性が高くシリカナノ粒子とは異なる生体内分布を示す ^{19}F MRI 造影剤の開発を目指し、ナノ構造脂質キャリア (Nanostructured Lipid Carrier; NLC)²⁾ に着目した。NLC は固体の脂質と液体の脂質からなるコアを有するナノ粒子であり、生体毒性の低さやステルス性、サイズ安定性からドラッグデリバリーシステムに用いられている。本研究では、NLC を ^{19}F MRI 造影剤として応用するために、液体脂質の代わりに ^{19}F 化低分子を導入した NLC の開発を行った。 ^{19}F 化低分子としてパーフルオロカーボンである perfluoro-15-crown-5-ether を用いて NLC を調製した場合、 ^{19}F NMR シグナルが観測されず、NLC への内包率が低かったと考えられる。また benzotrifluoride を用いた NLC では ^{19}F NMR シグナルが観測されたが、液体脂質を用いた NLC よりもサイズ安定性が低かった。 ^{19}F 化低分子の構造が液体脂質に近いほど NLC のサイズ安定性が向上すると考え、液体脂質に ^{19}F 核を導入した ^{19}F 化液体脂質を合成した。本発表では、 ^{19}F 化低分子および ^{19}F 化液体脂質を用いて調製した ^{19}F 内包 NLC のサイズ安定性や ^{19}F NMR 測定結果について報告する予定である。

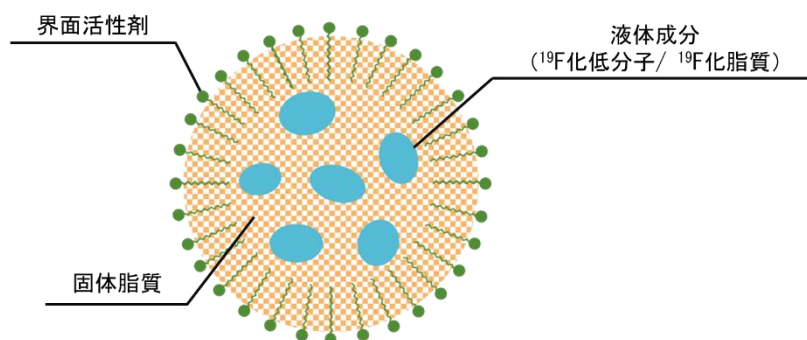


図. ナノ構造脂質キャリア型 ^{19}F MRI 造影剤のデザイン

- 1) H. Matsushita, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 1008.
- 2) S. Khan, *et al.*, *Adv. Pharm. Bull.* **2023**, 13, 446.

酸素非依存的に DNA を光分解する光増感剤の応用に関する研究

○正角優吏¹・山崎智彦²・川上亘作²・百武篤也¹ (¹筑波大院理工情報生命、²物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター)

Research on the application of photosensitizers that photocleave DNA in an oxygen-independent way
(Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba¹, Research Center for Macromolecules and Biomaterials, NIMS²) SHOKAKU, Yuri¹; YAMAZAKI, Tomohiko²; KAWAKAMI, Kohsaku²; MOMOTAKE, Atsuya¹

光線力学療法 (PDT) はがん細胞に対する高い集積性を持つ光増感剤 (PS) を患者に投与し、その後がん組織に特定の波長のレーザー光を照射して光増感剤を励起することにより、活性酸素種 (ROS) の生成を促し、結果として細胞死を引き起こすがん治療法である。PDT は非侵襲的であり、かつがん組織を選択的に標的とすることができる利点を持っている。しかし、がん組織の内部はしばしば低酸素環境であるため、従来の PS を用いた場合、効率的な ROS の生成が難しいという課題がある。この問題に対処するため、我々は低酸素環境下でも DNA を光分解する天然色素 Pheophorbide *a* (Phed *a*)¹⁾ (Fig. 1) に着目した。本研究では Phed *a* に化学修飾を施し、がん組織への効率的な運搬を目指している。脂質二重膜の小胞であるリポソームに PS を封入することで光増感剤の凝集を防ぎ、がん組織への取り込みを容易にし、効果的に患部へ運搬することが可能となる²⁾。特に Phed *a* に直鎖アルキル基を導入したことで、リポソーム中での安定性と腫瘍への取り込みが向上し、低酸素下での光による細胞毒性を示すことが期待される。

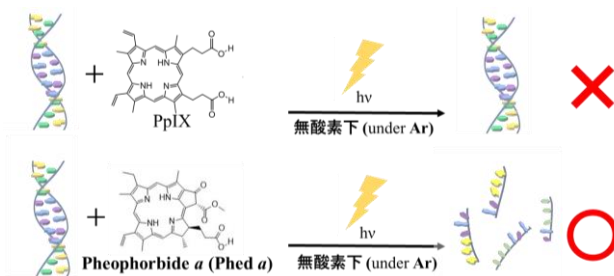


Figure 1. Schematic representation of oxygen-dependent photodegradation of DNA by ProtoporphyrinIX (top) and oxygen-independent photodegradation of DNA by Pheophorbide *a* (bottom).

光増感剤 Phed *a* と参照物質 Protoporphyrin IX (PpIX) それぞれの末端を Cetyl alcohol でエステル化した化合物 1, 2 を合成した (Fig. 2A)。また各光増感剤のエステル化による吸収・蛍光スペクトル (Fig. 2B-C) に大きな変化は見られないことを確認した。各光増感剤のリポソームへの取り込み、細胞内への運搬および低酸素環境下における光細胞毒性の評価が可能となった。

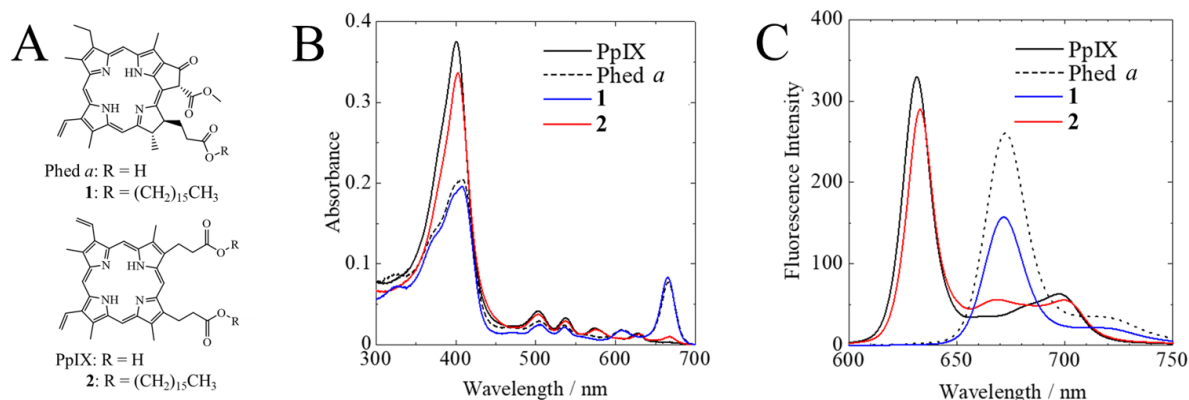


Figure 2. Chemical structures of Phed *a*, 1, PpIX, and 2 (A). Absorption (B) and fluorescence spectra (C) of 2 μ M Phed *a* (dotted line), 1 (blue), PpIX (black), and 2 (red) in MeOH at 25 $^{\circ}$ C.

1) M. Komiyama, M. Kobayashi, M. Harada, *Chem. Lett.* **1991**, 20(12), 2123-2126.

2) Cheng S. Jin; Gang Zheng, *Lasers Surg. Med.* **2011**, 43(7), 734-748.

抗原タンパク質修飾ペプチド集合体の表面電荷制御とワクチンアジュバントへの応用

○難波江友紀¹・樋口亜也斗¹・若林里衣¹・神谷典穂^{1,2}・後藤雅宏^{1,2} (¹九大院工、²未来化学創造センター)

Surface charge-controlled antigenic protein-modified peptide assemblies and their application to vaccine adjuvants (Graduate School of Engineering, Kyushu University¹, Center for Future Chemistry, Kyushu University²) NABAE, Yuki¹; HIGUCHI, Ayato¹; WAKABAYASHI, Rie¹; KAMIYA, Norihiro^{1,2}; GOTO, Masahiro^{1,2}

ワクチンアジュバントは抗原と同時に投与することでワクチン効果を増強する物質である。近年、両親媒性ペプチド (PA) の自己組織化により形成された集合体がアジュバント効果を示すことが報告され¹、免疫応答の向上や制御が可能な新規アジュバント材料の開発につながると注目されている。

そこで我々は、酵素反応による PA 集合体へのタンパク質修飾技術²を用いた新規抗原タンパク質-アジュバント一体型ワクチンの創製を目指した (Fig.1)。酵素として、特定の Gln (Q) 残基と Lys (K) 残基側鎖間を架橋する酵素、微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) を用い、MTG 認識配列を導入した PA, Pyrene-L₃QG とモデル抗原タンパク質 EGFP を用いることで PA 集合体への抗原の共有結合的な修飾を行った。さらに、荷電性アミノ酸を導入した PA との共集合化によって表面電荷を改変することで、免疫応答の制御を目指した。

本発表では、荷電性アミノ酸を持つ PA, Pyrene-L₃QGX (X=E, K) を設計し、Pyrene-L₃QG と 1:1 のモル比で混合し、共集合体を形成させた。各集合体に対して EGFP を MTG 反応によって修飾したところ、いずれの集合体にも高効率に修飾できることが確認された。また、マウス由来樹状細胞 DC2.4 に EGFP 修飾 QG 集合体、QG + QGX 共集合体を作用させた結果、EGFP を単独で作用させた場合と比べて有意に高い抗原取り込みを示した。さらに、*in vivo* での EGFP 特異的な抗体産生量評価を評価したところ、EGFP 修飾 PA 集合体は、EGFP 単独を投与した場合と比べて高い抗体産生を示した。特に、正電荷アミノ酸を有する共集合体を用いた場合に、迅速な抗体産生を示すことを確認した。以上の結果から、EGFP 修飾 PA 集合体の表面電荷の違いによって抗原の滞留性や安定性、細胞への取り込み効率に変化し、免疫応答の向上と制御に繋がる可能性が示唆された。

[1] J. H. Collier *et al.*, *PNAS*, **107**, 622-627 (2010) [2] R. Wakabayashi *et al.*, *Chem. Commun.*, **55**, 640-643 (2019)

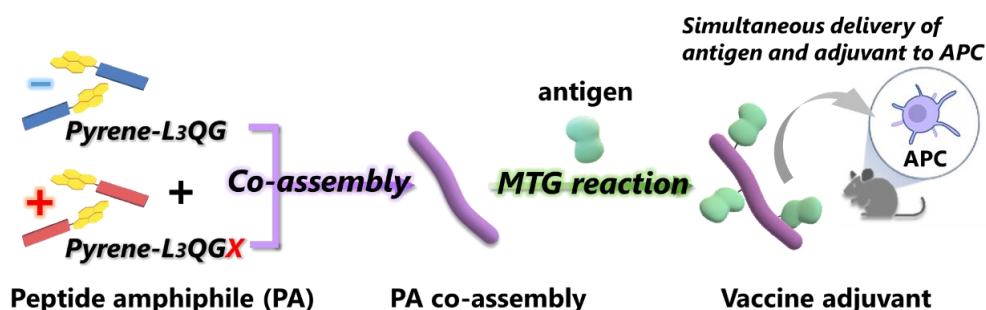


Fig. 1 Conceptual diagram of this study.

【謝辞】 本研究は、JSPS 科研費 21H05227, 22H01884 の助成を受けたものです。

ジピコリルアミン亜鉛錯体導入ポリチオフェンによる化学・物理刺激を利用した細胞質内 mRNA 送達

○松本彬¹・佐々木由比^{1,2,3}・土屋和彦¹・南豪¹ (¹東大生研・²東大先端研・³JST さきがけ)

Intracellular Delivery of mRNA with a Chemical and Physical Stimuli-Responsive Zn(II)-Dipicolylamine-Attached Polythiophene (Institute of Industrial Science, The University of Tokyo¹, Research Center for Advanced Science and Technology², The University of Tokyo, JST PRESTO³) MATSUMOTO Akira¹; SASAKI Yui,^{1,2,3}; TSUCHIYA Kazuhiko¹; MINAMI Tsuyoshi¹

遺伝子治療において有用な mRNA を作用部位である細胞内に送達するためには、ポリカチオンを用いて mRNA 複合体を調製する必要がある。そのポリカチオンの設計においては、複合体が効率的にエンドソームを脱出し細胞質で mRNA を放出する機能が求められる¹⁾。ポリチオフェン誘導体は光励起により活性酸素 (ROS) を生成することが知られており、エンドソームに取り込まれたポリチオフェン誘導体によって生成した ROS がエンドソーム膜を障害することでその脱出を促進すると期待される。一方、ジピコリルアミン亜鉛錯体 (Zn(II)-dpa) はオキソアニオン類に対して結合親和性を示し、その化学構造に応じて配位子交換が生じる。従って、細胞外では Zn(II)-dpa は mRNA と複合化するが、細胞質内では高濃度のリン酸イオンによって mRNA を放出すると予測される。そこで本研究では Zn(II)-dpa を側鎖に導入したポリチオフェン誘導体 (Zn(II)-dpa-PT) を合成し、mRNA との複合体 (mRNA/Zn(II)-dpa-PT) の細胞質内送達能を評価した (Fig. 1)。

Zn(II)-dpa-PT と mRNA の複合化は、Zn(II)-dpa ユニット数と mRNA 中のリン酸基数を考慮して、任意の比率 (Zn/P = 1, 2, 4, 8) で行った。複合体について、動的光散乱及び電気泳動光散乱を用いて流体力学半径とゼータ電位を評価した結果、Zn/P $\geq$ 4 においてカチオン性のサブマイクロ粒子 (例: Zn/P = 8, $d_h = 330 \pm 59$ nm, $\zeta = +65 \pm 1$ mV) を観測した。続いてその mRNA 放出能を評価すべく、mRNA/Zn(II)-dpa-PT をリン酸緩衝液 (35 mM) 中で 1 時間静置した後にゲルシフトアッセイを試みた。その結果、リン酸イオン非存在下では、mRNA の放出は見られなかったのに対し、上記条件静置後はフリー mRNA のバンドが観測され、その放出が示唆された。Zn(II)-dpa 部位に配位した mRNA 中のホスホジエステル部位が、溶液中のリン酸イオンに置換されることにより放出されたと推察される。また、繊維肉腫細胞 (HT-1080) に mRNA/Zn(II)-dpa-PT (Zn/P = 4) を投与し、細胞に光照射 (青色 LED) を行った。共焦点レーザー顕微鏡観察により得られた画像について、エンドソーム・リソソームと mRNA/Zn(II)-dpa-PT の共局在を解析したところ、その割合が光照射により減少することが分かった。これは光励起によるエンドソーム脱出促進を示唆する。さらに、エンドソーム脱出に伴い細胞質内で mRNA が Zn(II)-dpa-PT から放出される様子が観察された。

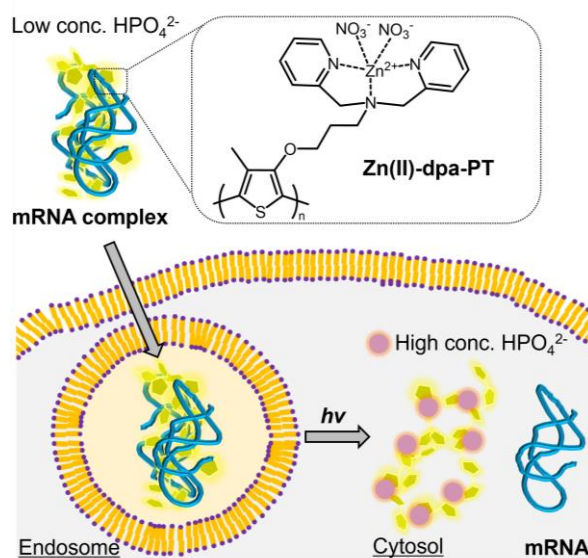


Figure 1. The conceptual scheme of cytosolic mRNA delivery by photochemical internalization and phosphate-triggered release.

1) H. Zhou et al., *Adv. Sci.*, **2023**, *10*, 2303597.

光誘導電荷分離分子搭載ナノディスクによる細胞膜電位の制御

○高木勇杜¹・山田りおん²・作田絵里²・沼田朋大³・村上達也^{1,4}

(¹ 富山県大院工、² 長崎大院工、秋田大院医、京都大物質—細胞統合システム拠点(iCeMS))

Control of Plasma Membrane Potential by Photo-Induced Charge Separation Molecule-Loaded Nanodiscs.

(¹Grad. Sch. of Eng., Toyama Pref. Univ., ²Grad. Sch. of Arts. & Sci. Eng., Nagasaki Univ., ³Grad. Sch. of Med., Akita Univ., ⁴iCeMS, Kyoto Univ.) TAKAGI, Hayato¹; YAMADA, Rion²; SAKUDA, Eri²; NUMATA, Tomohiro³; MURAKAMI, Tatsuya^{1,4}

私たちの眼は、網膜の視細胞が光を受容することで視覚情報を得ている。外部からの光を視細胞が受容すると、近傍の双極細胞へのグルタミン酸の放出が抑制され、双極細胞のイオンチャネルが駆動されることで細胞膜電位(V_m)が増加(脱分極)する。同様の過程が双極細胞と神経節細胞でも生じる。神経節細胞での脱分極は活動電位を発生させ、この活動電位が脳へ視覚情報として伝達される。一方で加齢黄斑変性などの失明性疾患では、視細胞が欠失する。我々は、欠失した視細胞機能を神経節細胞に光応答性小分子を輸送することで代替するという戦略で研究を進めている。これまでに光照射により可逆的に分子内に正負の電荷を生じる ferrocene-porphyrin-fullerene 連結分子(電荷分離(CS)分子)を用いて、培養神経様細胞に脱分極を光誘導できることを報告してきた^{1,2}。しかし、光を照射してから脱分極まで分スケール、再分極に至っては時間スケールと、正常の生体内での反応と比較して極めて遅いことが課題であった。そこで本研究では、CS分子としてスピロピラン化合物(SPD)に注目し、SPDを搭載させた新たなキャリアを作製するとともに、機能評価した。

SPDは、電気的に中性な閉環構造のスピロピラン(SP)体と、双性イオンを含む開環構造のメロシアニン(MC)体をとる。SP体は紫外光照射でMC体に変換され、その後可視光照射でSP体に戻る。この性質により、高分子膜中で光による膜電位制御が可能であることが知られている³。本研究では、脂質膜への安定な挿入を意図してアルキル鎖を導入したSPD (SPD-Br)を合成した。キャリアとして、生体ナノ粒子であるリポタンパク質のアポタンパク質部分に細胞膜透過ペプチド(CPP)を結合させた改変体(aND1)、さらに角膜吸収促進ペプチド(NGR)を結合させた改変体(aND3)を用いた。これらのキャリアをSPD-Brと混合し、一定時間後、ゲルろ過カラムによりフリーのSPD-Brを除去した。吸収スペクトルを測定すると298 nmにSPD-Br由来の吸収が検出され、SPD-BrのNDsへの搭載が示唆された。続いて、神経様細胞PC12株を用い、SPD-Br搭載aND1およびaND3を作用させ、紫外光/可視光照射に伴う膜電位変化をホールセルパッチクランプ法により測定した。この結果、紫外光照射開始直後の脱分極、その後の可視光照射による迅速再分極が観察された。以上より、SPD-Br搭載aND1およびaND3を用いることで脱分極/再分極応答の早期化が可能であることが示唆された。

1. T. Numata, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 134, 14, 6092–6095 (2012)
2. T. Numata, *et al.*, Cell. Physiol. Biochem. 54, 5, 899–916 (2020)
3. S. Kurihara, *et al.*, J. Membr. Sci. 93, 1, 69–78 (1994)

ラマン分光法を用いた *Saccharomyces cerevisiae* における nectriatide 誘導体の局在解析

○三宅良介¹・安藤正浩²・小林啓介³・供田洋³・大城太一³・竹山春子^{1,2,4,5}

(¹早大院・先進理工、²早大ナノ・ライフ創新研、³北里大院・薬、⁴産総研・早大 CBBDOIL、⁵早大・先進生命動態研)

Analysis of localization of nectriatide derivative, a potentiator of amphotericin B, in *Saccharomyces cerevisiae* using Raman microspectroscopy (Graduate school of Advanced Science and Engineering, Waseda University¹, Research organization for Nano and Life Innovation, Waseda University², Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University³, Waseda University Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory⁴, Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University⁵) ¹MIYAKE, Ryosuke; ²ANDO, Masahiro; ³KOBAYASHI, Keisuke; ³TOMODA, Hiroshi; ³OHSHIRO, Taichi; ^{1,2,4,5}TAKEYAMA, Haruko

Nectriatide は、抗真菌剤 amphotericin B (AmB) の抗真菌活性を増強する特異な活性を示す環状テトラペプチドである¹⁾。Nectriatide の全合成研究の過程で、nectriatide を凌ぐ AmB 増強活性を示す nectriatide 誘導体 (**Linear-Nec**) を見出した²⁾。そこで、nectriatide 類の標的分子を明らかにするために種々のケミカルプローブを合成し、脂質分子との親和性を評価した。その結果、エルゴステロールと親和性を示すことを明らかにした。

そこで、本研究では低侵襲・非破壊で物質の分子構造やその局在を明らかにすることができるラマン分光法を用いて、nectriatide 類が生細胞中に局在するエルゴステロールと親和性を示しているか明らかにすることを目的とする。

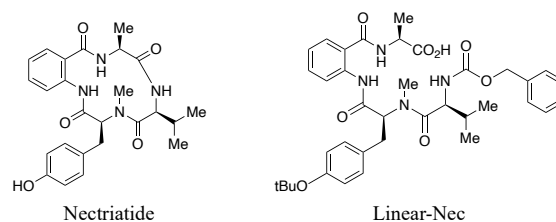


Fig. 1 Nectriatide および linear-Nec の構造

Saccharomyces cerevisiae を 30℃ で 16 時間培養後、**linear-Nec** (64 μg/mL) と 30℃ で 1 時間反応させ、ラマンスペクトル測定を行った。スペクトル解析手法として、多変量スペクトル解析手法 (MCR-ALS)³⁾ を用い、エルゴステロールや **linear-Nec** に加えて脂質やタンパク質などの主要な生体成分に由来するスペクトル成分およびその成分の強度分布情報を抽出することで、これらの分子の局在を可視化した。その結果、**linear-Nec** はエルゴステロールの局在が観察された細胞膜や細胞質に豊富に局在しており、生細胞中で **linear-Nec** とエルゴステロールが共局在していた。そこで、同様の方法で AmB (0.25 μg/mL) 併用時のエルゴステロール、**linear-Nec** および AmB の局在を可視化した結果、エルゴステロール、**linear-Nec** および AmB が共局在していた。また、AmB 単独および **linear-Nec** 併用時における *S. cerevisiae* に作用した AmB 量を 1 細胞レベルで定量した結果、**linear-Nec** を併用することで約 5 倍量の AmB が *S. cerevisiae* に作用することを明らかにした。

AmB は細胞膜上でエルゴステロールとイオンチャネルを形成し、抗真菌活性を示すと言われていることから、nectriatide 類は AmB やエルゴステロールと共局在することで、AmB とエルゴステロールが形成するイオンチャネルの安定化もしくは形成を促進し、AmB の抗真菌活性を増強していることが示唆された。

1) Fukuda T. *et al.*, *J. Nat. Prod.* **82**, 2673-2681 (2019), 2) Nagai K. *et al.*, *J. Antibiot.* **77**, 214-220 (2024)

3) Ando M. Hamaguchi HO. *J. Biomed. Opt.* **19**, 011016 (2013)

簡便かつ迅速な Zn 置換クロロフィル誘導体の調製方法の開発

○高嶋 泰帆¹、岡本 千奈²、百武 篤也²、仲里 正孝³、山本 泰彦²、小林 正美¹

¹筑波大・物質工学域、²筑波大・化学域、³クロロフィル研究所

Development of a simple and rapid preparation of Zn-chlorophyll derivatives (Department of Materials Science, University of Tsukuba ¹, Department of Chemistry, University of Tsukuba ², Chlorophyll Research Institute, Higashiyachiyo, Japan ²) TAKASHIMA, Yasuho¹; OKAMOTO, China²; MOMOTAKE, Atsuya²; NAKASATO, Masataka³; YAMAMOTO, Yasuhiko²; KOBAYASHI, Masami¹

ここから本文を書き始めてください。このテンプレートに直接上書きできます。

講演予稿は口頭・ポスター発表ともに **A4 用紙 1 ページ**です。

天然のクロロフィル(Chl) *a* (Fig. 1A)の中心金属はマグネシウム(Mg)だが、強酸性下に生息する光合成細菌の中には、亜鉛(Zn)を中心金属に持つ亜鉛バクテリオクロロフィル *a* (Zn-BChl *a*)で光合成を実現しているものがあることを以前本研究室で初めて発見した。Zn 型クロロフィルの起源は未だ不明だが、太古の地球において DNA や RNA などの核酸が Zn 挿入の触媒として作用した可能性がある。

本研究では、核酸がキレターゼの代わりに Zn 挿入したのではないかと傍証を得るため、Chl *a* の長鎖フィトールと中心金属 Mg が外れた水溶性のフェオフォーバイド(Phde) *a* (Fig. 1B)に Zn が挿入された Zn-Chlide *a* (Fig. 1C)を調製し、核酸との相互作用を調べることを最終目的とする。今回は、Zn-Chlide *a* の簡便かつ迅速な調製方法を確立したので紹介する。

クロロホルムに Phde *a* を溶解し、そこに塩化亜鉛エタノール溶液を微量加えて、室温で攪拌するだけで、僅か 3 分で Zn が挿入されることを見出した。反応溶液に直接水を加えて水洗するだけで、未反応の塩化亜鉛を除去できる極めて簡便な Zn-Chlide *a* 調製方法を確立した。さらに Chl *a* 誘導体の 1 つパイロフェオフォーバイド(pyroPhde) *a* でも検討したところ、Phde *a* と同様にクロロホルムと塩化亜鉛の組み合わせが適していることを明らかにした。

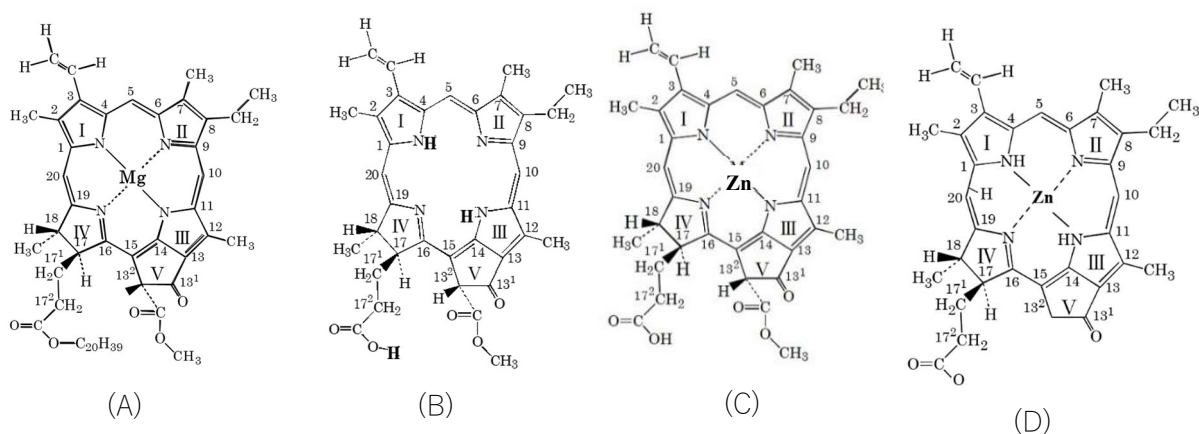


Figure 1 Chl *a* (A)、Phde *a* (B)、Zn-Chlide *a* (C)および Zn-pyroChlide *a* (D)の構造式

血小板が結合した血中循環がん細胞の 3D イメージング解析

○吉岡 岳士¹・後藤 紗也香¹・桶川 隆嗣²・出来 真弓²・田中 剛¹・吉野 知子¹ (¹農工大院工、²杏林大医)

Three-dimensional imaging analysis of platelet-adherent circulating tumor cells

(Graduate School of Technology, Tokyo Univ. of agriculture and technology¹, Kyorin Univ.²) YOSHIOKA, Takeshi¹; GOTO, Sayaka¹; OKEGAWA, Takatsugu²; DEKI, Mayumi²; TANAKA, Tsuyoshi¹; YOSHINO, Tomoko¹.

【目的】

がん転移はがん関連死の 90%以上を占め、その主な要因として血行性転移に関与する血中循環腫瘍細胞 (CTC: Circulating Tumor Cell) が挙げられる。当研究室において、胃がん、膵臓がん、尿路上皮がん患者由来 CTC のトランスクリプトーム解析を実施した結果、CTC から血小板由来遺伝子の発現が確認され、CTC に血小板が結合していることが示唆されている。がん細胞と血小板の結合は転移促進に関与する可能性が示唆されているが、実際に血小板が結合した CTC の詳細な解析は進んでいない。そこで本研究では、当研究室で開発した Microcavity Array (MCA)法を用いて CTC を回収し、3D イメージング解析により、血小板と結合した CTC の細胞形態の詳細解析を試みた。

【方法および結果】

ヒト尿路上皮がん細胞株である RT112、T24 に、血小板活性化剤である ADP と血漿成分であるフィブリノーゲンを添加し、ヒト全血より分離した血小板と混合した。血小板が結合したがん細胞を MCA で捕捉し、共焦点レーザー顕微鏡により各細胞のスライス画像を取得した。取得した画像から画像解析ソフトを用いて 3D イメージの構築を行った。また、3D 画像から各種パラメータを抽出し、解析を行った結果、非浸潤性のがん細胞である RT112 と比較して、より悪性度の高い浸潤性の T24 細胞の血小板結合率が有意に高かった。次に、悪性度との関連が示唆されている核と細胞質の体積比 (N/C 比)を算出した結果、いずれの細胞についても血小板が結合した細胞の方が N/C 比が高かった (Fig. 1)。よって、血小板が結合している細胞において染色体異常が起きている可能性が示唆された。

続いて尿路上皮がん患者由来末梢血 1 ml から MCA を用いて CTC を回収し、MCA 上の 3D イメージングを行った。その結果、血中には CTC だけでなく、近年白血球との融合細胞と報告されている血中循環ハイブリッド細胞 (Circulating Hybrid Cell: CHC)も確認された。また、血小板が結合した CTC (Fig. 2)および CHC も多数確認され、患者血液中において、血中循環がん細胞の細胞形態が多様であることが示された。現在、CTC および CHC について、血小板の結合と病態との関連についても解析を進めている。以上より、血小板が結合した血中循環がん細胞の 3D イメージングにより細胞形態の詳細解析が可能であった。

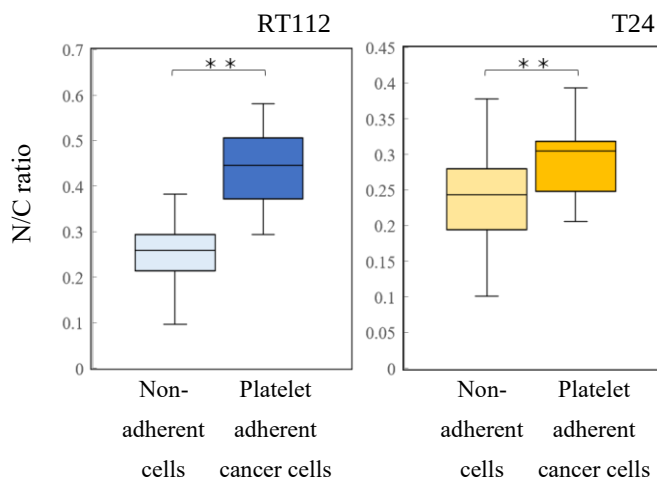


Fig. 1 Relationship between platelet adhesion to cancer cells and nucleus-cytoplasmic ratio.

(**): $p < 0.01$

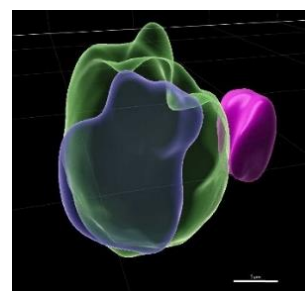


Fig. 2 3D image of platelet adhered CTC. Blue: nucleus, Green: cytoplasm, Red: platelet. Scale bar: 10 μ m

光増感色素固定化基板の作製と間葉系幹細胞への影響評価

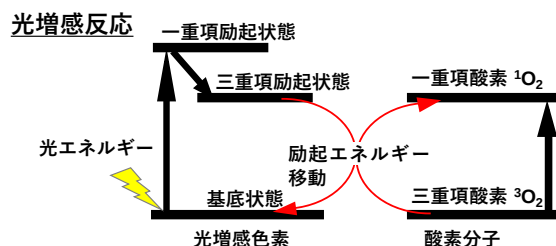
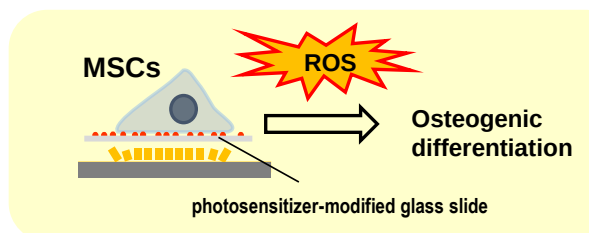
○原正之・森英樹（大阪公立大学大学院理学研究科生物化学専攻）

Preparation of the photosensitizer dye-immobilized glass plate: effect on the cultured mesenchymal stem cell (Department of Biological Chemistry, Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University) HARA, Masayuki⁸; MORI, Hideki

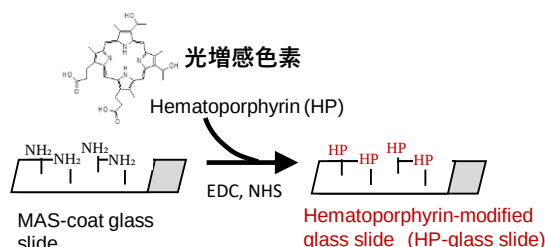
高レベルの活性酸素種（ROS）はDNA損傷を介して細胞周期を停止させ、細胞傷害性を示すが、低レベルのROSは、幹細胞などの分化において情報伝達シグナルとして作用する例も報告されている。低レベルのROSが細胞に与える影響を調べるため、EDC/NHSを用いて光増感色素の一種 hematoporphyrin（HP）を表面に化学的に固定化したガラス基板（HP基板）を作製して、可視光照射時の活性酸素種（ROS）が発生を確認した。このHP基板表面から生じるROSの微弱な酸化ストレス刺激によって、分化誘導因子の添加なしに間葉系幹細胞に骨分化が誘導されるか否かを検討した。

ラット骨髄由来の間葉系幹細胞を、HP基板を底面としたチャンバー内に播種し、10%ウシ胎仔血清と抗生物質を含むMEM培地で培養した。一晚培養した後、電子制御によりLED光を照射した。細胞膜過酸化脂質検出薬 Liperfluo を使用した蛍光顕微鏡観察により、細胞膜過酸化脂質の増加が確認された。また、細胞内ROS検出試薬 CM-H₂DCFDA を使用した蛍光顕微鏡観察によって、光照射1時間後から細胞内のROSの発生が確認された。2週間の培養後、未修飾の基板上で培養した細胞では骨分化は確認されなかったが、HP基板上で培養した細胞は光照射の有無に関わらず骨芽細胞への分化、骨基質の形成を示す nodule 様の構造が観察され、Alizarin Red S による染色が確認できた。

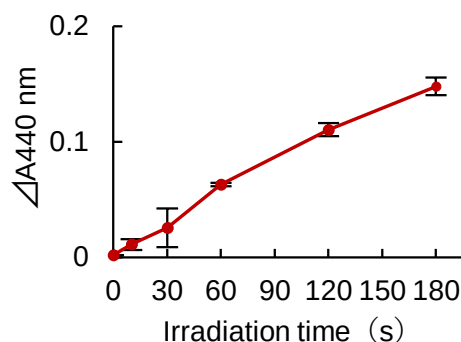
さらに、細胞膜透過性で過酸化水素消去能を持つ PEG-catalase を事前に培地に添加することによって、骨芽細胞への分化は抑制された。以上の実験結果などから、HP基板による間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化は、光増感色素から発生したROS刺激に応答して、2次的に細胞内で発生した過酸化水素シグナルを介して生じたと考えた。



光増感色素固定化基板の作製



パラジメチルニトロソアニリン(RNO)法による光増感反応で発生したROSの測定



交流電場による細菌の Swarming 運動促進効果

○小林将陽¹・鮎澤優希¹・山口瑞稀¹・小山純弘²・石川陽一²・奈須野恵理¹・加藤紀弘¹ (宇都宮大院¹・エイブル株式会社²)

Enhancement effect of alternating current electric fields on bacterial swarming motility (Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya Univ.¹, ABLE Corporation²) KOBAYASHI Yukiya¹; AYUSAWA, Yuki¹; YAMAGUCHI Mizuki¹; KOYAMA Sumihiro²; ISHIKAWA Yoichi²; NASUNO Eri¹; KATO Norihiro¹

バイオサーファクタント (BS) を分泌する鞭毛保有細菌が形成するコロニーでは、周囲の BS 濃度が増大し接着表面間の表面張力が低下することで、半固体表面上における細菌細胞の移動速度が向上する Swarming 運動が観測される。細菌が形成するバイオフィームは、医療デバイスを介した感染や、水と接触する工場設備の性能低下など多くの問題を誘引する。BS 生産菌ではバイオフィームの形成過程における Swarming 運動の関与が知られ、バイオフィームの形成阻害、除去技術の確立に Swarming 運動の制御が有効である。本研究では低濃度寒天プレート上での細菌運動性を、BS である Serrawettin W1 を生産する *Serratia marcescens* AS-1 株で試験した。AS-1 株は細胞間情報伝達機構である Quorum Sensing (QS) の活性化により抗菌物質 prodigiosin を生産するため、長時間の培養後にコロニーは赤色を呈しコロニー分布の可視化が容易であり、Serrawettin W1 の誘導に QS 機構は関与していない。AS-1 株は Serrawettin W1 合成遺伝子 *swrW* を有しており、Serrawettin W1 の生産は菌体表面のエタノール抽出試料の TLC 解析で確認した。

半固体表面 (低濃度 0.5 %寒天ゲルプレート) の中央部に植菌した菌体に交流電場 (Alternating current electric field: ACEF) を印加することでコロニーを振動させれば、鞭毛運動を駆動力とする細菌運動性が向上すると考え、電場印加条件の最適化を検討した。電場印加には周波数可変の交流電場印加装置 (CD-01, ABLE) を用い、2 枚のステンレス電極間に、中央部に植菌した LB 寒天ゲルプレートを静置し 25 °C で所定時間インキュベートした (Fig. 1)。菌体の生育に影響しない低電場強度 0.83 V_{pp} (peak-to-peak voltage) に設定し、各周波数における菌体の広がり画像解析し四方向の直径の平均 (d) を Swarming 活性の指標とした。

BS 生産株である *S. marcescens* AS-1 では交流電場による菌体の広がりが顕著に促進したのに対し (Fig. 2)、BS 非生産株である *Escherichia coli* DH5α、鞭毛を保有しない *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 株では、交流電場の印加の影響は観測されない。これらの結果は、交流電場による細菌細胞の運動性の促進は Swarming 現象が起こる条件でのみ誘導されることを示唆する。交流電場の周波数が細菌細胞の固有振動数近傍となったときに、負電荷を有する細菌の振動は増大すると推察される。

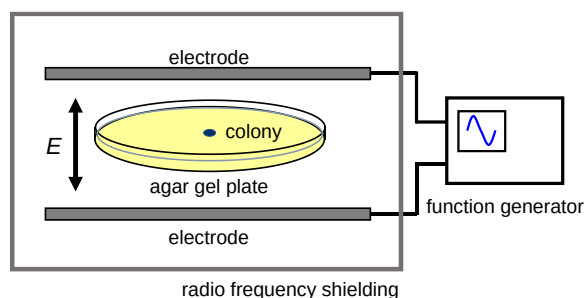


Fig. 1 Apparatus for applying ACEF to enhance cell motility on agar gel plate.

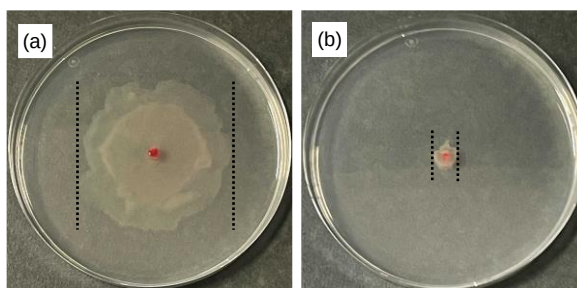


Fig. 2. Cell motility of serrawettin W1-producing *S. marcescens* on agar gel plate (a) with or (b) without ACEF [12 MHz, 9 h, 25 °C].

電子移動反応を駆使した可視光応答ケージド基の開発

○家田直弥^{1,2}、中村旭良²、舘実優²、富田なつみ²、堀田祐志³、大久保敬⁴、川口充康²、中川秀彦² (1 北大院薬、2 名市大院薬、3 名市大院医、4 阪大 OTRI)

Development of electron-transfer-triggered visible-light-responsive photolabile protecting groups (Grad. Sch. Pharm. Sci., Hokkaido Univ.¹, Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya City Univ.², Grad. Sch. Med. Sci., Nagoya City Univ.³, OTRI, Osaka Univ.⁴) IEDA, Naoya¹; NAKAMURA, Akira²; TACHI, Miyu²; TOMITA, Natsumi²; HOTTA, Yuji³; OHKUBO, Kei⁴; KAWAGUCHI, Mitsuyasu²; NAKAGAWA, Hidehiko².

ケージド化合物とは、光解除性保護基 (PPG: photolabile protecting group) で活性を保護された化合物であり、光に応答して脱保護され、特定の活性を示すため、シグナル分子の作用機構解明の研究や、薬剤分子の活性を制御できる新たな治療法としても期待されている。汎用されている PPG は、その制御光が 300–400 nm の紫外～青紫光であり、細胞への傷害性や組織透過性の低さにより、その応用が限られていた。500 nm 以上の可視光で制御可能なものも開発されているものの、色素が高い光増感能を示すため、ROS が発生することが懸念されている。

演者らはこれまでに、光誘起電子移動反応 (PeT: photoinduced electron transfer) をトリガーとし、可視光 (～660 nm) によって一酸化窒素 (NO) を放出する化合物群を開発し、これを用いて動物個体で血流を光制御することに成功している。そこで、PeT の反応性を NO 以外の生理活性分子の活性制御に応用できないかと考えた。そこで、ピコリニウムカチオンは一電子還元を受けて結合開裂を起こすことが知られており、この一電子還元反応を PeT で代替できないかと考えた (図 1a)。500 nm の光を吸収する色素である BODIPY をアンテナ部位として用い、ピコリニウムカチオンを結合させた化合物を合成し、その光反応性を評価したところ、500 nm の光に応答して想定した結合開裂反応が起きることが示された。さらに、光反応中間体を低温 ESR で解析したところ、有機ラジカルが生じていることが示され、PeT を介したメカニズムで結合開裂が起きていることが示唆された。さらに、この青色光 PPG で血管弛緩剤である GSK2181236A を保護し、ラットの動脈切片に添加したところ、青色光照射に応答して血管弛緩を起こすことが示された。このことから、ピコリニウムカチオンを用いた設計により、生理活性分子の活性を光制御できる PPG を開発できることが示された。

可視光域の光は波長が長くなるほど、細胞傷害性が低下し、組織透過性が向上するため、制御光の長波長化ができないか、さらに光反応効率の改善ができないか検討した。アンテナ部位を 600 nm の光を吸収する Si-フルオレセインに変更したところ、600 nm の光に応答して、想定した開裂反応が起きることが示され、さらにピコリニウムカチオンのメチレン部位にビニル基を置換したところ、反応効率が 60 倍向上することが示された。

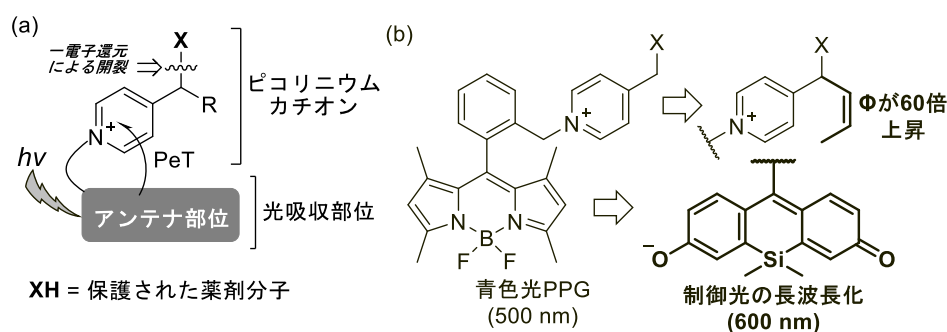


図 1 PeT 駆動型 PPG の設計 (a) と開発した PPG の構造 (b)

副作用の低減と腫瘍特異的な高活性化を目指した

二重特異性抗体の開発

加藤有紀¹・○金津 尊¹・熊谷 泉¹・浅野竜太郎¹ (¹農工大院工)

Development of bispecific antibodies to reduce side effects and induce tumor-specific activation (Graduate School of Engineering, Tokyo Univ. Agric. Technol.¹) KATO, Yuki¹; KANAZU, Takeru¹; KUMAGAI, Izumi¹; ASANO, Ryutaro¹

当研究室では、がん細胞上の上皮成長因子受容体 (EGFR) と T 細胞上の CD3 を標的とし、両者を架橋することで強力な抗腫瘍効果を発揮する二重特異性抗体 Ex3 を開発してきた (Fig. 1A)。しかし、正常組織での作用が懸念され、また腫瘍中の T 細胞を活性化させることが望まれている。そこで本研究では、共刺激分子である 4-1BB に結合し、T 細胞に活性化シグナルを伝達する一本鎖抗体 (scFv, Fig. 1B) の Ex3 への融合を目指した。Ex3 の T 細胞結合部位が scFv によりマスクされるように融合することで、正常組織では T 細胞への結合が阻害される。一方で、融合部位にがん細胞で発現が亢進しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の認識配列を挿入しておくことで、腫瘍近傍では遊離した scFv がもたらす T 細胞の活性化と Ex3 の抗腫瘍効果の回復を期待した (Fig. 1C)。

MMP の認識配列を介して Ex3 の T 細胞結合部位近傍の N 末端に抗 4-1BB scFv を融合した scFv-Ex3 の発現ベクターを構築後、動物細胞による組換え生産を行った。培地上清から精製後、MMP 活性を有するコラゲナーゼで認識配列を切断し、その前後の結合能とがん細胞傷害活性を評価した。結果、scFv の融合により T 細胞に対する結合能と、がん細胞傷害活性が著しく低下した一方で、MMP 認識配列切断後はいずれも回復した。また切断後は、遊離した抗 4-1BB scFv が共刺激を誘導し T 細胞を活性化することで Ex3 単独よりも高いがん細胞傷害活性を示した (Fig. 2)。さらに、培養上清を用いて、がん細胞から分泌された MMP による scFv-Ex3 の認識配列の切断を評価したところ、コラゲナーゼと同様に、切断による Ex3 単独よりも高い細胞傷害活性がみられた。以上より、scFv-Ex3 は、Ex3 の機能が scFv の融合により阻害された一方で、認識配列切断後に機能が回復したことから、正常組織に対する副作用の低減、及び遊離した抗 4-1BB scFv による T 細胞の活性化により Ex3 よりも高い抗腫瘍効果をもたらすことが期待できる。

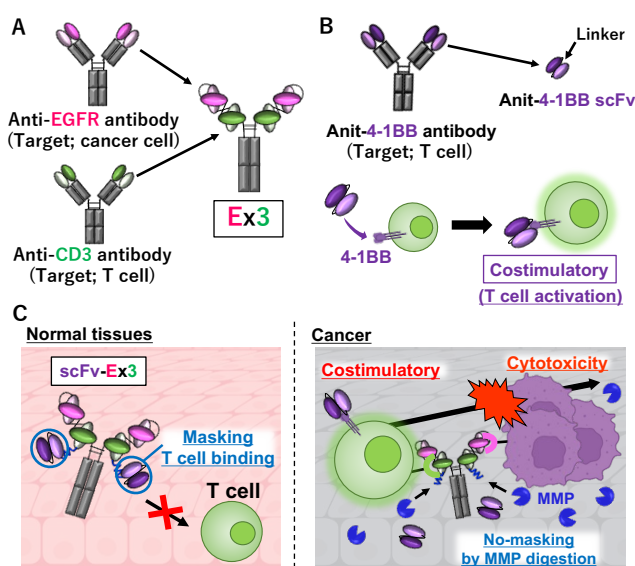


Figure 1. Schema of Ex3 (A) and scFv (B), and mode of action of scFv-Ex3 (C)

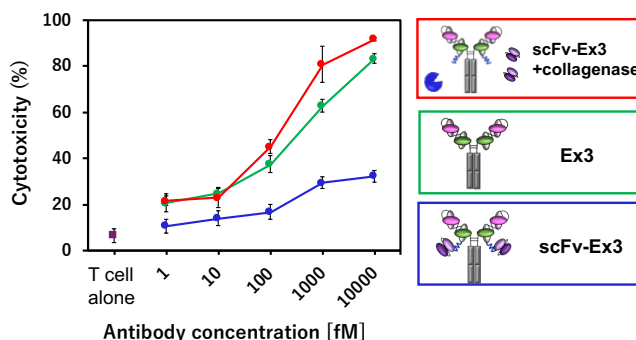


Figure 2. Cytotoxicity test

イソプレノイドを配位結合で捕捉するホスト分子の開発

○菅原孝太郎¹・中村貴志² (¹筑波大院数理物質、²筑波大数理物質)

Development of a Host Molecule that Captures Isoprenoids by Coordination Bonds (Degree Programs in Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba¹, Institute of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba²)
SUGAWARA, Kohtaro¹; NAKAMURA, Takashi²

イソプレノイドとは、イソプレン (C₅) を構成要素とする天然化合物群であり、自然界において普遍的に存在する。これまでに数多くのイソプレノイドが報告されており、その生合成前駆体は C=C 二重結合を持つ直鎖の炭化水素またはその二リン酸である¹⁾。生体内では、酵素がこの直鎖前駆体の立体配座を三次元的に固定化することにより、位置・立体選択的な反応が進行して様々なイソプレノイドが合成されている。非酵素的手法でイソプレノイドを選択的に合成することを目指すうえで、ゲスト分子を精密にフォールディングできるホスト分子の開発が重要となると考えられる。今日では、ゲスト分子の認識様式として水素結合や疎水効果などを利用した人工ホスト分子が報告されている。

当研究グループでは、内孔に配位サイトを集積した環状多核錯体が多点での配位結合でジカルボン酸やジアミンを認識することを報告している^{2,3)}。本研究では、イソプレノイドを金属との配位結合で捕捉するホスト分子を開発した。配位結合の利用によって、水素結合や疎水効果を用いるよりも結合エネルギーや選択性に優れたホスト分子となり、さらに金属を活用した選択的基質変換が実現できると期待した。ONO 型 3 座キレート sap (salicylidene-aminophenol) の環状 4 量体配位子 H₈C₄ を合成し、続いて C=C 二重結合と配位結合を形成できるパラジウムとの錯形成により、環状 4 核パラジウム錯体 [C₄Pd₄L₄] (L: 交換可能な配位子 (MeOH など)) を合成した (Figure 1)。

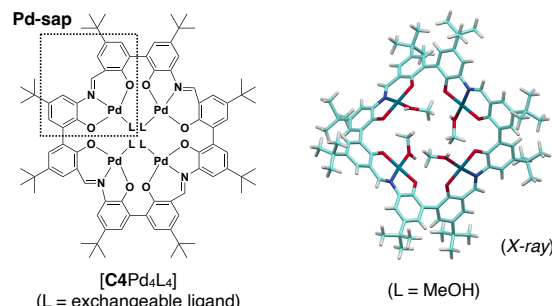


Figure 1. The structure of [C₄Pd₄L₄].

[C₄Pd₄L₄] の分子認識能を探索するために、ゲスト分子としてステロイド生合成の前駆体であり、6 つの C=C 二重結合を有するトリテルペン (C₃₀) のスクアレンを [C₄Pd₄L₄] と反応させた。その結果、1 分子のスクアレンが 1 つの環状 4 核パラジウム錯体に配位結合で捕捉されたホストゲスト錯体 [C₄Pd₄(squalene)] が生成した。また、ROESY 解析によって [C₄Pd₄(squalene)] の構造を同定し、スクアレンの 1,3,4,6 番目の二重結合が Pd に配位していることが判明した (Figure 2)。

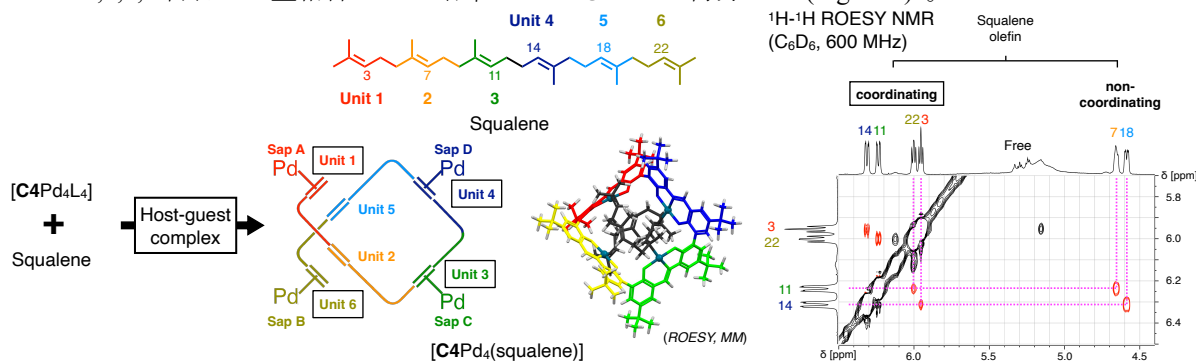


Figure 2. The structure of host-guest complex [C₄Pd₄(squalene)] and its ¹H-¹H ROESY spectrum (C₆D₆, 600MHz).

- 1) D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2017**, *17*, 11570.
- 2) T. Nakamura, Y. Kaneko, E. Nishibori, T. Nabeshima, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 129.
- 3) T. Nakamura, S. Watanabe, *Inorg. Chem.* **2023**, *62*, 12886.

ミトコンドリアにおけるタンパク質合成を検出する

蛍光プローブの開発

○炭谷峻、佐々木栄太、大野久史、花岡健二郎（慶應大院薬）

Development of fluorescence probes for sensing protein synthesis in mitochondria (Grad. Sch. of Pharm. Sci., Keio Univ.) SUMITANI, Shun; SASAKI, Eita; OHNO, Hisashi; HANAOKA, Kenjiro

【背景・目的】ミトコンドリアは電子伝達系と酸化的リン酸化を通じて ATP を産生し、細胞のエネルギー代謝において重要な役割を担っており、その機能障害は筋疾患や神経変性疾患などの原因となる。ミトコンドリアは独自の DNA を有しており、それに由来する 13 種類のタンパク質の合成を検出することは、ミトコンドリアの機能を理解する上で重要であり、疾患の発症メカニズムを解明することにつながると考えられる。そこで本研究では、アミノアシル tRNA の 3' 末端に類似した構造をもつ puromycin を用いて、ミトコンドリア内のタンパク質合成を選択的に検出する蛍光プローブを開発することを目的とした。

【方法】ミトコンドリア局在性蛍光色素である Rhodamine B 及び 2'-Me Rhodamine B と、リボソーム内で翻訳途中のペプチド鎖の C 末端に共有結合する puromycin とを、親水・疎水性及び長さの異なる様々なリンカーを介して結合させた 6 種類の蛍光プローブをデザイン・合成した (図 1)。次に、生細胞におけるミトコンドリア局在性を評価するために、本プローブを HeLa 細胞へと添加し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて蛍光イメージングを行った。さらに、翻訳途中のペプチド鎖に対する本プローブの結合能を評価するために、再構成型無細胞翻訳系に本プローブを適用し、SDS-PAGE を用いて伸長ペプチド鎖を解析した。

【結果・考察】蛍光イメージングの結果より、Rhodamine B を用いたプローブはいずれも生細胞においてミトコンドリアに局在せず、リソソームと推測される顆粒状のオルガネラに局在した。一方、2'-Me Rhodamine B を用いたプローブは期待通りにミトコンドリアに局在した。Rhodamine B の 2'位カルボキシ基をメチル基に替えた 2'-Me Rhodamine B を用いたことで、プローブの疎水性と正電荷が増大し、ミトコンドリアへ局在するようになったと推測された。一方、再構成型無細胞翻訳系を用いた実験では、翻訳途中の様々な長さのペプチド鎖に結合したプローブ由来の蛍光が全てのプローブにおいて観察され、翻訳途中のペプチド鎖に対する本プローブの結合能は、リンカーの親水・疎水性や長さに依らないことが示された。

【結論・今後の予定】2'-Me Rhodamine B と Puromycin を組み合わせたことで、ミトコンドリアへ局在する Puromycin 結合型蛍光プローブの開発に成功した。また、再構成型無細胞翻訳系において、本プローブがリボソーム内で翻訳途中のペプチド鎖に結合可能であることを示した。今後は、本プローブを正常細胞及びミトコンドリア病モデル細胞へと適用し、生細胞のミトコンドリア内で合成されるタンパク質の検出と解析を行う予定である。

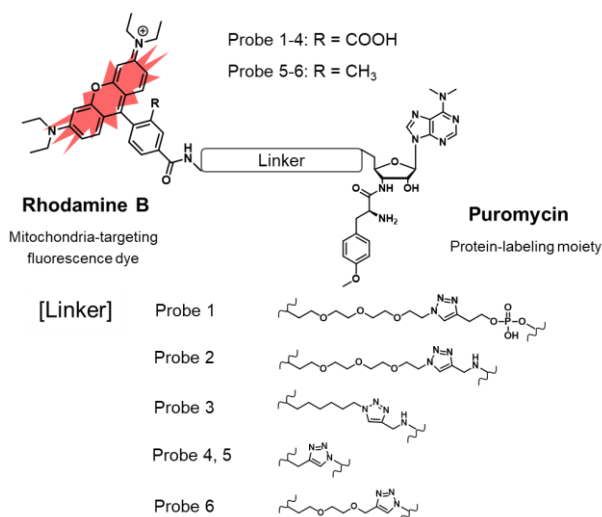


図 1：蛍光プローブの分子設計

リン酸レセプターの分子認識における水素結合および水分子の役割

○高柳駿斗¹・中畑雅樹²・石井良樹³・渡辺豪^{3,4}・中村貴志⁵ (¹筑波大院数理物質、²阪大院理、³北里大未来工、⁴KISTEC、⁵筑波大数理物質)

Roles of Hydrogen Bonds and Water Molecules in the Molecular Recognition by a Phosphate Receptor

(Degree Programs in Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba¹, Graduate School of Science, Osaka University², School of Frontier Engineering, Kitasato University³, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology⁴, Institute of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba⁵) TAKAYANAGI, Hayato¹; NAKAHATA, Masaki²; ISHII, Yoshiki³; WATANABE, Go^{3,4}; NAKAMURA, Takashi⁵

リン酸化された分子の認識は多くの生体内での化学反応に関わっており、リン酸選択的な人工ホスト分子の創出とその認識機構の解明は重要な課題である。*N*-メチルピリジニウム基をもつアミドシクロデキストリン誘導体 **1**⁷⁺は、水中においてフェニルリン酸などのアニオンを認識する¹⁾。本研究では、NOESY や ITC 測定、MD 計算などの手法を用いて、アニオンの性質に応じた認識様式の違いを明らかにした²⁾。

まず、疎水基の異なる2つのリン酸イオンとして、フェニルリン酸およびアダマンチルリン酸を用いて、**1**(OTf)₇ との 1:1 複合体の NOESY 解析と水分子存在下での MD 計算を行った。その結果、フェニルリン酸はリン酸エステル R-O-P の酸素原子がアミド N-H による水素結合に関与することで **1**⁷⁺ の内孔のやや上方 (ピリジニウムアミド基に近い側) に位置することがわかった。一方で、アダマンチルリン酸は末端の -PO₃²⁻ がアミドと水素結合を形成してやや下方 (CD のメトキシ基に近い側) に位置していた (Figure 1)。また、温度可変 ITC 測定を行った結果、フェニルリン酸では配置エントロピーが包接において重要な役割を果たし、一方でアダマンチルリン酸では疎水効果が包接における主たる駆動力となっていることがわかった。

アニオン認識能を種々のアニオンを用いて検討したところ、リン酸と疎水基の両方をもつアニオンが大きな結合定数を示した。一方、リン酸と疎水基の両方または片方が欠けたアニオンは、結合定数が小さいか包接されなかった (Figure 2)。以上より、**1**⁷⁺ のアニオン認識の選択性は、シクロデキストリン内孔の疎水効果と、アミド N-H プロトンによる水素結合の両方の寄与によって説明できることがわかった。

1) T. Nakamura, H. Takayanagi, M. Nakahata, G. Watanabe, *The 17th Symposium on Biorelevant Chemistry*, 10B-03, 2023.

2) T. Nakamura, H. Takayanagi, M. Nakahata, T. Okubayashi, H. Baba, Y. Ishii, G. Watanabe, D. Tanabe, T. Nabeshima, *submitted*.

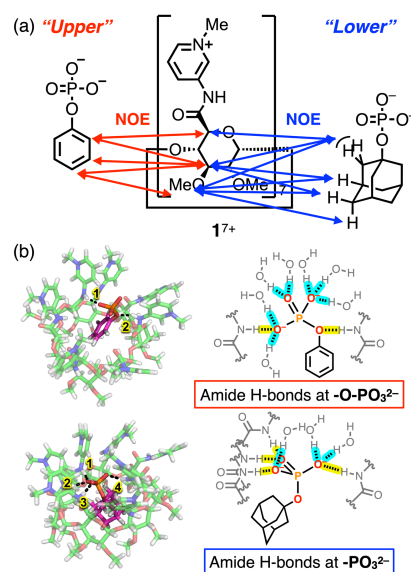


Figure 1. (a) NOE correlations between **1**⁷⁺ and phosphates. (b) Hydrogen bonding in a snapshot of MD simulation.

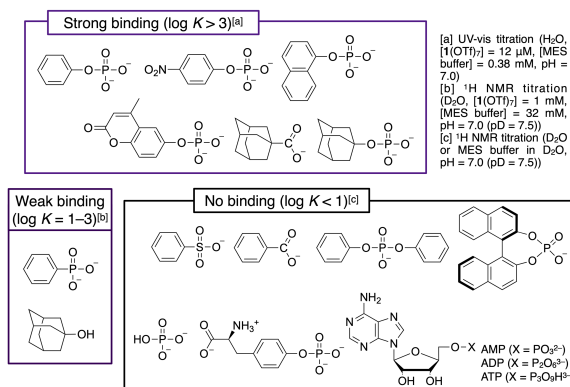


Figure 2. Structures of anions and categorization in terms of binding constant K [M⁻¹] with **1**(OTf)₇.

金属連結ペプチド鎖による編み込みシートの力学物性調査

○保母竜太¹・吉沢道人¹・澤田知久^{1,2} (¹東工大化生研、²JST さきがけ)

Physical property analysis of knitted metal-peptide nanosheets (Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech¹, JST PRESTO²) HOBŌ, Ryuta¹; YOSHIZAWA, Michito¹; SAWADA, Tomohisa^{1,2}

布や竹籠に代表されるように、編み込み・織り込みはマクロスケールにおいて柔軟な材料からしなやかで強靱な構造を形成する重要な手法である。ナノスケールにおいても、分子の編み込み・織り込み構造の構築と力学物性の解明が期待されているが、未だその報告例は限られる¹。当研究室では、ペプチドと金属イオンを用いて、様々な高次な絡まり構造をもつトポロジー分子や細孔性結晶を構築してきた²。本研究では、その合成法を用いて二次元層状編み込み構造を構築し、編み込み型の違いによる力学物性の変化について原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて調査した。

まず、配列異性体である二種類のトリペプチド PPA および APP 配列からなる配位子 **1PPA** および **1APP** を合成した (図 1a)。そのアルコール溶液と銀イオン水溶液をゆっくりと混合させることで、単結晶 **2PPA** と **2APP** を得た (図 1b)。X 線構造解析により、両者は銀イオンとトリペプチド配位子からなる一次元配位ポリマー鎖が編み込まれた層状構造であり、異なる編み込み層状構造を持つことを明らかにした (図 1c)。続いて、単層の剥離条件の検討と AFM 観察を行った。**2PPA** はメタノール中で 150 W の超音波を 20 分間照射することでナノシートに剥離された。また、**2APP** は水中で 100 W の超音波を 20 分間照射することで剥離された。得られたナノシートの分散液をマイカ基板にキャストし、風乾後 AFM 測定を行うと、**2PPA**、**2APP** のナノシートがそれぞれ観察された (図 1d)。**2PPA** および **2APP** のナノシートは高さ約 1.5 nm および約 2.0 nm であり、それぞれ編み込みシート 1 層分と 2 層分に相当した。各ナノシートのヤング率を測定したところ、**2PPA** と **2APP** のナノシートはそれぞれ約 720 MPa および約 260 MPa であった。以上、本研究では金属連結ペプチド鎖によって二次元編み込み構造を構築し、編み込み型の違いによってシートの力学物性が変化することを明らかにした。

[1] O. M. Yaghi, *et al.*, *Science* **2016**, 351, 365. [2] T. Sawada, *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2021**, 94, 2342.

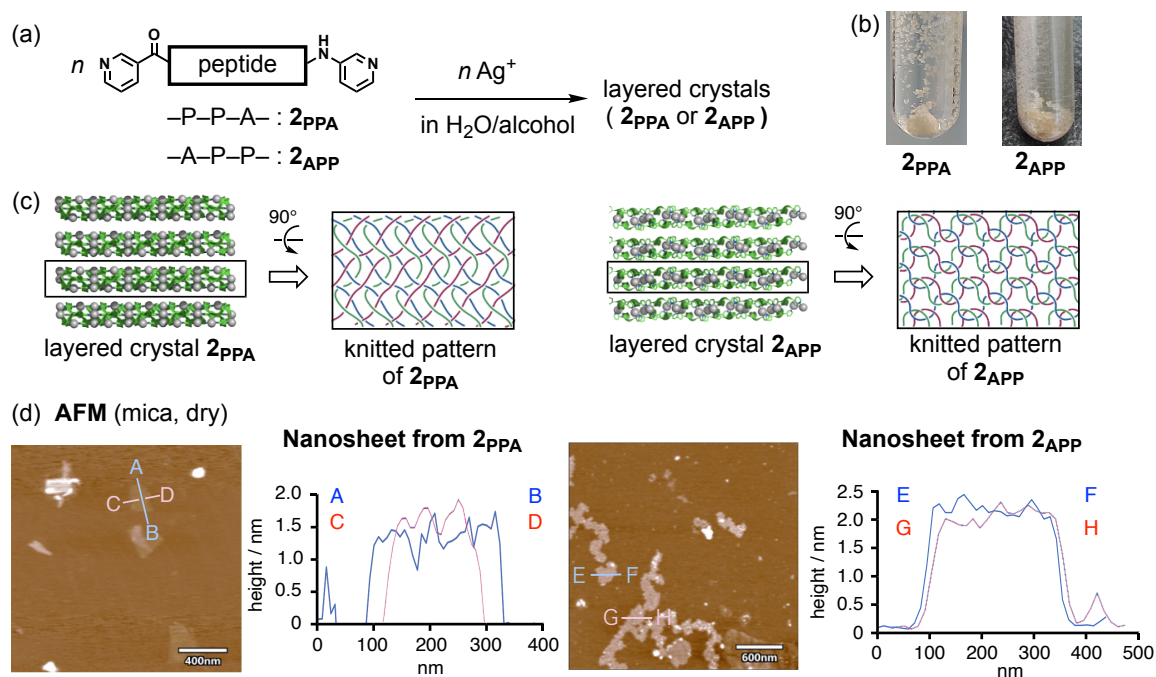


Figure 1. (a) Complexation, (b) crystal photographs, (c) crystal structures and (d) AFM data of **2PPA** and **2APP**.

がん幹細胞を特異的に可視化するデュアル応答性近赤外 turn-on 型 蛍光プローブの開発

○三木康輝¹・三木康嗣¹・麻植雅裕¹・鈴木叶瑛¹・Mu Huiying¹・湯川博²・大江浩一¹ (¹京大院工、²名大未来社会)

Dual-Responsive Near-Infrared Turn-on Fluorescent Probe for Cancer Stem Cell-Specific Visualization
(Graduate School of Engineering, Kyoto Univ.¹, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya Univ.²)

MIKI Koki¹・MIKI Koji¹・OE Masahiro¹・SUZUKI Kanae¹・MU Huiying¹・YUKAWA Hiroshi²・OHE Kouichi¹

がん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSCs) はがん組織中に存在する一部の未分化細胞群であり、がんの開始、進行、転移、および再発に密接に関連している^[1]。アルデヒド脱水素酵素 1A1 (Aldehyde Dehydrogenase 1A1: ALDH1A1) は、がん組織の CSCs と正常組織の体性幹細胞 (Normal Somatic Stem Cells: NSCs) の両方に発現している細胞内バイオマーカーの一つである^[2]。ALDH1A1 の活性を可視化するためのいくつかの turn-on 型蛍光プローブが開発されているが、CSCs と NSCs を識別することは困難である^[3]。本研究では、ヘミシアニン色素を ALDH1A1 および β -ガラクトシダーゼ応答性基質で修飾したデュアル応答性蛍光プローブ **CHO_βgal** を開発した^[4]。**CHO_βgal** の酵素に対するデュアル応答性は、蛍光強度の時間依存的変化を測定することによって確認した (Figure 1a)。ALDH1A1 応答性 turn-on 型蛍光プローブ **C5S-A**^[3b]を使用した *in vitro* 細胞染色では、CSCs と NSCs の両方が可視化された。一方、**CHO_βgal** の場合、がん細胞中の CSCs のみを高コントラストかつ特異的に可視化し、正常細胞中の NSCs と識別できることがわかった (Figure 1b)。切除した組織切片の **CHO_βgal** 染色では、NSCs が存在する場合でも、がん組織中の CSCs のみが明瞭に可視化された (Figure 1c)。

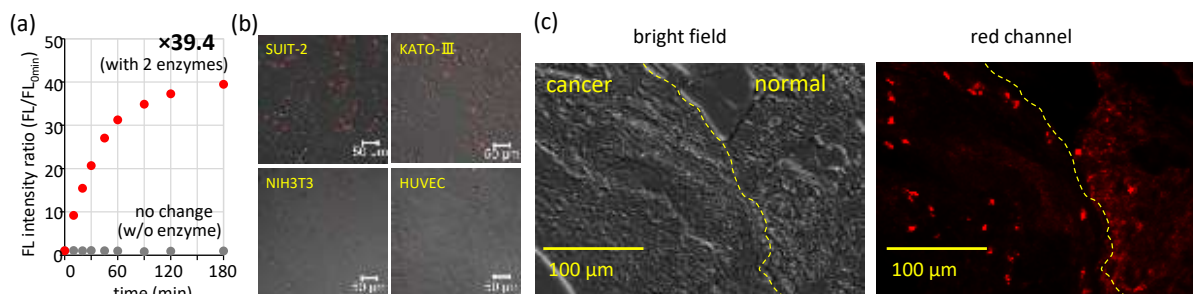


Figure 1. (a) Time-dependent fluorescence intensity change of **CHO_βgal** (20 μM) at 710 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 660$ nm) treated with ALDH1A1 (200 nM) and β -galactosidase (20 U/mL). (b) Representative confocal laser scanning microscopy images of SUIT-2, KATO-III, NIH3T3, and HUVEC cells stained by **CHO_βgal**. (c) Slice of the boundary region between cancer and adipose tissues stained by **CHO_βgal**.

[1] Q. Gao, Y. Zhan, L. Sun, W. Zhu, *Stem Cell Rev. Rep.* **2023**, 19, 2141.

[2] (a) X. Xu, S. Chai, P. Wang, C. Zhang, Y. Yang, Y. Yang, K. Wang, *Cancer Lett.* **2015**, 369, 50. (b) H. Tomita, K. Tanaka, T. Tanaka, A. Hara, *Oncotarget* **2016**, 7, 11018.

[3] (a) J. Han, J. S. Kim, J. H. Kim, E. Jung, K. Min, P. Jangili, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49, 7856. (b) M. Oe, K. Miki, Y. Ueda, Y. Mori, A. Okamoto, Y. Funakoshi, H. Minami, K. Ohe, *ACS Sens.* **2021**, 6, 3320.

[4] K. Miki, M. Oe, K. Suzuki, K. Miki, H. Mu, Y. Kato, M. Iwatake, H. Yukawa, Y. Baba, Y. Ueda, Y. Mori, K. Ohe, *J. Mater. Chem. B* **2024**, in press. <https://doi.org/10.1039/D4TB00897A>.

meso-vinyl-BODIPY を用いるチオール類識別蛍光プローブの開発

○山元紗代子・Huiying Mu・三木康嗣・大江浩一（京大院工）

Fluorogenic probes based on meso-vinyl-BODIPY for discrimination of different thiols (Graduate School of Engineering, Kyoto University) YAMAMOTO, Sayoko; MU, Huiying; MIKI, Koji; OHE, Kouichi

蛍光イメージングは、細胞の構造や生物学的プロセスを観察するために利用される技術であり、時間分解能が高く、生体への負の影響が少ないメリットがある。Dipyrromethene boron difluoride (BODIPY) は高い蛍光量子収率と生体内環境において優れた安定性を示す蛍光色素の一種であり、蛍光プローブとして広く活用されている。生体内にはアニオン部位をもつチオール分子がいくつか存在しており、それらは多くの代謝反応や化学反応に関わっていることが知られている。我々は BODIPY 骨格を基に、生体内に存在する様々なチオールと反応することで蛍光を発する meso-vinyl-BODIPY (VB) の開発に成功している (Figure 1a) ¹。しかしながら、特定のチオールに対する選択性がなく、反応性を調整できないという課題が残されている。そこで、本研究では VB の側鎖に電子供与/求引基を導入することで、ビニル基の反応性を調整した (Figure 1b)。さらに、側鎖末端に生体内チオールがもつアニオン部位と静電相互作用するカチオン部位を組み込むことで生体内の異なるチオールに選択的に応答する turn-on 型蛍光プローブを合成した。本発表では、合成したプローブ分子の光物性と細胞イメージングの詳細に関して説明する。

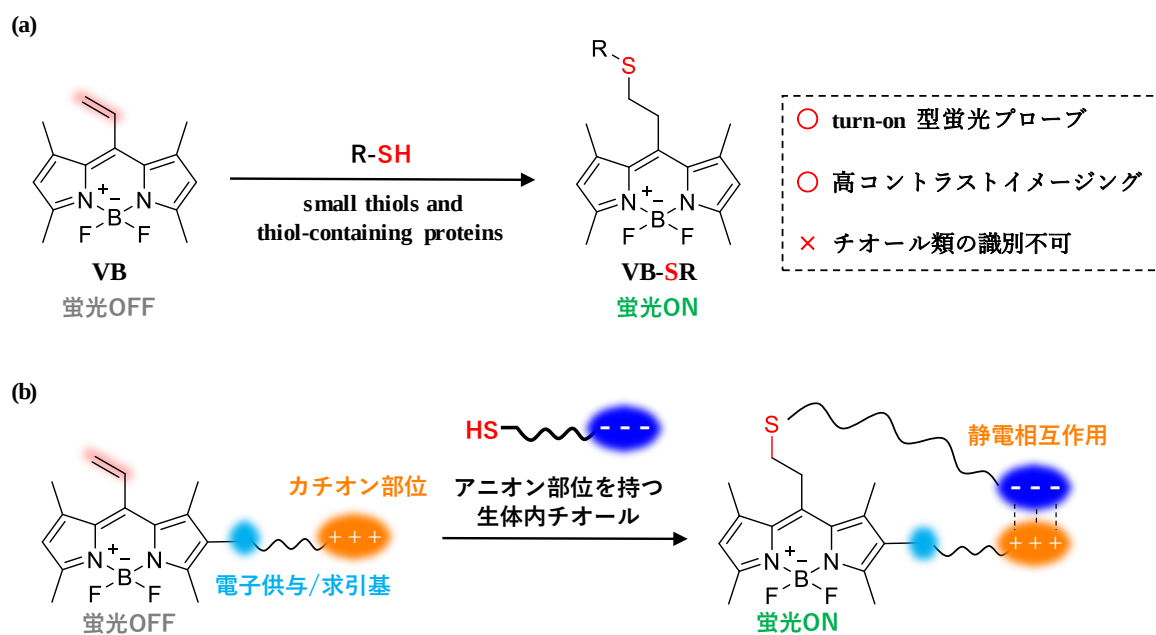


Figure 1. (a) Fluorescence turn-on property of vinyl-BODIPY (VB) exhibited by the addition of small thiols and thiol-containing proteins. (b) Strategy of molecular design of new thiol-selective fluorogenic probes.

[1] Mu, H. Miki, K. Ohe, K. et al. *Chem. Commun.* **2021**, 57, 1818–1821.

二価鉄精密イメージングに向けた分子内イミントラップ戦略による *in situ* 鉄(II)イオンプローブ合成法

○河合寛太¹・辻美恵子¹・平山祐¹ (¹ 岐阜薬科大学)

***In situ* Fe(II) probe synthesis by intramolecular imine trap strategy for precise labile iron detection** (Gifu Pharmaceutical University¹) KAWAI, Kanta¹; TSUJI, Mieko¹; HIRAYAMA, Tasuku¹

細胞内では各小器官や小胞、細胞膜上で二価鉄の授受・貯蔵が行われていると考えられ、こうした二価鉄の輸送・代謝ネットワークを解明するには、高い位置特異性と検出感度を兼ね備えた可視化分子が必要である。しかし、既報の細胞小器官選択的鉄検出プローブの場合、標的部位外でプローブが応答し、その後標的部への局在化が起こる可能性があることから、二価鉄の真の局在位置を決定することが困難であった。そのような背景から、高い位置決定精度を持つ二価鉄イメージング法実現のため、標的部位でのみ応答能を持つような蛍光プローブが求められている。

そこで、ごく最近Kimらによって報告されたRetro-Cope型クリック反応(*J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 5616)を応用した*in situ* プローブ合成戦略

の開発に着手した。当研究室ではこれまで、*N*-オキシド化学を利用した二価鉄蛍光プローブを多種開発してきたが、本戦略はヒドロキシルアミン(HA)構造を有する蛍光団と環状アルキンとのRetro-Cope反応により、細胞内の標的部位で、*N*-オキシド型プローブを*in situ*合成し、狙った場所でのみ二価鉄検出反応が起こるという新手法である。これまでに数種類のヒドロキシルアミンプローブ(HAR)を合成し、Retro-Cope反応性や生じる*N*-オキシド化合物の二価鉄応答性などを評価した。また細胞内において二価鉄濃度の変動を捉えることにも成功している。

しかしながら、エナミン*N*-オキシド型プローブは二価鉄との反応後エナミンとなり、速やかに加水分解されることから、時間とともに標的部位から遊離する様子が観測された(図1)。微小環境下における二価鉄変動を評価するためには、プローブ自体が細胞内で動かないことが望ましい。そこで分子内でイミン中間体を捕捉することで二価鉄反応後の加水分解を抑制する戦略を考案した。過去に確立したヒドロキシルアミン誘導体合成法を基に、分子内イミンを捕捉する求核性官能基を導入したHAR-4を合成した。得られたHAR-4を環状アルキンとさせたところ、Retro-Cope反応が進行し、目的の構造を有する*N*-オキシド化合物が得られた。さらに、当該*N*-オキシド化合物に二価鉄を添加し、HPLCにより反応物を解析したところ、*N*-オキシド化合物由来のピークの減少とともに、生成するイミンと分子内環化した化合物のピークが新たに生成した。また、Retro-Cope反応生成物である*N*-オキシド化合物に二価鉄を添加し、蛍光測定を実施したところ、1時間後で約4倍の蛍光強度の上昇が確認された(図2)。次に、*In situ* プローブ合成戦略をHalo tag導入細胞へと応用したところ、HAR-2を上回る二価鉄応答性を示し、分子内環化戦略の有用性を示すことに成功した

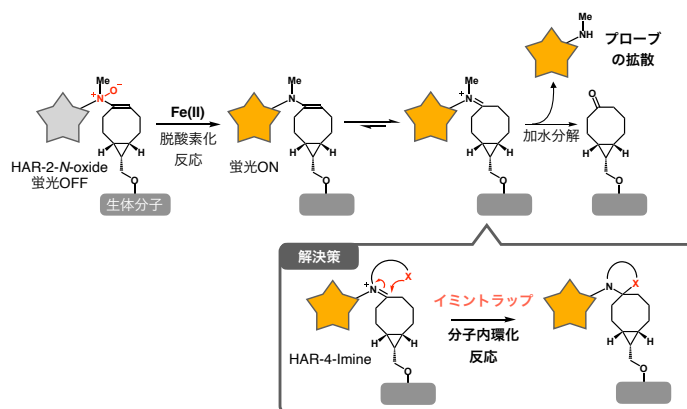


図 1. *in situ* プローブ合成戦略の概要と課題

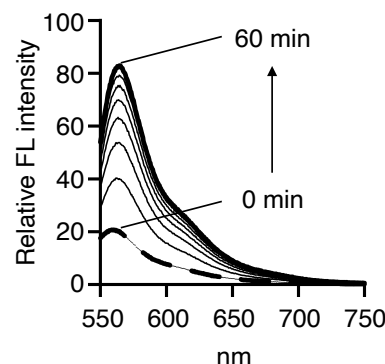


図 2. HAR-4-*N*-オキシド化合物の Fe(II) に対する蛍光応答

ルミノール化学発光を利用したヒト赤血球の脆弱性評価

○中田三智¹・湯川修弘²・白上 努¹ (¹宮崎大工、²宮崎大医)

Evaluation of fragile erythrocytes by chemiluminescence from the forensic luminol reaction (Faculty of Engineering, Univ. of Miyazaki¹, Faculty of Medicine, Univ. of Miyazaki²) NAKATA, Misato¹; YUKAWA, Nobuhiro², SHIRAGAMI, Tsutomu¹

血液のヘム鉄と反応して化学発光を誘起するルミノール反応は、鑑識作業等に活用される良く知られた化学発光反応である。我々は、ヒト血液において正常な赤血球と赤血球膜が損傷した脆弱赤血球との間で、ルミノール発光が観測されるまでに要する時間（保持時間：RetentionTime; RT）が異なることを見いだしている（図1）。このことは、赤血球の脆弱性の程度をRTによって評価できる可能性があることを意味している。一方、貧血等の赤血球異常を診断するために、臨床検査では「赤血球浸透圧抵抗試験」が行われる。これは、赤血球を含む生理食塩水を調製し、NaCl濃度を低下させて、どの濃度で溶血現象が起こるかを捉えることで脆弱性を評価する試験である。本研究では、異なるRTを示す赤血球に対して、赤血球浸透圧抵抗試験を行い、両者の相関関係について調査することで、RTの差によっても赤血球の脆弱性が評価できるかどうかを検討した。

血液は市販されているヒトの血液を用いた。RTの異なる赤血球は、血液を12日間放置して自然劣化させる、並びに光照射によって膜を光損傷させることで準備した。浸透圧抵抗試験は、既存のパルパート法を用いて行った。

図2に示すように4種類の異なるRTを持つ赤血球に対して、浸透圧抵抗試験を行った。正常赤血球（RT=180秒）では、NaCl濃度が5g/Lより下回ると溶血した（図3）。この結果は、従来正常赤血球で報告されている結果と同じである。RT=12秒の赤血球では、NaCl濃度が8g/Lより下回るあたりから溶血が観測され、非常に脆弱な赤血球であることがわかった。また、4時間光照射した赤血球（RT=23秒）の浸透圧抵抗試験では、若干の脆弱性を示したが、2時間光照射した赤血球（RT=138秒）の浸透圧抵抗試験では、脆弱性は全く示さなかった。以上の結果は、RTの差と赤血球の脆弱性の程度との間に相関があることを明確に示している。また、RT=138秒の赤血球では、浸透圧抵抗試験では正常領域と判断できるが、正常赤血球のRTよりも短縮化されていることから、ルミノール発光のRTを利用した方が赤血球の軽微な脆弱性も見分けて評価できることを示唆している。

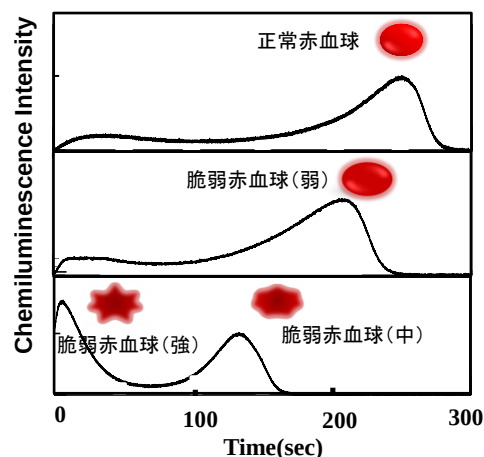


図1. 赤血球の脆弱化と化学発光のRTとの関係

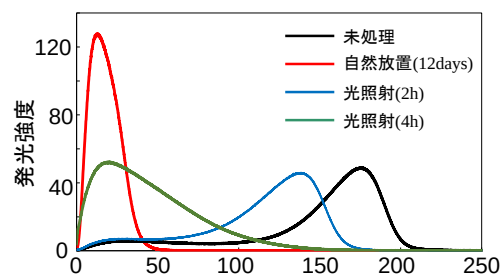


図2. 種々の履歴を持つ赤血球のルミノール発光のRT

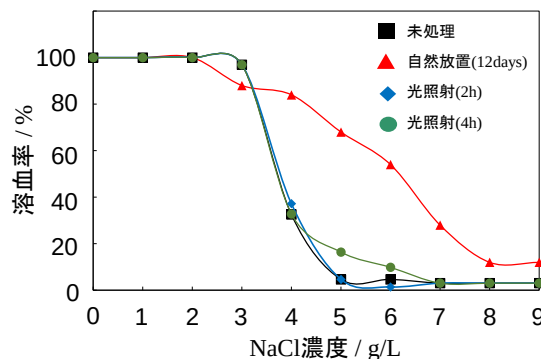


図3. 各NaCl濃度に対する溶血率（浸透圧抵抗試験）

超偏極 MRI 分子プローブ群を用いたアミノペプチダーゼ活性の生体内多重解析に基づくがん診断

○谷田部浩行¹・齋藤雄太郎¹・高草木洋一^{2,3}・齋藤圭太²・山本和俊⁴・Murali C. Krishna⁴・山東信介¹ (1東大院工、²量子科学技術研究開発機構、³千葉大院融合理工、⁴米国国立衛生研究所)

Cancer diagnosis based on in vivo multiplexed analysis of aminopeptidase activities using hyperpolarized MRI molecular probes (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹, National Institutes for Quantum Science and Technology², Graduate School of Science, Chiba University³, National Institutes of Health, USA⁴) YATABE Hiroyuki¹; SAITO Yutaro¹; TAKAKUSAGI Yoichi^{2, 3}; SAITO Keita²; YAMAMOTO Kazutoshi⁴; Murali C. Krishna⁴; SANDO Shinsuke¹

アミノペプチダーゼ (AP) は、ペプチドやタンパク質を N 末端アミノ酸残基特異的に切断する酵素群である。本研究では、レニン-アンジオテンシン系 (RA 系) に属する 4 種類の AP (APN、APA、APB、ロイシン AP (LAP)) に着目した。RA 系において、APA はアンジオテンシン II (Ang II) を Ang III に代謝し、Ang III はさらに、APN、APB、LAP によって Ang IV へと代謝される。これらのホルモンペプチドは、それぞれ受容体に作用することで、血管機能の調節や細胞増殖を制御している (図 1A)。よって血管新生を必須とする腫瘍をはじめとする様々な疾患において、RA 系 AP 活性バランスの異常が認められている。RA 系 AP 活性の多重解析は、このバランス異常を捉えることで、がんや腎疾患などの診断を可能にする有用なアプローチである¹。しかし、これまでの RA 系 AP 活性の多重解析は、患者から採取した血液や尿を用いた間接的な診断に留まっていた。よって生体内 RA 系 AP 活性の疾患部位での直接的な多重検出およびイメージングが強く望まれている。

我々は、核磁気共鳴イメージング (NMR/MRI) とその低感度を克服する動的核偏極法 (DNP) に着目した²。DNP-MRI は、生体透過性が高い分子イメージング手法であり、化学シフトの違いによって複数の化学種を同時に検出することができる。これまでに、我々は生体内 APN 活性を検出・可視化できる DNP-MRI 分子プローブ Ala-[1-¹³C]Gly-*d*₂-NMe₂の開発に成功している³。この分子プローブは、精密な分子設計によって、DNP-MRI 分子プローブが生体内で機能するための様々な物理化学的条件を満たしている。そこで、この分子プローブを基盤として構造展開することにより、物理化学的条件を損なうことなく、酵素反応性と化学シフトを変化させた一連の DNP-MRI 分子プローブ群を開発した (図 1B)。開発した分子プローブ群を核偏極し、健常マウスに投与したところ、複数の生体内 RA 系 AP 活性の同時検出およびイメージングに成功した。さらに、開発した分子プローブ群を担がんマウスに投与することで、腫瘍中の RA 系 AP 活性の直接的な多重検出を行った。その結果、AP 活性の多重解析は、単一の AP 活性の検出に比べ、より正確な腫瘍診断につながることを示唆された。

[1] M. P. Carrera, *et al.*, *Anticancer Res.* 26, 1011–1014 (2006). [2] J. H. Ardenkjær-Larsen, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 10158–10163 (2003), [3] Y. Saito, *et al.*, *Sci. Adv.* 8, eabj2667 (2022).

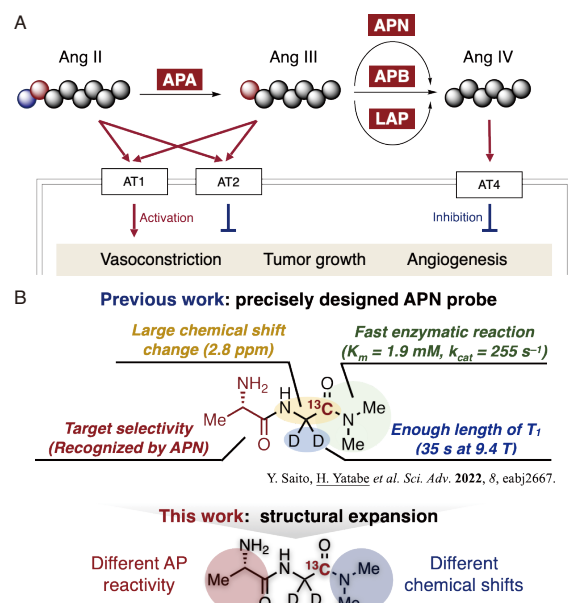


図 1A. レニンアンジオテンシン系に関わるアミノペプチダーゼの生理学的役割。図 1B. 本研究の分子プローブ群の設計戦略。

タンパク質の凝集過程解明に向けた アミロイド線維の超解像赤外吸収分光イメージング

○濱田悠太¹・廣瀬敏晃¹・道垣内龍男²、建部 徹²、河田陽一²、川田善正¹、
小野篤史¹ (¹ 静大院工、² 浜松ホトニクス)

Super-resolution Infrared Absorption Spectroscopic Imaging of Amyloid Fibrils for Elucidating Protein Aggregation Processes (Graduate School of Engineering, Shizuoka Univ.¹, Hamamatsu Photonics K.K.²)
HAMADA Yuta¹; HIROSE Toshiaki¹, DOUGAKIUCHI Tatsuo², TAKEBE Gen², KAWADA Yoichi²,
KAWATA Yoshimasa¹, ONO Atsushi¹

タンパク質二次構造は、生体内のアミノ酸配列に基づく折りたたみ（フォールディング）により三次元立体構造を形成し機能を発現する。フォールディング過程における誤ったプロセス（ミスフォールディング）により、不溶性のアミロイド線維が形成される。アミロイド線維の体内沈着は、アルツハイマー病などの神経変性疾患を引き起こす要因となる[1]。患者数は年々増加傾向にあるのに対し、アミロイド線維の形成過程は未解明である。疾患の発症メカニズム解明および早期発見に向けて、アミロイド線維形成過程の微視的観察が求められる。我々は、ミスフォールディングによりアミロイド線維を形成するインスリンタンパク質に注目した。インスリンの構造は単純であり、機能が明確であることからフォールディング研究にて広く用いられる。これまでインスリンは、X線結晶構造解析や核磁気共鳴法によりタンパク質全体の構造が明らかになっている。これらの解析から、インスリンモノマーはオリゴマーの中間状態を経て三次構造に折りたたまれることが解明された[2]。フォールディング過程の中間状態におけるインスリンは、 α ヘリックスや β シートのようなタンパク質二次構造で構成されている。これらの二次構造は、タンパク質立体構造の安定性や機能の発現に重要な役割を果たす。本研究では、フォールディング過程解明のため、近接場赤外吸収分光法を用いてアミロイド線維の超解像イメージを取得した。近接場赤外吸収分光法（図1(a)）は、試料表面に近接したプローブ先端からの散乱光を検出することにより、試料の分子振動由来の局所的な光吸収を計測する手法である[3]。この手法は、タンパク質を非標識かつ非侵襲にてイメージングする。近年ウイルスや神経細胞など生体試料のイメージングに広く応用されている[4]。

本研究では、中赤外レーザー（ λ : $\sim 6\ \mu\text{m}$ ）を光源とした近接場走査型光学顕微鏡を構築し、アミロイド線維を分光観察した。アミロイド線維はインスリンの熱凝集により作製した。加熱時間の増大に伴う凝集状態をFT-IRにより評価したところ、時間経過とともにインスリンの凝集が促進され、タンパク質二次構造が α ヘリックス（ $1660\ \text{cm}^{-1}$ ）から β シート（ $1635\ \text{cm}^{-1}$ ）へと変性する様子が観測された（図1(b)）。図1(c)は、120分加熱により作製したアミロイド線維のAFM像、および波数 $1635\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1660\ \text{cm}^{-1}$ における近接場赤外吸収像である。ナノスケールのアミロイド線維に対し、分光観察により官能基の振動モードに起因する赤外吸収差を観測し、回折限界を遥かに超えた空間分解能 $30\ \text{nm}$ にて超解像イメージングを実証した。これらの結果は、アミロイド線維の構造解析における近接場赤外吸収分光法の重要性を示す結果である。

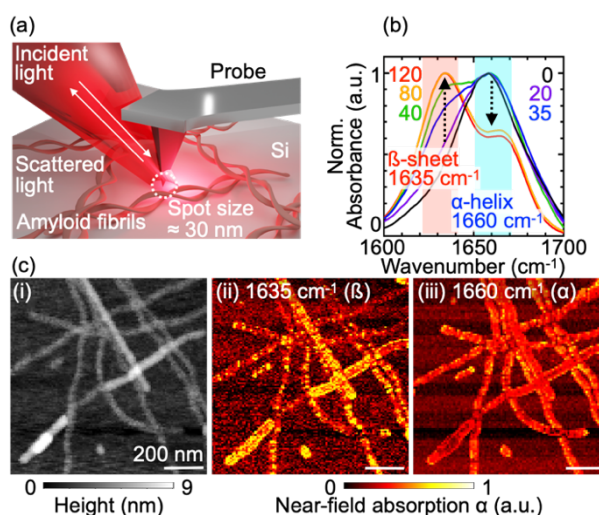


Fig.1 (a) Near-field infrared absorption spectroscopy imaging. (b) FT-IR spectra of amyloid fibrils. (c) Near-field imaging of amyloid fibrils. (i) AFM image. (ii, iii) Near-field absorption image.

- [1] G. Merlini *et al.*, N. Engl. J. Med. **349**, 583 (2003). [2] Hua QX, *et al.*, J. Biol. Chem. **277**, 43443 (2002)
[3] B. Knoll *et al.*, Nature **399**, 134 (1999). [4] R.O.Freitas *et al.*, Cells **10**, 2559 (2021).

大豆根粒菌のラマン分光解析を通した大豆の窒素固定活性予測

○諏訪駿之介^{1,2}・安藤正浩^{2,3}・柏木康熙¹・京谷拓磨¹・長谷川健人^{1,2}・Habibi Safiullahr⁴・大津直子⁴・竹山春子^{1,2,3,5} (早大院・先進理工¹, 産総研・早大 CBB-D-01L², 早大ナノ・ライフ創新研³, 農工大院・農⁴, 早大・先進生命動態研⁵)

Prediction of Nitrogen Fixation Activity in Soybean Nodules Using Raman Spectroscopy (Graduate school of Advanced Science and Engineering, Waseda University¹, Waseda University Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory², Research organization for Nano and Life Innovation³, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology⁴, Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University⁵) SUWA, Shunnosuke^{1,2}; ANDO, Masahiro^{2,3}; KASHIWAGI, Koki¹; KYOTANI, Takuma¹; HASEGAWA, Kento^{1,2}; Habibi Safiullahr⁴; OTSU Naoko⁴; TAKEYAMA, Haruko^{1,2,3,5};

ダイズは根に根粒と呼ばれるこぶ状の器官を形成し、その内部には根粒菌が生息している。植物体は根粒菌に炭素源を供給する一方で、根粒菌は窒素固定によって大気中の N_2 を NH_4^+ に変換し、植物体に供給する。植物は大気中の窒素を直接利用できないため、根粒菌による窒素固定がダイズの生育、収量に与える影響は大きい。根粒菌による窒素固定の分子生物学的メカニズムの解明が精力的に行われている。しかしながら、共生状態の根粒菌内の生体分子の包括的な解析事例は少ない。

本研究では非破壊、ラベルフリーで対象の分子成分の解析が可能なラマン分光法を用いて、根粒菌のシングルセル解析を行い、窒素固定活性に寄与するような細胞内成分を探索した。初めに、ダイズを実験室内で栽培した。経時的(栽培 30, 45, 87 日)に根から根粒を採取し、アセチレン還元活性を測定し、窒素固定活性を評価した。同時に、根粒から根粒菌懸濁液を調整し、ラマン分光法を用いて 1 細胞レベル (計 828 細胞) での生体分子情報を取得した。得られたラマンスペクトルを多変量スペクトル分解(MCR-ALS¹⁾)で解析し、細胞内の分子プロファイルを取得した。さらに、ランダムフォレスト回帰で窒素固定活性と根粒菌の分子プロファイルとの相関解析を行い、窒素固定に寄与する生体分子を特定した。

ダイズの窒素固定活性は栽培時期、そして根粒の大きさ依存的に変化していることが確認された。ラマン分光測定と MCR-ALS 解析では様々な生体分子が検出された

(Fig. 1)。ポリヒドロキシ酪酸(Polyhydroxybutyrate, PHB)は生体ポリマーとして知られており、栽培条件間で特に強い変動が見られた。ランダムフォレスト回帰では、根粒菌の生体分子プロファイルから窒素固定を高精度に予測できた($R^2 > 0.70$)。この予測では PHB のプロファイルが最も重要な特徴量であると判定され、共生窒素固定における PHB の強い関与が示唆された。今後 PHB の細胞内動態について詳細に解析することで、根粒菌の窒素固定のメカニズムをさらに深く解明できると期待される。本研究は内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業 (JPJ009237、管理法人:生研支援センター) によって実施されました。

1) Ando, Hamaguchi, *Journal of Biomedical Optics*, 19, 011016 (2013)

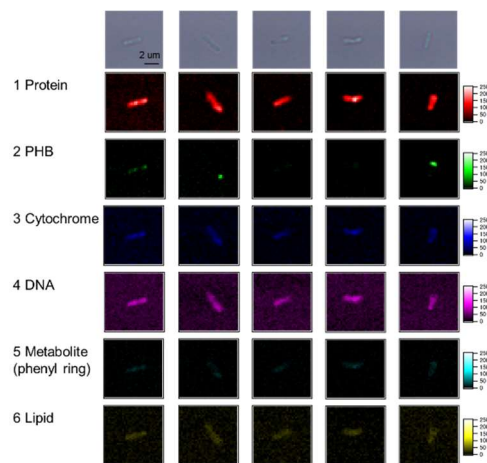


Fig. 1 根粒菌のシングルセルラマンイメージ

シュードノットアプタマーを用いたストレス検出バイオセンサの開発

○森田葵¹・内田里奈¹・上島理乃¹・光永靖²・鳥澤眞介²・小林靖尚²・
才木常正³・高村映一郎¹・坂元博昭¹ (¹福井大学、²近畿大学、³兵庫県立
工業技術センター)

Development of a stress detection biosensor using pseudoknot aptamer. (University of Fukui,¹ Kindai University², Hyogo Prefectural Institute of Technology.³) MORITA, Aoi¹; UCHIDA, Rina¹; UEJIMA, Rino¹; MITSUNAGA, Yasushi²; TORISAWA, Shinsuke²; KOBAYASHI, Yasuhisa²; SAIKI, Tsunemasa³; TAKAMURA, Eiichiro¹; SAKAMOTO, Hiroaki¹

日常生活でのストレスレベルの POCT(Point of Care Testing)は、心身の健康維持において非常に重要である。現行のストレス診断方法は、問診、脳波(EEG)、心電図(ECG)、体温および自己問診票である。このような方法は煩雑であり、大型装置を用いるため個人での使用や POCT には適していない。また、個人のストレスレベルを間接的に測定しているため、特異性に欠けるという問題点がある。そこで、ストレスの指標となるバイオマーカーとしてコルチゾールが注目を集めている。そこで本研究では高感度、短時間で検出可能で、小型化が容易、低コストなどの利点がある電気化学的手法を用いた POCT 可能なストレス検出バイオセンサの構築を目的とした。

コルチゾール検出のために、シュードノット構造を持つアプタマーを分子認識素子として用い、金電極上に Au-S 結合を介して固定化し、末端にメディエーターとしてフェロセンを修飾した電極を作製した。ここでシュードノット構造とは、少なくとも2つのステムループ構造を含む核酸の二次構造で、一方にステムの片側が他方のステムの間に位置している構造である。電極表面において、アプタマーがコルチゾールと特異的に結合した際、アプタマーの高次構造が変化しメディエーターが電極表面に接近し、電流値が増加する。一方で、コルチゾール濃度を薄くすると、メディエーターは元の構造に戻り電流値は減少する。この電流値変化をシグナルとすることでコルチゾールの検出が可能となる(Fig.1)。シュードノットアプタマーを固定化した金電極をセンサ電極とし、3電極系により、CV(Cyclic Voltammetry)と i-t(Chronoamperometry i-t)を用いて電流値の増加が見られた。これはセンサ表面へ固定化されたアプタマーがコルチゾールを認識し構造変化を起こし、メディエーターであるフェロセン分子が電極近傍に接近したことが示唆される。また、バッファーを添加することでコルチゾール濃度を下げていくと電流値の減少が確認された。これは、化学平衡に基づきコルチゾールがアプタマーから解離することで、元のシュードノット構造に戻りフェロセンが電極近傍から離れたことで電流値が減少したと考えられる。以上の結果から、コルチゾールレベルの増減が測定可能であることが示唆された。

今後、標的以外のタンパク質を添加した際でもコルチゾールにのみ特異的に反応するかと電極の安定性評価をする。最終的には血中のコルチゾール濃度変化を測定し、ストレスの POCT に応用できるのではないかと考える。

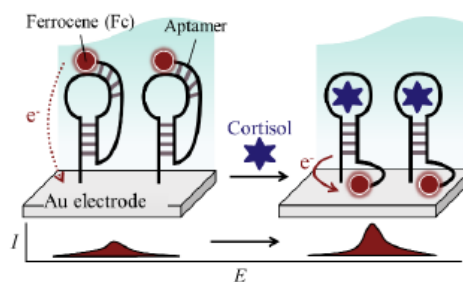


Fig.1 Detection principle of cortisol sensor

喉頭がんスマート監視を目指した miRNA 画像検査技術の構築

○柳原愛璃¹、渡部結衣¹、神田真穂¹、中居桃花¹、Han-Sheng Chuang²、

長谷川達人¹、坂元知里³、高村映一郎¹、坂元博昭¹

(¹ 福井大学、² National Cheng Kung University、³ 福井工業高等専門学校)

Smart diagnosis and monitoring of early-stage oral cancer based on image analysis (University of Fukui¹, National Cheng Kung University², National Institute of Technology, Fukui College) Airi Yanagihara¹, Yui Watanabe¹, Maho Koda¹, Momoka Nakai¹, Han-Sheng Chuang², Tatsuhito Hasegawa¹, Chisato Sakamoto³, Eiichiro Takamura¹, Hiroaki Sakamoto¹

喉頭がんは、がん死亡者数第4位である。現状、喉頭がんの発見はステージ3~4が多く、早期診断技術が求められる。早期発見には、簡便な検査に加え、長期的なモニタリングおよびそのデータ収集・診断が必要である。現在行われているMRI診断や内視鏡検査、CT検査は正確ながん検査として優れているが、簡易検査とは言い難く、長期的なモニタリングやデータ収集には適していない。

そこで、本研究では、腫瘍から生産されるmiRNAを標的とした簡易検査技術の確立を目的とした。喉頭がんから生産されるmiRNA-9 (miR-9; 5'-UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA-3') は血中や唾液中に含まれるため、患者から血液や唾液を採取し、miR-9を検出・定量することによってがん診断が可能になる。

本研究では、粒子表面の半面が金、半面が蛍光でコーティングされたJanus粒子を作製し、金表面上で標的miR-9を特異的に補足し、その回転ブラウン運動変化を画像解析により計測することで、標的miR-9の有無を識別する新規検査技術を企図した。Stokes-Einstein-Debye (SED)の関係式より、溶液の温度と液体の粘度が制御されている場合、粒子の回転拡散度は粒径の3乗に反比例する。したがって粒径が小さな粒子は拡散度が大きく、粒径が大きな粒子は拡散度が小さくなる。Janus粒子を用いた場合、拡散度は粒子の回転運動を行うことで得られる点滅信号の経過時間ごとの相関強度から相関時間が算出される。溶液中の粒子の回転速度の変動が相関している時間を表す相関時間は、回転拡散係数に反比例することが報告されている。このことから粒径の小さな粒子は相関時間が小さく、粒径の大きな粒子は相関時間が大きくなるため、粒子の相関時間から、Janus粒子と標的バイオマーカーの複合体が形成した際の粒径変化を検出することが可能である。一方で、本研究で標的とするmiR-9はオリゴ核酸であるため、たとえJanus粒子表面で捕捉できたとしても、粒径変化としては小さく画像による識別が困難であることが予想される。

そこで、本研究ではJanus粒子サイズの拡大を図ることで、画像解析における相関時間の増大させるためにローリングサークル増幅(RCA: Rolling Circle Amplification)を導入した(図1)。miR-9とmiR-9の一部相補的な配列をもつpadlockDNAとで環状DNAを形成し、ヤス粒子表面のpDNAによって捕捉した後、phi29 DNAポリメラーゼにより、環状DNAを鋳型としてpDNAを伸長する。その結果、Janus粒子表面上で、標的RNA-RCA環状DNAの増幅産物により粒子サイズの拡大、回転ブラウン運動に伴う相関時間の増大が可能となる。miR-9を含むサンプルにおいて、相関時間の増加が確認された。これは、Janus粒子表面での標的miRNA-9の補足、および、RCAのよる粒径拡大が生じたいことが示唆される。

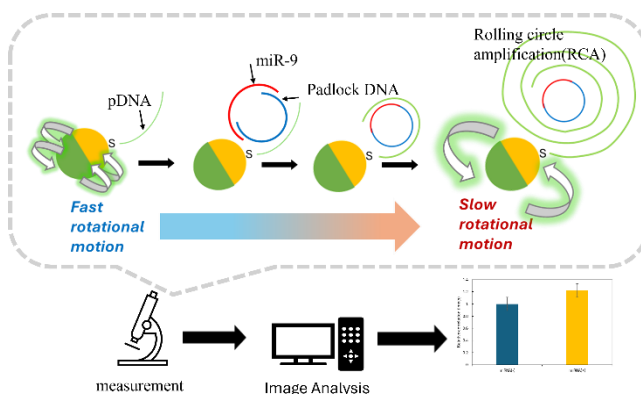


図1 喉頭がん由来miR-9のJanus粒子による補足とRCA増幅による画像検査技術

DNA アプタマー標識ビーズの蛍光イメージングに基づく多成分生体分子検出

○三尾玲緒斗・西原達哉・田邊一仁（青学大院理工）

Multiplex biomolecular analysis based on the fluorescence imaging of DNA aptamer-labeled beads (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) MIO, Reoto; NISHIHARA, Tatsuya; TANABE, Kazuhito

DNA アプタマーは一本鎖の DNA から構成され、抗体と同様に立体構造に依存した標的との結合が可能である。SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法¹⁾の報告を契機に、様々な DNA アプタマーの取得法が考案されており、低分子から細胞に結合するものまで多種多様な種類の DNA アプタマーが取得されている。また、得られた DNA アプタマーに対して、蛍光基を修飾し、標的の認識に伴う蛍光特性の変化を読み出すことにより、標的分子のセンシングも可能である。そのため、様々な種類の DNA アプタマーを用いることで、多成分の生体分子を同時に解析可能になると期待される。しかしながら、蛍光法を用いる場合、蛍光波長の重なりから、同時解析する場合に、利用可能な蛍光色素が限られる。

以上を踏まえ、本研究では多成分の生体分子の同時解析を可能にする新たな方法論の構築に取り組んだ (Figure 1)。まず、解析対象分子を認識する DNA アプタマーを標識したビーズを、対象分子の数だけ作成する。次に、得られた DNA アプタマー標識ビーズカクテルに対して、サンプルを加える。本ビーズに標識する DNA アプタマーは、標的の認識に伴い二重鎖が解け、ビーズから遊離するように設計されている。そのため、蛍光顕微鏡を用い、ビーズごとの FAM 由来の蛍光量の減少から標的分子の定量が実現する。多成分解析にあたり、ビーズごとに標識された DNA アプタマーの識別が必要となる。そこで、ビーズごとに、異なる量の Cy5 の標識を検討した。各ビーズから得られる Cy5 の蛍光量、およびビーズ自体のサイズ情報から、ビーズ上の DNA アプタマーを識別可能となる。サンプルを加え、一定時間を経過した後、蛍光顕微鏡で観察し、各ビーズに含まれる FAM、及び Cy5 蛍光強度を読み出すことで、多成分解析が実現すると考えた。

本研究戦略の実現可能性を検証するにあたり、がんのエネルギー代謝と関連する乳酸、およびグルコースの同時検出に取り組んだ。既報の乳酸、およびグルコースに対する DNA アプタマー²⁾に対して FAM を標識し、DNA 標識ビーズをそれぞれ作成した。乳酸、およびグルコースを含む条件で、それぞれ直交的に認識が生じ、各ビーズから得られる FAM の蛍光強度の減少が確かめられた。また、Cy5 の蛍光標識量の制御にも成功しており、ビーズサイズ、および Cy5 の蛍光強度の違いから、10 成分以上のビーズの識別可能性が示唆された。本発表では、これらの詳細について報告する。

本研究戦略の実現可能性を検証するにあたり、がんのエネルギー代謝と関連する乳酸、およびグルコースの同時検出に取り組んだ。既報の乳酸、およびグルコースに対する DNA アプタマー²⁾に対して FAM を標識し、DNA 標識ビーズをそれぞれ作成した。乳酸、およびグルコースを含む条件で、それぞれ直交的に認識が生じ、各ビーズから得られる FAM の蛍光強度の減少が確かめられた。また、Cy5 の蛍光標識量の制御にも成功しており、ビーズサイズ、および Cy5 の蛍光強度の違いから、10 成分以上のビーズの識別可能性が示唆された。本発表では、これらの詳細について報告する。

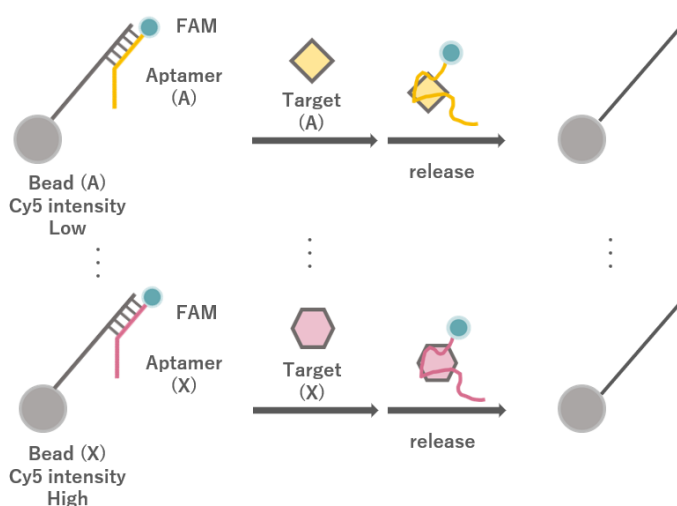


Figure1. Multiplex biomolecular analysis using DNA aptamer labeled beads

1) A. D. Ellington, and J. W. Szostak, *Nature*, **346**, 818-822 (1990).

2) P. J. Huang, and J. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **62**, e202212879 (2023).

ヒト腸管モデルにおけるアルカリホスファターゼ活性の

定量評価に向けた多孔膜電極デバイス

○谷和佳奈¹・宇田川喜信¹・阿部博弥^{1,2}・伊野浩介¹・珠玖仁¹(¹東北大学工学研究科、²東北大学学際科学フロンティア研究所)

Porous Membrane Electrode Device for Quantitative Evaluation of Alkaline Phosphatase Activity in a Human Intestinal Model (Graduate School of engineering, Tohoku University¹, Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University²) TANI, Wakana¹; UTAGAWA, Yoshinobu¹; ABE, Hiroya^{1,2}; INO, Kosuke¹; SHIKU, Hitoshi¹

薬剤開発において動物実験が用いられてきたが、ヒトとの生物学的な違いや、倫理的な問題を抱えている。そこで、ヒト培養細胞を用いた薬剤評価が注目されている。生体模倣システム (MPS) は、生体内の環境をより正確に再現し、幅広い条件の検討を効率的に実施できるため、研究が進められている。多孔膜上に細胞を培養することで、細胞層のバリア機能や薬剤透過性を評価することができ、一般的に経上皮電気抵抗 (TEER) 計測で細胞のバリア機能が評価される。しかし、デバイス内で代謝活性を評価できるシステムは少ない。本研究では、デバイス上に培養した細胞の電気化学的評価を見据えて、バイオマーカーとして使える可能性があるアルカリホスファターゼ (ALP) の定量評価を行った。

ALP は、リポ多糖類 (LPS) のリン酸結合を除去して解毒できる脱リン酸化酵素であり、*p*-aminophenyl phosphate (PAPP) を基質として、電気化学計測が可能な *p*-aminophenol (PAP) を産生する (Fig. 1)。ALP が 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 mU/mL となるように、PAPP を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH=9.0) で調整し、その混合溶液をインキュベータ内で 30 分反応させた後電気化学測定を行った。またポリカーボネート多孔膜に金を無電解メッキした多孔膜電極 (ハインツテック株式会社) の上に、ヒト腸管モデルで一般的に使用される Caco-2 を 2 日間培養した。それを PAPP を含む Tris-HCl 緩衝液で 3 分間処理し、電気化学測定を行った。

-0.1~0.3 V でのアンペリメトリーにより ALP の活性測定を行った。その結果、濃度が大きくなるほど電流も増加した (Fig. 2(a))。これより、この測定法で ALP の活性を測れることが分かった。また、Caco-2 を 2 日間培養したデバイスで同様に ALP 活性を測定した結果、Caco-2 を培養していないデバイスよりも電流の増加が見られた (Fig. 2(b))。ここからデバイス上の細胞の ALP 活性を検出できたことを確認した。ALP の活性を測る際に PAP 等の細胞に有毒な物質が生成される。従来の吸光度測定では 30~60 min の処理が必要となるが、今回の電気化学測定は、反応場の近傍に電極があるため 3 min の処理で計測可能であり、細胞への毒性が軽減される可能性があるシステムを開発できた。

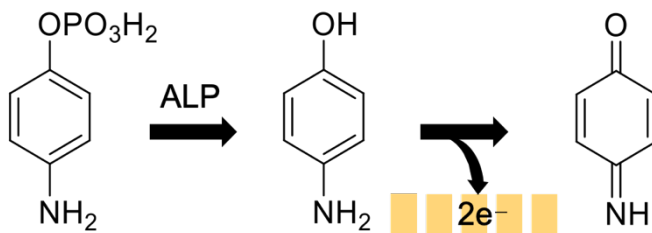


Fig. 1 ALP 活性測定の機構

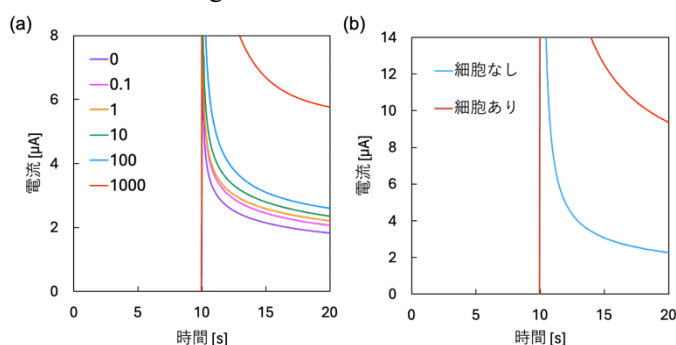


Fig. 2 (a) ALP、(b)細胞のアンペロメトリー測定

システイン付加型人工インスリンレセプタによるインスリンの EIS 測定

○野原一真¹, 佐藤嘉哉², 有田栄次², 矢口喜明², 池田丈¹, 石田文典¹,

廣田隆一¹, 黒田章夫¹, 舟橋久景¹ (広島大¹, テルモ株式会社²)

EIS Measurement of Insulin Using a Cysteine-Modified Artificial Insulin Receptor

Kazuma Nohara¹, Hiroya Sato², Eiji Arita², Yoshiaki Yaguchi², Takeshi Ikeda¹, Takenori Ishida¹, Ryuichi Hirota¹, Akio Kuroda¹, Funabashi Hisakage¹ (Hiroshima Univ.,¹ Terumo Corp.²)

[目的]インスリンは血糖値調節のための重要な因子であり、血中濃度の測定が望まれる。しかし、現在普及している測定法は糖尿病患者等が手軽に行えるものではない。そこで我々は、ポータブル電気化学バイオセンサの開発を目指して、インスリン測定用人工タンパク質レセプタの開発を行っている。本研究では、金-チオール間共有 (Au-S) 結合を利用して電極表面へ固定可能な人工レセプタを開発し、それを利用したインスリン電気化学測定系の確立を目指した。

[方法]インスリン認識部位として、天然インスリン受容体のインスリン認識部位である α CT セグメントと L1CR ドメインを利用した⁽¹⁾。これら二つの部位をリンカーでつないだ人工レセプタ^{(2), (3)}の N 末端側に Antifouling ペプチド配列 (Af)⁽⁴⁾ とシステイン (Cys) を付加した人工レセプタ Cys-Af- α L を新たに作製した (Fig. 1)。また、 α CT セグメントに変異を加え、インスリン認識能を欠損させた Mut-Cys-Af- α L も作製した。人工レセプタは、N 末端 Cys 残基のチオール基を利用して、Au-S 結合により金電極表面へ自己集積させた。この人工レセプタ修飾電極のインスリンに対する電気化学的応答を、電気化学インピーダンス分光法 (EIS) を用いて評価した (Fig. 2)。EIS 測定は、5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} の存在下、緩衝液中で行った。得られた応答を解析し、ナイキストプロットから電荷移動抵抗 R_{ct} を求めた。

[結果・考察]Cys-Af- α L 修飾電極のインピーダンス応答は、インスリン濃度が高くなるにつれて、 R_{ct} が大きくなった。一方、Mut-Cys- α L 修飾電極はインスリンに対してほとんどインピーダンス応答を示さなかった。このことから Cys-Af- α L 修飾電極における R_{ct} の上昇は、Cys-Af- α L がインスリンを認識・構造変化を起こした結果、界面電荷移動をより阻害したためと考えられる。以上のことから、Cys-Af- α L 修飾電極を用いた EIS 測定によってインスリンが電気化学的に測定可能であることが示された。

References

(1) Menting JG *et.al.*, *Nature*, 493, p241 (2013), (2) Shigeto H *et. al.*, *Analyst*, 144, p3765 (2019), (3) Murai Y, *et.al.*, *Electrochemistry*, 92, 022006 (2024), (4) Nowinski AK *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, p6000 (2012)

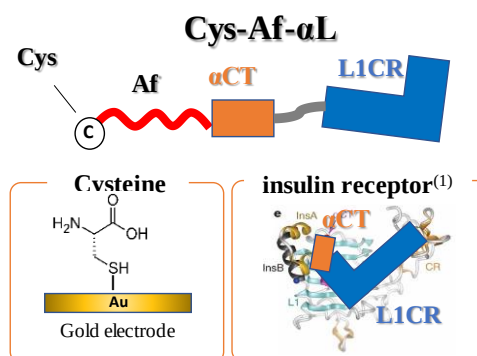


Figure 1. The artificial insulin receptor in this research

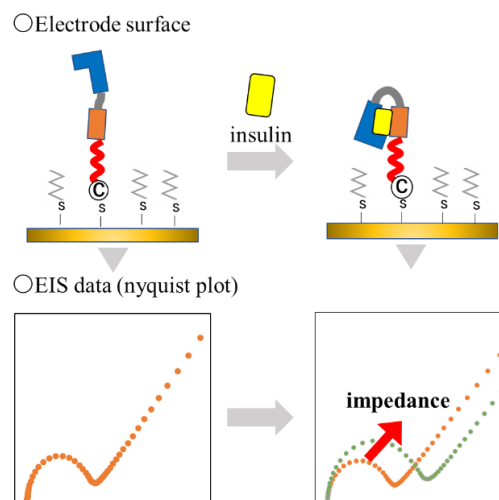


Figure 2. The principle of insulin measurement

ヒト直交性のあるキシロシダーゼを増感酵素とする

沈着型蛍光性基質の開発

○黒田 晃大¹・古賀 郎寛¹・宮崎 裕之¹・金子 諒右²・新居 輝樹²・岸村 顕広^{2,3}・森 健²・片山 佳樹^{2,3} (¹ 九大院システム生命、² 九大院工、³ 九大分子システム科学センター)

Development of a fluorescent substrate which deposits on cells in response to human orthogonal xylosidase.
(Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu Univ.¹, Graduate School of Engineering, Kyusyu Univ.², Center for Molecular Systems, Kyushu Univ.³) KURODA, Akihiro¹; KOGA, Akihiro¹; MIYAZAKI, Yuji¹; KANEKO, Ryosuke²; NII, Teruki²; KISHIMURA, Akihiro^{2,3}; MORI, Takeshi²; KATAYAMA, Yoshiki^{2,3}

【緒言】 バイオ分析において、酵素増感法は抗原タンパク質の検出に広く用いられている。この手法では酵素反応により検出シグナルを増強可能であるため、通常の蛍光抗体法では検出困難である低発現量のタンパク質も分析できる。これまでに当研究室では、従来の増感酵素に代わるヒト直交性酵群 (Human Orthogonal Enzymes: HOEs) をこれまでに提案してきた¹。HOEs はヒト細胞に存在しないため、従来の酵素で問題となるバックグラウンドシグナルの抑制が可能である。さらに、互いに交差反応せず、同一の条件で高い反応性を示すことから同時に使用できる。本研究では、HOE を用いて細胞表面上の抗原タンパク質を検出するための基質である HOE-QS (HOE-reactive-Quinone methide Substrate) を開発した。HOE-QS は、HOE と酵素反応することでキノンメチド構造を有する化合物に変化し、これにより標的タンパク質の特異的な染色が可能になる。また、我々が開発した基質と異なり、キノンメチド部を蛍光部から分離することで様々な蛍光基を容易に導入できるようにした。本発表では、HOE の一種、キシロシダーゼ (Xyl) に応答して細胞の染色を可能とする染色基質 HOE-QS-X (図 1) について報告する。

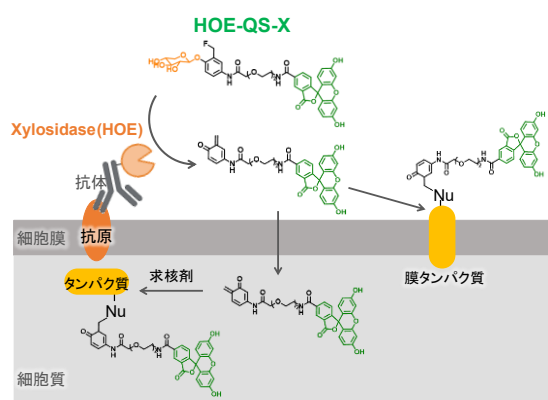


図 1 HOE-QS による細胞染色

【実験】 キシロースを出発物質として計 11 段階の反応で、HOE-QS-X を合成した。目的物は質量分析法及び核磁気共鳴分光法にて同定した。HOE-QS-X を PC9 細胞上に発現している抗原タンパク質 CD44 の検出に適用した。ビオチン化した Xyl 及び抗 CD44 抗体をストレプトアビジンで架橋し、これによってヒト細胞上の CD44 を標識した。HOE-QS-X を添加し 37 °C で反応させた後、フローサイトメトリー (FCM) と蛍光顕微鏡を用いて細胞染色を評価した。

【結果と考察】 FCM と蛍光顕微鏡観察により、HOE-QS-X と Xyl を用いたヒト細胞上 CD44 に応答した染色に成功した (図 2)。以上の結果より、HOE-QS-X は Xyl に応答して細胞を染色できる有用なプローブであることが示唆された。今後は、HOE の一種、ラムノシダーゼとその HOE-QS 基質を併用することで細胞や組織の多色増感検出へと応用する。

アイソタイプコントロール

細胞染色

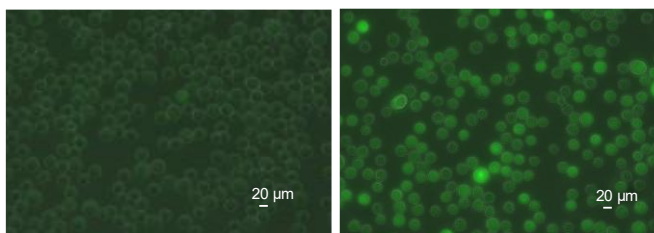


図 2 蛍光顕微鏡観察の結果

1. R.Kaneko, et al. Chem. Lett. 50, 8, 1493-1495 (2021)

「ヒト直交性酵素」を用いた微小液滴内での抗原タンパク質の超高度検出

○加隈綾晟¹・金子諒右²・古賀朗寛¹・藤村祐³・新居輝樹²・岸村顕広²・森健²・片山佳樹² (¹九州大学大学院システム生命科学府、²九州大学大学院工学研究院、³株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ)

Highly sensitive detection of antigen proteins in microdroplets using human orthogonal enzymes (Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University¹, Graduate School of Engineering, Kyushu University², On-chip Biotechnologies Co., Ltd.³) KAGUMA, Ryosei¹; KANEKO, Ryosuke²; KOGA Akihiro¹; FUJIMURA Yuu³; NII Teruki²; KISHIMURA Akihiro²; MORI Takeshi²; KATAYAMA Yoshiki²

微小液滴に基づくマイクロ流路システムは、生物試料のハイスループットな解析に有用である。用途の一つとして、1細胞レベルで、哺乳類細胞の分離・同定が期待されている。すなわち、酵素-抗体複合体を用いることで、ヒト細胞に発現する抗原タンパク質を検出し、細胞種の同定が可能である(図1)。原理的には数個のコピー数しかない抗原タンパク質を検出できるため、超精密な細胞の同定ができる可能性がある。しかし、これまで用いられてきた増感酵素(β-ガラクトシダーゼなど)は、ヒト細胞に同一の活性が内在するため、これを失活させる操作が必要であり、これは細胞死を導いてしまう。一方、我々のグループは、ヒト細胞に活性が存在しない増感酵素「ヒト直交性酵素」を複数同定し、これにより、生細胞の複数の抗原を同時に多色で検出できることを示してきた。¹本研究は、これらの酵素を微小液滴に適用することにより、数個しかないコピー数の抗原によって、ヒト細胞の分離・同定を達成することを目指した。

ヒト直交性酵素として *Enterobacter asburiae* 由来のβ-キシロシダーゼ、蛍光性基質としてフルオレセインβ-D-キシロピラノシドを用い、water-in-oil液滴中での酵素反応性を評価した。フッ素系の油相を用い、On-chip Droplet Generatorにより、酵素と蛍光性基質を内包した液滴(直径40μm)を作製した。この液滴をインキュベートし、酵素反応を促進させることで、蛍光シグナル強度の変化を評価した。

液滴中に0.1nMの酵素と10μMの蛍光性基質を内包されたとき、蛍光シグナルの時間依存的な増加を確認した。このとき、1つの液滴に2,000分子のβ-キシロシダーゼが存在することになる。したがって、少なくとも2,000コピーの低発現の抗原を検出できることが示唆された。



図1 細胞膜タンパク質に基づいた一細胞分析

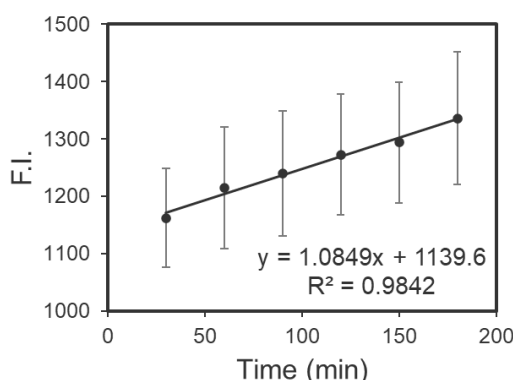


図2 微小液滴における蛍光強度の経時変化

1. R. Kaneko, *et al.*, BUNSEKI KAGAKU. 71, 3, 101–107 (2022)

DNA-nano-tweezers バイオセンシング分子スプレー法による 固体表面上の標的核酸直接検出

○重松怜志・波多野浩也・石田文典・池田丈・廣田隆一・黒田章夫・舟橋久景（広島大学）

Direct detection of target nucleic acids on a solid surface by spraying DNA-nano-tweezers biosensing molecule.
(Hiroshima University) SHIGEMATSU, Reiji; HATANO, Hiroya; ISHIDA, Takenori; IKEDA, Takeshi; HIROTA, Ryuichi; KURODA, Akio; FUNABASHI, Hisakage

COVID-19 のパンデミックにより、ウイルスや病原体などを検出する簡便な方法の開発が多数行われるようになった。これらの方法のほとんどは、サンプリングによって標的を採取し、水溶液中に抽出してから、種々のアッセイ法によって検出を行う。したがって、接触感染などによる感染拡大が懸念される、固体表面上の標的を検出する場合には、固体表面上の標的を拭き取り、それを水溶液中に抽出する必要がある。しかし、拭き取り作業は、単に操作が煩雑であるというだけでなく、固体表面上のどの位置にどの程度の量が存在したか、など標的に関する多くの重要な情報が失われてしまう。したがって、固体表面上の標的を直接検出する新しい方法を開発することが重要である。そこで本研究では、「標的を認識したときにのみ検出しやすいシグナルを産生するバイオセンシング分子」をスプレー噴霧し、イメージングにより固体表面上の標的を直接検出する新しいアッセイ法を提案する。

本研究では、当研究室で開発した DNA ナノ・ピンセット構造体バイオセンシング分子 (DNA-NT) を利用する⁽¹⁾⁽²⁾。DNA-NT は、標的核酸を認識すると、開いた状態から閉じた状態へと構造を変化させ、ヘミンを補酵素としてペルオキシダーゼ活性を示す (Figure 1)。そこで、この DNA-NT を固体表面へスプレー噴霧

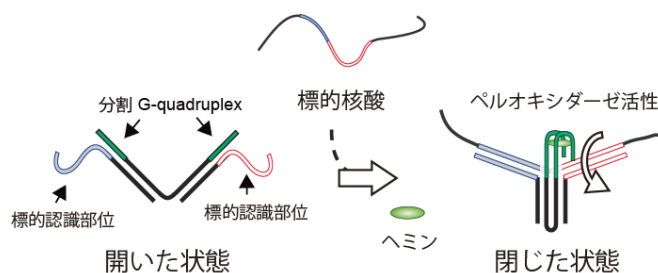


Figure 1. DNA-NT の原理

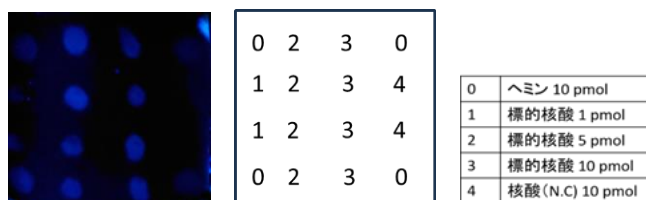


Figure 2. スマートフォンによって撮影した、DNA-NT スプレー後の発光イメージ

すれば、標的核酸が存在する箇所だけ DNA-NT がペルオキシダーゼ活性を示すと期待される。標的核酸、ポジティブコントロールとしてルミノールの発光反応を触媒する高濃度ヘミン、ネガティブコントロールとして今回用いる DNA-NT が認識しない核酸を濾紙上にスポットし、乾燥させた。DNA-NT とヘミンをエアークンプレッサーによって噴霧した。10 分後、エアークンプレッサーによってルミノール溶液をさらに噴霧し、直ちに暗箱内でスマートフォンを用いて写真撮影を行った。その結果、標的核酸をスポットした場所からルミノール発光が観察され、ネガティブコントロールの核酸をスポットした場所からは発光が観察されなかった (Figure 2)。以上の結果から、DNA-NT、シグナル産生基質をスプレーの後、スマートフォンを用いて撮影することによって、固体表面上の標的をイメージングにより直接検出する新しいアッセイ法のプラットフォーム開発に成功した。

- 1) K. Nakatsuka, *et. al.*, *Biosensors and Bioelectronics*, **74**, 222-226 (2015)
- 2) H. Funabashi, *et. al.*, *Sensors and Materials*, **34**, 3093-3100 (2022)