

2024年9月13日(金)

## ポスター会場

ポスター発表 | 2P-01～2P-109

## ポスター発表

10:40 ～ 12:20 ポスター会場 (多目的ホール)

## [2P-01] HOIP-PUBドメインに対する高感度 monobodyの開発

\*坂井 聖晟<sup>1</sup>、真辺 諄<sup>2</sup>、門場 啓一郎<sup>2</sup>、藤野 公茂<sup>1</sup>、林 剛介<sup>1</sup>、森信 暁雄<sup>2</sup>、岩井 一宏<sup>3</sup>、村上 裕<sup>1</sup> (1. 名大院工、2. 京大院医リウマチ・臨床免疫学、3. 京大院医分子細胞生理学)

## [2P-02] タンパク質構造データを用いた機械学習による合理的な酵素工手法の提案

\*湯沢 哲至<sup>1</sup> (1. 東京農工大工学部生命工学科)

## [2P-03] 自動ドッキングに基づく新規抗ウイルス剤であるシアル酸アナログの脱保護のためのカルボキシルエステラーゼの選択

\*ニランジニ アラガッパン<sup>1</sup>、クリストファー ヴァヴリッカ<sup>1</sup>、清田 洋正<sup>2</sup> (1. 東京農工大学 工学部生命工学科、2. 岡山大学 環境生命自然科学学域)

## [2P-04] PNA足場ペプチド連結反応を用いたタンパク質化学合成

\*鈴木 沙依<sup>1</sup>、水嶋 真吾<sup>1</sup>、竹内 優紀乃<sup>1</sup>、林 剛介<sup>1</sup>、村上 裕<sup>1,2</sup> (1. 名古屋大学、2. 名大 ナノライフシステム研究所)

## [2P-05] ヒンジループ改変ヒトシクロムcの2量体構築とその細胞内発現

\*太田 ことり<sup>1</sup>、藤原 綱大<sup>1</sup>、真島 剛史<sup>1</sup>、小林 直也<sup>1</sup>、金井 賢一<sup>1</sup>、松井 貴輝<sup>1</sup>、別所 康全<sup>1</sup>、廣田 俊<sup>1</sup> (1. 奈良先端科学技術大学院大学)

## [2P-06] 赤色蛍光を示す可逆的タンパク質ラベル化プローブの開発

\*大谷 奈々<sup>1</sup>、蓑島 維文<sup>1</sup>、菊地 和也<sup>1,2</sup> (1. 大阪大学大学院工学研究科、2. 大阪大学大学院免疫フロンティア研究センター)

## [2P-07] 天然・転写 tRNAを用いた Ser/Leu交換翻訳系の高収率化

\*東長田 泰斗<sup>1</sup>、藤野 公茂<sup>1</sup>、園田 凌吾<sup>1</sup>、三城 恵美<sup>2</sup>、加納 圭子<sup>2</sup>、村上 裕<sup>1,3</sup> (1. 名古屋大学工学研究科、2. 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所、3. 名古屋大学未来社会創造機構ナノライフシステム研究所)

## [2P-08] 拮抗薬とムスカリン受容体の複合体の構造情報に基づいた光応答性リガンドの開発

\*水野 愛香<sup>1</sup>、堂浦 智裕<sup>1</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院工学研究科)

[2P-09] 光応答性リガンドを用いたアデノシン A<sub>2A</sub>受容体選択的な活性化

\*鈴木 啓文<sup>1</sup>、松葉 佑弥<sup>1</sup>、堂浦 智裕<sup>1</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学工学研究科)

## [2P-10] 金属触媒と酵素触媒を利用した重水素導入ヌクレオシドの合成

\*古賀 麻由璃<sup>1</sup>、幡野 明彦<sup>1</sup> (1. 芝浦工業大学大学院理工学研究科材料工学専攻)

## [2P-11] 繊維状タンパク質の末端重合による超巨大人工生体分子集合体の創製

\*長谷 彩沙<sup>1</sup>、南畑 孝介<sup>1</sup>、石川 聖人<sup>2</sup>、吉本 将悟<sup>3</sup>、堀 克敏<sup>3</sup>、神谷 典穂<sup>1,4</sup> (1. 九州大学大学院工学府、2. 長浜バイオ大学、3. 名古屋大学大学院工学研究科、4. 九州大学未来化学センター)

## [2P-12] スプリットタンパク質プローブを用いた DNA修復 fociのプロテオミクス解析法の開発

\*八塚 研治<sup>1</sup>、伊藤 海児<sup>1</sup>、渡邊 愛梨<sup>1</sup>、深田 梨沙子<sup>1</sup>、田代 有輝<sup>1</sup>、金岡 英徳<sup>2</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 愛知工業大学工学部)

## [2P-13] AMPA受容体の迅速かつ可逆的な可視化を目指した蛍光標識リガンドの開発

\*中川 満結<sup>1</sup>、曽我 恭平<sup>1</sup>、Hansel Adriel<sup>2</sup>、柴田 晃大<sup>1</sup>、藤原 孝彰<sup>2</sup>、南後 恵理子<sup>2,3</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学工学研究科、2. 東北大学多元物質科学研究所、3. 理研 Spring-8)

## [2P-14] MBD融合蛍光タンパク質と MBD融合ルシ

フェラーゼを用いたゲノム DNAメチル化頻度測定法

\*庄司 悠人<sup>1</sup>、池田 優乃<sup>2</sup>、林 理恵<sup>1</sup>、田中 祐圭<sup>3</sup>、吉田 亘<sup>1,2</sup> (1. 東京工科大学院バイオニクス、2. 東京工科大学応用生物、3. 東京工業大学物質理工)

## [2P-15] 蛍光修飾メチル化プローブ DNAと MBD融合ルシ

フェラーゼを用いた CpGメチル化頻度測定法

\*早川 貴寛<sup>1</sup>、黒田 直希<sup>1</sup>、荒川 貴博<sup>2</sup>、須磨岡 淳<sup>2</sup>、吉田 亘<sup>1</sup> (1. 東京工科大学院バイオニクス、2. 東京工科大学院サステナブル工学)

## [2P-16] DNA修復 fociを選択的に可視化する新規蛍光タン

パク質プローブを用いた動態解析

\*伊藤 海児<sup>1</sup>、八塚 研治<sup>1</sup>、渡邊 愛梨<sup>1</sup>、深田 梨沙子<sup>1</sup>、田代 優輝<sup>1</sup>、金岡 英徳<sup>2</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 愛知工業大学工学部)

## [2P-17] 代謝型グルタミン酸受容体1型の生理機能解明を目指した非侵襲的な in vivoケモジェネティック制御法の開発

\*近藤 匠<sup>1</sup>、堂浦 智裕<sup>1</sup>、山崎 友照<sup>2</sup>、藤永 雅之<sup>2</sup>、張 明栄<sup>2</sup>、掛川 渉<sup>3</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院工学研究

科、2. 量子科学技術研究開発機構、3. 慶応義塾大医)

[2P-18] 重合可能な細菌性ナノファイバータンパク質の設計と構築

\*横江 優来<sup>1</sup>、杉本 梨緒<sup>1</sup>、南畑 孝介<sup>2</sup>、吉本 将悟<sup>3</sup>、堀 克敏<sup>3</sup>、神谷 典穂<sup>2,4</sup>、石川 聖人<sup>1</sup> (1. 長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科、2. 九大院・工、3. 名大院・工、4. 九大未来化学創造センター)

[2P-19] 人工細胞バイオフィルムの創出に向けたプログラム可能な凝集性リポソーム

\*杉本 梨緒<sup>1</sup>、横江 優来<sup>1</sup>、吉本 将悟<sup>2</sup>、堀 克敏<sup>2</sup>、石川 聖人<sup>1</sup> (1. 長浜バイオ大院・バイオ、2. 名大院・工)

[2P-20] ヒスチジンの触媒作用を利用した化学・位置選択的セリン修飾法の開発

\*増井 綾香<sup>1</sup>、笠原 彰友<sup>2</sup>、山次 健三<sup>2</sup> (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究院)

[2P-21] 3Dドメインスワッピングで多量化する抗体軽鎖可変領域の探索と多量化への銅イオンの影響

\*酒井 隆裕<sup>1</sup>、山口 将平<sup>1</sup>、真島 剛史<sup>1</sup>、小林 直也<sup>1</sup>、段 練<sup>2</sup>、藤木 涼<sup>2</sup>、Kowit Hengphasatporn<sup>2</sup>、重田 育照<sup>2</sup>、緒方 英明<sup>3</sup>、一二三 恵美<sup>4</sup>、宇田 泰三<sup>5</sup>、廣田 俊<sup>1</sup> (1. 奈良先端大・先端科技、2. 筑波大・計算科学研究センター、3. 兵庫県大・院理、4. 大分大・研究マネジメント機構、5. 九州先端研・ナノテク)

[2P-22] Artificial metabolic pathways in DNA origami-based compartments

\*Peng Lin<sup>1</sup>, Hui Yang<sup>2</sup>, Eiji Nakata<sup>1</sup>, Takashi Morii<sup>1,3</sup> (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 2. Graduate School of Energy Science, Kyoto University, 3. Department of Health and Nutrition, Kyoto Koka Women's University)

[2P-23] 自律的な膜増殖によって進化する人工細胞の構築に向けてー膜合成系におけるリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼの探索ー

\*瀬尾 海渡<sup>1</sup>、Longo Liam<sup>1</sup>、松浦 友亮<sup>1</sup> (1. 東京工業大学 地球生命研究所)

[2P-24] 微小ゲルビーズを人工区画として利用する架橋酵素選抜系の構築

\*折田 兼成<sup>1</sup>、古賀 大晴<sup>1</sup>、大川 優生<sup>1</sup>、伊藤 智之<sup>3</sup>、南畑 孝介<sup>1</sup>、梅津 光央<sup>3</sup>、神谷 典穂<sup>1,2</sup> (1. 九州大学大学院工学研究院、2. 九州大学未来化学創造センター、3. 東北大学工学研究科)

[2P-25] 抗原テンプレート反応におけるリンカー部分の影響

\*秋葉 宏樹<sup>1,2</sup>、西山 健太郎<sup>1</sup>、鎌田 春彦<sup>1,2</sup>、大野 浩章<sup>1,2</sup> (1. 京都大学大学院薬学研究科、2. 医薬基盤・健康・栄養研究所)

[2P-26] リボソームディスプレイ法によるエンドセリン受容

体 B型の熱安定性変異体の探索

\*西垣 遥<sup>1</sup>、村田 武士<sup>2</sup>、安田 賢司<sup>2</sup>、福永 圭佑<sup>3</sup>、松浦 友亮<sup>3</sup> (1. 東京工業大学生命理工学院、2. 千葉大学院理理学部、3. 東京工業大学地球生命研究所)

[2P-27] チロシン残基人工糖修飾によるアミロイドβの凝集性変化

樋口 凜<sup>1</sup>、中根 啓太<sup>1</sup>、菊池 智子<sup>1</sup>、安田 早緒理<sup>1</sup>、池ノ上 達哉<sup>2</sup>、佐藤 伸一<sup>1,3</sup>、\*友重 秀介<sup>1</sup>、石川 稔<sup>1</sup> (1. 東北大院生命、2. 東大院理、3. 東北大学際研)

[2P-28] ポリスチレン系樹脂担持型カルコゲン化合物による酸化的タンパク質フォールディングの加速

\*西沢 優也<sup>1</sup>、荒井 堅太<sup>2,1</sup> (1. 東海大学大学院理学研究科、2. 東海大学先進生命科学研究所)

[2P-29] マルチサブユニット型 CRISPR-Casシステムの細胞内会合制御機構の解析とその応用の可能性

\*野村 渉<sup>1,2</sup>、木野 晴揮<sup>1</sup>、榎村 青央空<sup>1</sup>、濁川 清美<sup>1,2</sup> (1. 広島大学大学院医系科学研究科、2. 広島大学薬学部)

[2P-30] PLP-oxidaseの変異体を用いた6-chloroindole-3-acetic acidの生合成のための基盤作成

\*塩浦 徳幸<sup>1</sup>、湯沢 哲至<sup>1</sup>、ヴァヴリッカ クリストファー<sup>1</sup> (1. 東京農工大学工学部生命工学科)

[2P-31] RNA脱メチル化酵素 FTOのアスコルビン酸依存的な阻害剤

田中 和無<sup>1</sup>、西岡 栞李<sup>2</sup>、田井 章博<sup>3</sup>、二木 史朗<sup>1</sup>、\* 今西 未来<sup>1</sup> (1. 京都大学化学研究所、2. 徳島大学大学院創生化学、3. 徳島大学大学院社会産業理工)

[2P-32] GlcN- GlcNAc, GlcNAc- GlcN間ヘテログリコシド結合に対して反応特異性を有するキトサナーゼ活性部位の構築

\*小島 摩利子<sup>1</sup>、Mehdi Davari<sup>2</sup>、小野田 晃<sup>1</sup> (1. 北海道大学、2. ライプニッツ植物科学研究所)

[2P-33] 転写因子 Sp1の zinc finger構造を検出する蛍光タンパク質型バイオセンサーの構築

\*田嶋 竣介<sup>1</sup>、中田 栄司<sup>2</sup>、森井 孝<sup>2,3</sup>、桑原 淳<sup>1</sup> (1. 同志社女子大学薬学部、2. 京大エネ研、3. 京都光華女子大学健康科学部)

[2P-34] 新しいPQQ依存性脱水素酵素の発現系の構築と活性評価

\*市川 明葉<sup>1</sup> (1. 東京農工大学工学府)

[2P-35] ONOO<sup>-</sup>応答性タンパク質ラベル化剤の開発とConditional Proteomicsへの応用

\*宇野 寛彬<sup>1</sup>、朱 浩<sup>1</sup>、松葉 恭一<sup>1</sup>、浜地 格<sup>1,2</sup> (1. 京都大学工学研究科、2. JST ERATO)

[2P-36] タンパク質複合体の*in situ*構築による細胞内分子の電顕可視化

\*高嶋 一平<sup>1</sup>、高橋 泰人<sup>1</sup>、齊藤 知恵子<sup>2</sup>、吉川 雅英<sup>2</sup>、水



- 上 進<sup>1</sup> (1. 東北大学多元研、2. 東京大学医学研究科)
- [2P-37] フェロケラターゼ共発現系を用いて作製した  
コバルト置換シクロム P450のキャラクター  
ゼーション  
\*中澤 真優<sup>1</sup>、赤川 絵里<sup>1</sup>、澤田 真希<sup>1</sup>、武田 康太<sup>2</sup>、藤井  
敏司<sup>3</sup>、養王田 正文<sup>1</sup>、中村 暢文<sup>1</sup> (1. 東京農工大学大学  
院工学府、2. 産総研、3. 甲南大学フロンティアサイエン  
ス学部)
- [2P-38] 遺伝子ノックインと細胞膜局在性リガンドを用いた  
分裂酵母の内在性タンパク質の細胞膜局在化および  
細胞機能操作  
\*中村 彰伸<sup>1,2</sup>、後藤 祐平<sup>2,3</sup>、杉山 博紀<sup>2,4</sup>、築地 真也<sup>5</sup>、青木 一洋<sup>2,3</sup> (1. 産業技術総合研究所 バイオメディカ  
ル研究部門、2. 自然科学研究機構 生命創成探究セン  
ター (ExCELLS)、3. 京都大学 大学院生命科学研究科、4.  
東京大学 大学院工学研究科、5. 名古屋工業大学 大学院工  
学研究科)
- [2P-39] 可逆的光架橋を利用したプリン塩基への架橋反応の  
高速化  
\*藤岡 啓<sup>1</sup>、平原 令偉<sup>1</sup>、莫 峻凌<sup>1</sup>、藤本 健造<sup>1</sup> (1. 北陸先  
端科学技術大学院大学 バイオ機能医工学研究領域)
- [2P-40] グアニン四重鎖を安定化する  
Dehydroevodiamine誘導体の創製  
\*馬 悦<sup>1</sup>、小山田 知輝<sup>2</sup>、影近 弘之<sup>2</sup> (1. 東京医科歯科大  
学リサーチコアセンター、2. 東京医科歯科大学生体材料  
工学研究所)
- [2P-41] 化学的な鋳型合成におけるキラな核酸の重要性  
\*沖田 ひかり<sup>1</sup>、村山 恵司<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>1</sup> (1. 名古屋大学  
工学研究科)
- [2P-42] 非環状型核酸を基にした新規環状型人工核酸へのホ  
スホロジアミデート結合の導入  
\*柴田 珠花<sup>1</sup>、村山 恵司<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>1</sup> (1. 名古屋大学)
- [2P-43] Histidine-Cd<sup>2+</sup>錯体を用いた人工核酸 L-aTNAの非  
酵素的ライゲーション反応の解析  
\*別所 弘麻<sup>1</sup>、村山 恵司<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>1</sup> (1. 名古屋大学工  
学研究科生命分子工学専攻)
- [2P-44] 四重鎖 DNAを内包した人工ウイルスキャプシドの  
創製  
\*石井 菜乃<sup>1</sup>、稲葉 央<sup>1</sup>、遠藤 玉樹<sup>2</sup>、建石 寿枝<sup>2</sup>、杉本  
直己<sup>2</sup>、松浦 和則<sup>1</sup> (1. 鳥取大院工、2. 甲南大FIBER)
- [2P-45] フェニルアゾチアゾール基を導入した光応答性人工  
核酸の合成と遺伝子制御  
\*田村 洸樹<sup>1</sup>、西原 達哉<sup>1</sup>、田邊 一仁<sup>1</sup> (1. 青山学院大学  
理工学研究科生命科学コース)
- [2P-46] 酸化損傷塩基の修復機構解明を指向した光増感剤修  
飾プラスミド DNAの開発
- \*小澤 雅史<sup>1</sup>、金森 功史<sup>1</sup>、河添 好孝<sup>2</sup>、杜 瑤瑤<sup>1</sup>、吉田  
七唯<sup>1</sup>、湯浅 英哉<sup>1</sup> (1. 東京工業大学生理理工学院、2.  
九州大学理学研究院)
- [2P-47] Photochemical invasion of long DNA duplex  
using artificial nucleic acid probes for genome  
manipulation  
\*ZUMILA HAILILI<sup>1</sup>, Fujimoto Kenzo<sup>1</sup> (1. Biofunctional  
Medical Engineering Research Area, Japan Advanced  
Institute of Science and Technology)
- [2P-48] 非酵素的な鎖伸長反応を基にした人工核酸の疑似翻  
訳反応の開発  
\*堀田 有輝<sup>1</sup>、沖田 ひかり<sup>1</sup>、村山 恵司<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>1</sup> (1.  
名古屋大学工学研究科)
- [2P-49] ハンマーヘッドリボザイムの酵素反応に関する理論  
的研究  
\*松山 綾夏<sup>1</sup>、田口 真彦<sup>2</sup>、林 重彦<sup>1</sup> (1. 京都大学大学院  
理学研究科、2. 東北大学多元物質科学研究所)
- [2P-50] 塩基修飾におけるリンカーアーム構造が DNAポリ  
メラーゼ反応の効率に及ぼす影響  
\*片岡 由佳<sup>1</sup>、永谷 恵梨佳<sup>1</sup>、星野 秀和<sup>2</sup>、笠原 勇矢<sup>2,3</sup>、小比賀 聡<sup>3,4</sup>、兼原 正靖<sup>1</sup> (1. 日本大学大学院総合基  
礎科学研究科、2. 医薬基盤・健康・栄養研究所、3. 大阪  
大学大学院薬学研究科、4. 大阪大学先端学際研究機  
構)
- [2P-51] 光架橋性ペプチド核酸による新規光駆動型ゲノム編  
集技術の開発  
\*中尾 樹希<sup>1</sup>、三瓶 悠<sup>1</sup>、松崎 有修<sup>1</sup>、駒野 淳<sup>2</sup>、柴田 淳史<sup>3</sup>、山本 剛史<sup>1</sup>、堂野 主税<sup>4</sup>、和田 健彦<sup>5</sup>、山吉 麻子<sup>1,6</sup>  
(1. 長崎大院医歯薬、2. 大阪医科薬科大薬、3. 慶応義塾  
大学薬学部、4. 大阪大産研、5. 東北大多元研、6. 東工大  
生命理工)
- [2P-52] 分子クラウディング環境に応答するグアニン四重鎖  
形成領域のゲノムワイドスクリーニング  
\*遠藤 玉樹<sup>1,2</sup>、奥田 修二郎<sup>3</sup>、凌 一葦<sup>3</sup>、建石 寿枝<sup>1,2</sup>、杉  
本 直己<sup>2</sup> (1. 甲南大学FIRST、2. 甲南大学FIBER、3.  
新潟大学医学部)
- [2P-53] ニトロベンジル基修飾 DNAオリゴマーの低酸素細  
胞蓄積特性  
\*金山 愛里<sup>1</sup>、前原 大悟<sup>1</sup>、西原 達哉<sup>1</sup>、田邊 一仁<sup>1</sup> (1.  
青山学院大学大学院理工学研究科)
- [2P-54] 液-液相分離における DNAトポロジーの効果  
\*千田 隆誠<sup>1</sup>、田立 ののか<sup>2</sup>、文屋 諒太郎<sup>2</sup>、田代 竜<sup>3</sup>、大  
吉 崇文<sup>1,2,4,5</sup> (1. 静岡大学大学院総合科学技術研究  
科、2. 静岡大学理学部化学科、3. 鈴鹿医療科学大学薬学  
部、4. 静岡大学創造科学技術大学院、5. 静岡大学グ  
リーン科学技術研究所)

- [2P-55] Terminal Deoxynucleotidyl Transferaseを用いた長鎖ポリヌクレオチドの作製とその生化学的応用  
\*川本 明穂<sup>1</sup>、中村 光伸<sup>1</sup>、高田 忠雄<sup>1</sup> (1. 兵庫県立大学大学院工学研究科)
- [2P-56] In droplet実験進化による GFP模倣型蛍光 RNAアプタマーの機能構造相関の解析と性能向上変異体の創成  
\*油屋 紫乃<sup>1</sup> (1. 富山大学大学院医薬理工学環)
- [2P-57] テロメラーゼ活性阻害を志向した光架橋性核酸の開発  
\*西川 梨沙<sup>1</sup>、小畑 健太郎<sup>1</sup>、松原 一稀<sup>1</sup>、松尾 和哉<sup>1</sup>、和久 友則<sup>1</sup>、小堀 哲生<sup>1</sup> (1. 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)
- [2P-58] Synthesis and applications of DNA scaffolded sensor to detect wide-range pH and cathepsin activity  
\*Mashal Asif<sup>1</sup>, Eiji Nakata<sup>1,2</sup>, Peng Lin<sup>1,2</sup>, Morii Takashi<sup>3</sup> (1. Graduate school of Energy Science, Kyoto University, 2. Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 3. Faculty of Health Science, Kyoto Koka Women's University, Japan)
- [2P-59] パラレル型グアニン四重鎖構造のループに CG配列を導入した免疫活性化 CpGオリゴデオキシヌクレオチドの特性  
\*山崎 智彦<sup>1,2</sup>、PATHAK Soumitra<sup>1,2</sup>、百武 篤也<sup>3</sup>、池袋 一典<sup>4</sup> (1. 物質・材料研究機構高分子・バイオ材料研究センター、2. 北海道大学大学院生命科学院、3. 筑波大学数理物質系化学域、4. 東京農工大学大学院工学研究科)
- [2P-60] 次世代型核酸医薬を用いた標的遺伝子発現量の調節  
\*松本 愛優<sup>1</sup>、勝田 陽介<sup>1,2</sup>、木田 朋輝<sup>1</sup>、佐藤 慎一<sup>1,2</sup>、北村 裕介<sup>1</sup>、井原 敏博<sup>1</sup> (1. 熊本大学大学院先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio)
- [2P-61] シクロスポリン Aの主鎖アミドN-メチル化様式が受動的膜透過性に与える影響の研究  
\*菅野 紀希<sup>1</sup>、小野 高広<sup>1</sup>、上田 卓見<sup>2,3</sup>、竹内 恒<sup>3</sup>、森本 淳平<sup>1</sup>、山東 信介<sup>1</sup> (1. 東京大学工学系研究科、2. 大阪大学薬学研究科、3. 東京大学薬学系研究科)
- [2P-62] RGG配列をベースとした環状ペプチドの構造と G4 結合性  
\*山口 朋也<sup>1</sup>、藤本 和久<sup>1</sup>、長門石 暁<sup>2</sup>、津本 浩平<sup>2</sup>、阪本 知樹<sup>3</sup>、山置 佑大<sup>3</sup>、永田 崇<sup>3</sup>、片平 正人<sup>3</sup>、柴田 奈津希<sup>4</sup>、大吉 崇文<sup>4,5,6</sup> (1. 九州産業大学生命科学部、2. 東大院工、3. 京大エネ理工、4. 静大院理、5. 静大院創造、6. 静大グリーン研)
- [2P-63] FRETプローブで標識したペプチドヘテロダイマーの細胞内挙動の解析  
\*田中 かれん<sup>1</sup>、山崎 正幸<sup>2</sup>、富崎 欣也<sup>1</sup> (1. 龍谷大学先端理工学部、2. 龍谷大学農学部)
- [2P-64] 鉄イオン結合部位を有するペプチド三量体を架橋ユニットに用いたハイドロゲルの開発  
\*阪本 彩音<sup>1</sup>、日高 由梨<sup>1</sup>、池田 拓末<sup>1</sup>、大洞 光司<sup>1</sup>、林 高史<sup>1</sup> (1. 大阪大学大学院工学研究科)
- [2P-65] N末端に Hisタグを組み込んだコラーゲンモデルペプチドの合成と性質  
\*神田 ららほ<sup>1</sup>、富崎 欣也<sup>1</sup> (1. 龍谷大学)
- [2P-66] 触媒三残基を擁する環状ペプチド型人工加水分解酵素の開発  
\*秋山 脩斗<sup>1</sup>、笠原 彰友<sup>2</sup>、山次 健三<sup>2</sup> (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究科)
- [2P-67] アゾベンゼン導入環状 Tau由来ペプチドによる微小管構造制御  
\*立石 万保子<sup>1</sup>、稲葉 央<sup>1</sup>、角五 彰<sup>2</sup>、松浦 和則<sup>1</sup> (1. 鳥取大学大学院工学部、2. 京都大学大学院理学部)
- [2P-68] Tau由来ペプチド二量体による微小管安定化  
\*早川 優衣<sup>1</sup>、稲葉 央<sup>1</sup>、角五 彰<sup>2</sup>、松浦 和則<sup>1</sup> (1. 鳥取大院工、2. 京大院理)
- [2P-69] 浮揚液滴を活用した SARS-CoV-2外殻タンパク質結合性ペプチドのセレクション  
\*川井 麻那歌<sup>1</sup>、佐藤 智典<sup>1</sup>、松原 輝彦<sup>1</sup>、鈴木 寧々<sup>1</sup> (1. 慶應義塾大学理工学部)
- [2P-70] 除去可能ステープリングによるペプチドの構造・機能制御  
\*土岐 優介<sup>1</sup>、小澤 英知<sup>1</sup>、林 剛介<sup>1</sup>、村上 裕<sup>1,2</sup> (1. 名古屋大学工学研究科、2. 名古屋大学未来社会創造機構ナノライフシステム研究所)
- [2P-71] 植物を光酸化ストレスから保護する葉緑体標的型抗酸化ペプチドの設計  
\*宮本 昂明<sup>1</sup>、沼田 圭司<sup>1,2,3</sup> (1. 理化学研究所バイオ高分子研究チーム、2. 京都大学大学院工学研究科、3. 慶応大学先端生命科学研究科)
- [2P-72] ポリフェノール化合物 Clovamideのアミロイドポリペプチド凝集制御および神経細胞保護効果  
\*繁森 英幸<sup>1,2</sup>、角田 達彦<sup>3</sup>、野本 悌吾<sup>3</sup>、藤井 七彩<sup>3</sup>、池本 光志<sup>4</sup>、宮前 友策<sup>1</sup> (1. 筑波大学生命環境系、2. 筑波大学微生物サステナビリティ研究センター、3. 筑波大学大学院理工情報生命学術院、4. 筑波大学体育系)
- [2P-73] 架橋位置をスイッチング可能な新規 DNA光クロスリンク法の開発  
\*武貞 龍<sup>1</sup>、小田井 柊也<sup>1</sup>、MO Junling<sup>1</sup>、藤本 健造<sup>1</sup> (1. (北陸先端科学技術大学院大、バイオ機能医工学研究領域)
- [2P-74] ペプチド超分子の水素結合ユニットの改変による細

## 胞内取り込みの高効率化

\*藤原 裕大<sup>1</sup>、若林 里衣<sup>1</sup>、神谷 典穂<sup>1</sup>、後藤 雅宏<sup>1</sup> (1. 九州大学大学院工学府)

[2P-75] ペプチド内包巨大リポソームを用いたリン酸カルシウム生成の顕微鏡観察

\*松本 翔太<sup>1</sup>、越山 友美<sup>1</sup> (1. 立命館大院生命科)

[2P-76] トリペプチドの抗酸化活性に関わる量子化学的分子記述子

\*宮地 輝光<sup>1</sup> (1. 東京工業大学物質理工学院)

[2P-77] アジド修飾ゼラチン/アジド修飾ヒアルロン酸と水溶性歪みジインからなる複合ヒドロゲルへの生細胞封入ゲルの作製

\*細川 紀代香<sup>1</sup>、佐藤 史也<sup>1</sup>、エルナンデス パニアグア リリアナ アレハンドラ<sup>1</sup>、稲垣 奈都子<sup>2</sup>、伊藤 大知<sup>2</sup>、吉野 大輔<sup>1</sup>、寺 正行<sup>1</sup> (1. 東京農工大学工学府、2. 東京大学大学院)

[2P-78] グルコース修飾 turn-on型蛍光プローブを用いた細胞イメージング

\*定井 佑樹<sup>1</sup>、金森 功吏<sup>1</sup>、飛田 飛田健司<sup>1</sup>、能城 地洋<sup>1</sup>、小倉 俊一郎<sup>1</sup>、湯浅 英哉<sup>1</sup> (1. 東京工業大学生命理工学院)

[2P-79] Oil-in-Water (O/W) エマルション界面を安定化する酵素反応性ペプチド集合体の探索とワクチンへの応用

\*樋口 亜也斗<sup>1</sup>、若林 里衣<sup>1</sup>、後藤 雅宏<sup>1,2</sup>、神谷 典穂<sup>1,2</sup> (1. 九州大学工学府、2. 未来化学創造センター)

[2P-80] Deep Cancer Cell Spheroids Delivery of Antisense Oligonucleotide by Peptide Amphiphiles

\*Ingram Tan<sup>1</sup>、Rie Wakabayashi<sup>1</sup>、Noriho Kamiya<sup>1,2</sup>、Masahiro Goto<sup>1,2</sup> (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)

[2P-81] DNA Origami法のDDSへの応用を指向した薬剤内包 DNA Origamiデンドリマーの抗がん活性評価

\*谷本 晃一<sup>1</sup>、南出 悠貴<sup>1</sup>、橋本 穂亜<sup>1</sup>、田中 喜基<sup>1</sup>、真野 祐樹<sup>1</sup>、葛谷 明紀<sup>1</sup> (1. 関西大化学生命工)

[2P-82] ホルムアルデヒド耐性を有する *Pseudomonas* sp.の単離とホルムアルデヒドジスミターゼ活性評価

\*渡久地 格生<sup>1</sup>、小林 茉穂<sup>1</sup>、関 篤也<sup>1</sup>、小寺 南渡<sup>1</sup>、加藤 紀弘<sup>1</sup>、奈須野 恵理<sup>1</sup> (1. 宇都宮大学大学院地域創生研究科)

[2P-83] 上皮成長因子受容体を標的とした局在性ゲフィチニブの合成と阻害活性評価

\*三田村 啓史<sup>1</sup>、筒井 啓太<sup>1</sup>、吉川 優<sup>1</sup>、築地 真也<sup>1</sup> (1.

名古屋工業大学大学院工学研究科工学専攻)

[2P-84] ゼラチン/アルギン酸カルシウム混合ゲルの物性測定と細胞接着性の評価

\*西 航輝<sup>1</sup>、森 英樹<sup>1</sup>、原 正之<sup>1</sup> (1. 大阪公立大学大学院理学研究科生物化学専攻)

[2P-85] 老化細胞選択性を付与した遺伝子指向性ケージドアニソマイシンの設計と合成

\*朝倉 麟太郎<sup>1</sup>、古田 寿昭<sup>1</sup> (1. 東邦大学理学部)

[2P-86] 機能性部位を導入できる Clickableケージド化合物の設計と合成

\*中居 猛秀<sup>1</sup>、古田 寿昭<sup>1</sup>、佐藤 創<sup>1</sup> (1. 東邦大学理学部)

[2P-87] 凝集/解離によるプテリン型蛍光 off/onプローブの開発

\*中井 咲輝<sup>1</sup>、河合 靖<sup>1</sup> (1. 長浜バイオ大学大学院)

[2P-88] 膜酵素αグルコシダーゼの活性を調節する1-デオキシノジリマイシン集積ポリロタキサンの開発

\*天満 裕太<sup>1</sup>、幡野 明彦<sup>2</sup> (1. 芝浦工業大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻、2. 芝浦工業大学大学院 理工学研究科 材料工学専攻)

[2P-89] シクロデキストリンの特異的な色素取り込みを利用した蛍光標識抗体の効率的な作製法

\*山口 浩靖<sup>1,2</sup>、岩井 悠馬<sup>1</sup> (1. 大阪大学大学院理学研究科、2. 大阪大学大学院理学研究科附属フォアフロント研究センター)

[2P-90] 細胞間情報伝達分子の捕捉による *Bacillus subtilis* のクオラムセンシング阻害効果

\*赤塚 夏芽<sup>1</sup>、牛島 成実<sup>2</sup>、奈須野 恵理<sup>2</sup>、加藤 紀弘<sup>2</sup> (1. 宇都宮大学工学部、2. 宇都宮大学大学院地域創生科学研究科)

[2P-91] 臨床薬を用いたセロトニン5-HT<sub>2A</sub>受容体の細胞種直交的な化学遺伝学的制御法の開発

\*井上 始<sup>1</sup>、堂浦 智裕<sup>1</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院工学研究科)

[2P-92] 単一蛍光タンパク質を用いた新規グルコースセンサーの開発

\*玉川 建和<sup>1</sup>、針尾 紗彩<sup>1</sup>、寺井 琢也<sup>1</sup>、キャンベル ロバート<sup>1</sup> (1. 東京大学大学院理学研究科化学専攻)

[2P-93] ヒドロキシ化合物による励起状態分子間プロトン移動反応の制御

\*黄 榮耘<sup>1</sup>、西村 賢宣<sup>1</sup> (1. 筑波大学)

[2P-94] An efficient affinity maturation method for antibody-like proteins by using CRISPR/dCas9 system

\*MingYao Yan<sup>1</sup>、Ryusei Matsuo<sup>2</sup>、Tomoshige FUJINO<sup>1</sup>、Gosuke HAYASHI<sup>1</sup>、Hiroshi MURAKAMI<sup>1,2</sup> (1.

Graduate School of Engineering, Nagoya University,  
2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of  
Innovation for Future Society, Nagoya University)

[2P-95] ロイシン・イソロイシンのラベル化反応と  
HPLC電気化学分析の迅速化

\*横山 憲二<sup>1</sup>、丹羽 史佳<sup>1</sup>、上原 亜久理<sup>1</sup>、上村 英大<sup>1</sup> (1.  
東京工科大学応用生物学部)

[2P-96] シ<sup>+</sup>ヘ<sup>+</sup>フ<sup>+</sup>チ<sup>+</sup>ト<sup>+</sup>ライ<sup>+</sup>ブ<sup>+</sup>ラ<sup>+</sup>リーを用いた疾患特  
異的酵素活性の探索と超偏 極分子イメージ<sup>+</sup>シ<sup>+</sup>ク<sup>+</sup>  
への応用

\*有村 恵維<sup>1</sup>、Elhelaly Abdelazim<sup>2</sup>、明田 悠希<sup>1</sup>、兵藤  
文紀<sup>2</sup>、松尾 政之<sup>2</sup>、大澤 毅<sup>1</sup>、小松 徹<sup>3</sup>、浦野 泰照<sup>3,4</sup>、齋  
藤 雄太郎<sup>1</sup>、山東 信介<sup>1</sup> (1. 東京大学工学系研究科、2.  
岐阜大学医学部、3. 東京大学薬学系研究科、4. 東京大学  
医学系研究科)

[2P-97] ファージ提示法によって得られたペプチドを修飾し  
たシリカ微粒子による SARS-CoV-2検出法の開発

\*森村 和花葉<sup>1</sup>、川井 麻那歌<sup>1</sup>、鈴木 寧々<sup>1</sup>、佐藤 智典<sup>1</sup>、  
松原 輝彦<sup>1</sup> (1. 慶應義塾大学理工学部)

[2P-98] 低分子抗体と4量体酵素の融合による4価抗体酵素  
複合体の開発と電気化学イムノセンシングへの応用  
織田 美帆<sup>1</sup>、\*徐 千茗<sup>2</sup>、平賀 健太郎<sup>3</sup>、早出 広司<sup>4</sup>、津川  
若子<sup>1</sup>、池袋 一典<sup>1</sup>、浅野 竜太郎<sup>1</sup> (1. 東京農工大学大学  
院工学府、2. 東京農工大学工学部、3. 自然機構E  
xCELLS、4. UNC/NCSU共同生命医工)

[2P-99] 電位依存性カリウムチャネル阻害剤を用いた  
N2aアッセイにおけるシガトキシンの高感度検出  
横関 俊昭<sup>1,2</sup>、川畑 まどか<sup>1</sup>、藤田 和弘<sup>2</sup>、平間 正博<sup>1</sup>、\*  
円谷 健<sup>1</sup> (1. 大阪公立大学大学院理学研究科生物化学専  
攻、2. 日本食品分析センター研究開発部)

[2P-100] ATPセンサー蛍光タンパク質 QUEENと白金ポル  
フィリンの発光寿命測定による細胞内 ATP・酸素  
濃度デュアルイメージング

\*藤原 優也<sup>1</sup>、尾台 俊亮<sup>1</sup>、伊藤 栄紘<sup>1</sup>、蒲池 利章<sup>1</sup> (1.  
東京工業大学生命理工学院)

[2P-101] 金ナノ材料の特異な電気化学特性を用いたバイオ  
センサ開発

\*大崎 脩仁<sup>1,2</sup>、民谷 栄一<sup>1,2</sup> (1. 産業技術総合研究所  
先端フォトバイオラボ、2. 大阪大学 産業科学研究所)

[2P-102] 無標識・低侵襲な多点同時ラマン分光分析による  
細胞・薬剤スクリーニング

\*畔堂 一樹<sup>1,2</sup>、Liao Hao-Xiang<sup>2</sup>、Li Menglu<sup>1,2</sup>、藤田  
克昌<sup>2,1</sup> (1. 産業技術総合研究所、2. 大阪大学)

[2P-103] 細胞の表現系に基づくハイスループット薬剤スク  
リーニング：ヒト直交性酵素を用いる多色 cell-  
ELISAの開発

\*平川 琉偉<sup>1</sup>、金子 諒右<sup>2</sup>、立石 宙也<sup>1</sup>、古賀 朗寛<sup>1</sup>、細  
川 尊夏<sup>1</sup>、加隈 綾晟<sup>1</sup>、谷戸 謙太<sup>1</sup>、山中 皓太<sup>1</sup>、新居  
輝樹<sup>2</sup>、岸村 顕広<sup>2,3</sup>、森 健<sup>2</sup>、片山 佳樹<sup>2,3</sup> (1. 九州大  
学システム生命科学府、2. 九州大学工学府、3. 九州大  
学システム科学センター)

[2P-104] ルテニウム-オスミウム連結錯体を鋳型特異的に  
形成脱離する新規 DNAプローブの合成とその核酸  
分析への応用

\*境 ちひろ<sup>1</sup>、成住 凌<sup>1</sup>、北村 裕介<sup>1</sup>、勝田 陽介<sup>1</sup>、井原  
敏博<sup>1</sup> (1. 熊本大学大学院先端科学研究部)

[2P-105] SolutionDesignerDBによる実験自動化の試み

\*酒井 雄介<sup>1</sup> (1. 理化学研究所生命機能科学研究セン  
ター)

[2P-106] キノコのアレロケミカルに関する研究

高校生参加企画 \*松本 花奈<sup>1</sup>、三枝 拓<sup>1,2</sup> (1. 茗溪学園高、2. 筑波大  
院)

[2P-107] チョコレート投与時のナルコレプシー様症状誘発  
高校生参加企画 に関する研究

\*小林 袈乃<sup>1</sup>、三枝 拓<sup>1,2</sup> (1. 茗溪学園高、2. 筑波大  
院)

[2P-108] 挿し木の成功率を上げるために ～光の波長と発  
高校生参加企画 根の関係について～

\*福田 百合野<sup>1</sup> (1. 茨城県立並木中等教育学校)

[2P-109] アレロケミカルと細胞周期の関係

高校生参加企画 \*渋谷 悠太<sup>1</sup>、石原 大馳<sup>1</sup> (1. 茨城県立並木中等教育学  
校)

ポスター発表 | 2P-01~2P-109

## ポスター発表

2024年9月13日(金) 10:40 ~ 12:20 ポスター会場 (多目的ホール)

- [2P-01] HOIP-PUBドメインに対する高感度 monobodyの開発  
\*坂井 聖晟<sup>1</sup>、真辺 諄<sup>2</sup>、門場 啓一郎<sup>2</sup>、藤野 公茂<sup>1</sup>、林 剛介<sup>1</sup>、森信 暁雄<sup>2</sup>、岩井 一宏<sup>3</sup>、村上 裕<sup>1</sup>  
(1. 名大院工、2. 京大院医リウマチ・臨床免疫学、3. 京大院医分子細胞生理学)
- [2P-02] タンパク質構造データを用いた機械学習による合理的な酵素工学法の提案  
\*湯沢 哲至<sup>1</sup> (1. 東京農工大工学部生命工学科)
- [2P-03] 自動ドッキングに基づく新規抗ウイルス剤であるシアル酸アナログの脱保護のためのカルボキシルエステラーゼの選択  
\*ニランジニ アラガッパン<sup>1</sup>、クリストファー ヴァヴリッカ<sup>1</sup>、清田 洋正<sup>2</sup> (1. 東京農工大学 工学部生命工学科、2. 岡山大学 環境生命自然科学学域)
- [2P-04] PNA足場ペプチド連結反応を用いたタンパク質化学合成  
\*鈴木 沙依<sup>1</sup>、水嶋 真吾<sup>1</sup>、竹内 優紀乃<sup>1</sup>、林 剛介<sup>1</sup>、村上 裕<sup>1,2</sup> (1. 名古屋大学、2. 名大 ナノライフシステム研究所)
- [2P-05] ヒンジループ改変ヒトシクロムcの2量体構築とその細胞内発現  
\*太田 ことり<sup>1</sup>、藤原 綱大<sup>1</sup>、真島 剛史<sup>1</sup>、小林 直也<sup>1</sup>、金井 賢一<sup>1</sup>、松井 貴輝<sup>1</sup>、別所 康全<sup>1</sup>、廣田 俊<sup>1</sup> (1. 奈良先端科学技術大学院大学)
- [2P-06] 赤色蛍光を示す可逆的タンパク質ラベル化プローブの開発  
\*大谷 奈々<sup>1</sup>、蓑島 維文<sup>1</sup>、菊地 和也<sup>1,2</sup> (1. 大阪大学大学院工学研究科、2. 大阪大学大学院免疫フロンティア研究センター)
- [2P-07] 天然・転写 tRNAを用いた Ser/Leu交換翻訳系の高収率化  
\*東長田 泰斗<sup>1</sup>、藤野 公茂<sup>1</sup>、園田 凌吾<sup>1</sup>、三城 恵美<sup>2</sup>、加納 圭子<sup>2</sup>、村上 裕<sup>1,3</sup> (1. 名古屋大学工学研究科、2. 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所、3. 名古屋大学未来社会創造機構ナノライフシステム研究所)
- [2P-08] 拮抗薬とムスカリン受容体の複合体の構造情報に基づいた光応答性リカントの開発  
\*水野 愛香<sup>1</sup>、堂浦 智裕<sup>1</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院工学研究科)
- [2P-09] 光応答性リガンドを用いたアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体選択的な活性化  
\*鈴木 啓文<sup>1</sup>、松葉 佑弥<sup>1</sup>、堂浦 智裕<sup>1</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学工学研究科)
- [2P-10] 金属触媒と酵素触媒を利用した重水素導入ヌクレオシドの合成  
\*古賀 麻由璃<sup>1</sup>、幡野 明彦<sup>1</sup> (1. 芝浦工業大学大学院理工学研究科材料工学専攻)
- [2P-11] 繊維状タンパク質の末端重合による超巨大人工生体分子集合体の創製  
\*長谷 彩沙<sup>1</sup>、南畑 孝介<sup>1</sup>、石川 聖人<sup>2</sup>、吉本 将悟<sup>3</sup>、堀 克敏<sup>3</sup>、神谷 典穂<sup>1,4</sup> (1. 九州大学大学院工学府、2. 長浜バイオ大学、3. 名古屋大学大学院工学研究科、4. 九州大学未来化学センター)
- [2P-12] スプリットタンパク質プローブを用いた DNA修復 fociのプロテオミクス解析法の開発  
\*八塚 研治<sup>1</sup>、伊藤 海兎<sup>1</sup>、渡邊 愛梨<sup>1</sup>、深田 梨沙子<sup>1</sup>、田代 有輝<sup>1</sup>、金岡 英徳<sup>2</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 愛知工業大学工学部)
- [2P-13] AMPA受容体の迅速かつ可逆的な可視化を目指した蛍光標識リガンドの開発  
\*中川 満結<sup>1</sup>、曾我 恭平<sup>1</sup>、Hansel Adriel<sup>2</sup>、柴田 晃大<sup>1</sup>、藤原 孝彰<sup>2</sup>、南後 恵理子<sup>2,3</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup>  
(1. 名古屋大学工学研究科、2. 東北大学多元物質科学研究所、3. 理研Spring-8)
- [2P-14] MBD融合蛍光タンパク質と MBD融合ルシフェラーゼを用いたゲノム DNAメチル化頻度測定法

- \*庄司 悠人<sup>1</sup>、池田 優乃<sup>2</sup>、林 理恵<sup>1</sup>、田中 祐圭<sup>3</sup>、吉田 亘<sup>1,2</sup> (1. 東京工科大学大学院バイオニクス、2. 東京工科大学応用生物、3. 東京工業大学物質理工学院)
- [2P-15] 蛍光修飾メチル化プローブ DNAと MBD融合ルシフェラーゼを用いた CpGメチル化頻度測定法  
\*早川 貴寛<sup>1</sup>、黒田 直希<sup>1</sup>、荒川 貴博<sup>2</sup>、須磨岡 淳<sup>2</sup>、吉田 亘<sup>1</sup> (1. 東京工科大学大学院バイオニクス、2. 東京工科大学大学院サステナブル工学)
- [2P-16] DNA修復 fociを選択的に可視化する新規蛍光タンパク質プローブを用いた動態解析  
\*伊藤 海児<sup>1</sup>、八塚 研治<sup>1</sup>、渡邊 愛梨<sup>1</sup>、深田 梨沙子<sup>1</sup>、田代 優輝<sup>1</sup>、金岡 英徳<sup>2</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院 工学研究科、2. 愛知工業大学工学部)
- [2P-17] 代謝型グルタミン酸受容体1型の生理機能解明を目指した非侵襲的な in vivoケモジェネティック制御法の開発  
\*近藤 匠<sup>1</sup>、堂浦 智裕<sup>1</sup>、山崎 友照<sup>2</sup>、藤永 雅之<sup>2</sup>、張 明栄<sup>2</sup>、掛川 渉<sup>3</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院工学研究科、2. 量子科学技術研究開発機構、3. 慶応義塾大医)
- [2P-18] 重合可能な細菌性ナノファイバータンパク質の設計と構築  
\*横江 優来<sup>1</sup>、杉本 梨緒<sup>1</sup>、南畑 孝介<sup>2</sup>、吉本 将悟<sup>3</sup>、堀 克敏<sup>3</sup>、神谷 典穂<sup>2,4</sup>、石川 聖人<sup>1</sup> (1. 長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科、2. 九大院・工、3. 名大院・工、4. 九大未来化学創造センター)
- [2P-19] 人工細胞バイオフィルムの創出に向けたプログラム可能な凝集性リポソーム  
\*杉本 梨緒<sup>1</sup>、横江 優来<sup>1</sup>、吉本 将悟<sup>2</sup>、堀 克敏<sup>2</sup>、石川 聖人<sup>1</sup> (1. 長浜バイオ大院・バイオ、2. 名大院・工)
- [2P-20] ヒスチジンの触媒作用を利用した化学・位置選択的セリン修飾法の開発  
\*増井 綾香<sup>1</sup>、笠原 彰友<sup>2</sup>、山次 健三<sup>2</sup> (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究院)
- [2P-21] 3Dドメインスワッピングで多量化する抗体軽鎖可変領域の探索と多量化への銅イオンの影響  
\*酒井 隆裕<sup>1</sup>、山口 将平<sup>1</sup>、真島 剛史<sup>1</sup>、小林 直也<sup>1</sup>、段 練<sup>2</sup>、藤木 涼<sup>2</sup>、Kowit Hengphasatporn<sup>2</sup>、重田 育照<sup>2</sup>、緒方 英明<sup>3</sup>、一二三 恵美<sup>4</sup>、宇田 泰三<sup>5</sup>、廣田 俊<sup>1</sup> (1. 奈良先端大・先端科技、2. 筑波大・計算科学研究センター、3. 兵庫県大・院理、4. 大分大・研究マネジメント機構、5. 九州先端研・ナノテク)
- [2P-22] Artificial metabolic pathways in DNA origami-based compartments  
\*Peng Lin<sup>1</sup>, Hui Yang<sup>2</sup>, Eiji Nakata<sup>1</sup>, Takashi Morii<sup>1,3</sup> (1. Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 2. Graduate School of Energy Science, Kyoto University, 3. Department of Health and Nutrition, Kyoto Koka Women's University)
- [2P-23] 自律的な膜増殖によって進化する人工細胞の構築に向けて –膜合成系におけるリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼの探索–  
\*瀬尾 海渡<sup>1</sup>、Longo Liam<sup>1</sup>、松浦 友亮<sup>1</sup> (1. 東京工業大学 地球生命研究所)
- [2P-24] 微小ゲルビーズを人工区画として利用する架橋酵素選抜系の構築  
\*折田 兼成<sup>1</sup>、古賀 大晴<sup>1</sup>、大川 優生<sup>1</sup>、伊藤 智之<sup>3</sup>、南畑 孝介<sup>1</sup>、梅津 光央<sup>3</sup>、神谷 典穂<sup>1,2</sup> (1. 九州大学大学院工学研究院、2. 九州大学未来化学創造センター、3. 東北大学工学研究科)
- [2P-25] 抗原テンプレート反応におけるリンカー部分の影響  
\*秋葉 宏樹<sup>1,2</sup>、西山 健太郎<sup>1</sup>、鎌田 春彦<sup>1,2</sup>、大野 浩章<sup>1,2</sup> (1. 京都大学大学院薬学研究科、2. 医薬基盤・健康・栄養研究所)
- [2P-26] リポソームディスプレイ法によるエンドセリン受容体 B型の熱安定性変異体の探索  
\*西垣 遥<sup>1</sup>、村田 武士<sup>2</sup>、安田 賢司<sup>2</sup>、福永 圭佑<sup>3</sup>、松浦 友亮<sup>3</sup> (1. 東京工業大学生命理工学院、2. 千

葉大学院理学部、3. 東京工業大学地球生命研究所)

[2P-27] チロシン残基人工糖修飾によるアミロイドβの凝集性変化

樋口 凛<sup>1</sup>、中根 啓太<sup>1</sup>、菊池 智子<sup>1</sup>、安田 早緒理<sup>1</sup>、池ノ上 達哉<sup>2</sup>、佐藤 伸一<sup>1,3</sup>、\*友重 秀介<sup>1</sup>、石川 稔<sup>1</sup> (1. 東北大院生命、2. 東大院理、3. 東北大学際研)

[2P-28] ポリスチレン系樹脂担持型カルコゲン化合物による酸化的タンパク質フォールディングの加速

\*西沢 優也<sup>1</sup>、荒井 堅太<sup>2,1</sup> (1. 東海大学大学院理学研究科、2. 東海大学先進生命科学研究科)

[2P-29] マルチサブユニット型 CRISPR-Casシステムの細胞内会合制御機構の解析とその応用の可能性

\*野村 渉<sup>1,2</sup>、木野 晴揮<sup>1</sup>、樺村 青央空<sup>1</sup>、濁川 清美<sup>1,2</sup> (1. 広島大学大学院医系科学研究科、2. 広島大学薬学部)

[2P-30] PLP-oxidaseの変異体を用いた6-chloroindole-3-acetic acidの生合成のための基盤作成

\*塩浦 徳幸<sup>1</sup>、湯沢 哲至<sup>1</sup>、ヴァヴリッカ クリストファー<sup>1</sup> (1. 東京農工大学工学部生命工学科)

[2P-31] RNA脱メチル化酵素 FTOのアスコルビン酸依存的な阻害剤

田中 和無爲<sup>1</sup>、西岡 栞李<sup>2</sup>、田井 章博<sup>3</sup>、二木 史朗<sup>1</sup>、\*今西 未来<sup>1</sup> (1. 京都大学化学研究所、2. 徳島大学大学院創生化学、3. 徳島大学大学院社会産業理工)

[2P-32] GlcN- GlcNAc, GlcNAc- GlcN間ヘテログリコシド結合に対して反応特異性を有するキトサナーゼ活性部位の構築

\*小島 摩利子<sup>1</sup>、Mehdi Davari<sup>2</sup>、小野田 晃<sup>1</sup> (1. 北海道大学、2. ライプニッツ植物科学研究所)

[2P-33] 転写因子 Sp1の zinc finger構造を検出する蛍光タンパク質型バイオセンサーの構築

\*田嶋 竣介<sup>1</sup>、中田 栄司<sup>2</sup>、森井 孝<sup>2,3</sup>、桑原 淳<sup>1</sup> (1. 同志社女子大学薬学部、2. 京大エネ研、3. 京都光華女子大学健康科学部)

[2P-34] 新しいPQQ依存性脱水素酵素の発現系の構築と活性評価

\*市川 明葉<sup>1</sup> (1. 東京農工大学工学府)

[2P-35] ONOO<sup>-</sup>応答性タンパク質ラベル化剤の開発と Conditional Proteomicsへの応用

\*宇野 寛彬<sup>1</sup>、朱 浩<sup>1</sup>、松葉 恭一<sup>1</sup>、浜地 格<sup>1,2</sup> (1. 京都大学工学研究科、2. JST ERATO)

[2P-36] タンパク質複合体の*in situ*構築による細胞内分子の電顕可視化

\*高嶋 一平<sup>1</sup>、高橋 泰人<sup>1</sup>、齊藤 知恵子<sup>2</sup>、吉川 雅英<sup>2</sup>、水上 進<sup>1</sup> (1. 東北大学多元研、2. 東京大学医学研究科)

[2P-37] フェロケラターゼ共発現系を用いて作製したコバルト置換シトクロム P450のキャラクタリゼーション

\*中澤 真優<sup>1</sup>、赤川 絵里<sup>1</sup>、澤田 真希<sup>1</sup>、武田 康太<sup>2</sup>、藤井 敏司<sup>3</sup>、養王田 正文<sup>1</sup>、中村 暢文<sup>1</sup> (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 産総研、3. 甲南大学フロンティアサイエンス学部)

[2P-38] 遺伝子ノックインと細胞膜局在性リガンドを用いた分裂酵母の内在性タンパク質の細胞膜局在化および細胞機能操作

\*中村 彰伸<sup>1,2</sup>、後藤 祐平<sup>2,3</sup>、杉山 博紀<sup>2,4</sup>、築地 真也<sup>5</sup>、青木 一洋<sup>2,3</sup> (1. 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門、2. 自然科学研究機構 生命創成探究センター (ExCELLS)、3. 京都大学 大学院生命科学研究科、4. 東京大学 大学院工学研究科、5. 名古屋工業大学 大学院工学研究科)

[2P-39] 可逆的光架橋を利用したプリン塩基への架橋反応の高速化

\*藤岡 啓<sup>1</sup>、平原 令偉<sup>1</sup>、莫 峻凌<sup>1</sup>、藤本 健造<sup>1</sup> (1. 北陸先端科学技術大学院大学 バイオ機能医工学研究領域)

- [2P-40] グアニン四重鎖を安定化する Dehydroevodiamine誘導体の創製  
\*馬 悦<sup>1</sup>、小山田 知輝<sup>2</sup>、影近 弘之<sup>2</sup> (1. 東京医科歯科大学リサーチコアセンター、2. 東京医科歯科大学生体材料工学研究所)
- [2P-41] 化学的な鋳型合成におけるキラルな核酸の重要性  
\*沖田 ひかり<sup>1</sup>、村山 恵司<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>1</sup> (1. 名古屋大学 工学研究科)
- [2P-42] 非環状型核酸を基にした新規環状型人工核酸へのホスホロジアミデート結合の導入  
\*柴田 珠花<sup>1</sup>、村山 恵司<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>1</sup> (1. 名古屋大学)
- [2P-43] Histidine-Cd<sup>2+</sup>錯体を用いた人工核酸 L-aTNAの非酵素的ライゲーション反応の解析  
\*別所 弘麻<sup>1</sup>、村山 恵司<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>1</sup> (1. 名古屋大学工学研究科生命分子工学専攻)
- [2P-44] 四重鎖 DNAを内包した人工ウィルスキャプシドの創製  
\*石井 楽乃<sup>1</sup>、稲葉 央<sup>1</sup>、遠藤 玉樹<sup>2</sup>、建石 寿枝<sup>2</sup>、杉本 直己<sup>2</sup>、松浦 和則<sup>1</sup> (1. 鳥取大院工、2. 甲南大FIBER)
- [2P-45] フェニルアゾチアゾール基を導入した光応答性人工核酸の合成と遺伝子制御  
\*田村 光樹<sup>1</sup>、西原 達哉<sup>1</sup>、田邊 一仁<sup>1</sup> (1. 青山学院大学理工学研究科生命科学コース)
- [2P-46] 酸化損傷塩基の修復機構解明を指向した光増感剤修飾プラスミド DNAの開発  
\*小澤 雅史<sup>1</sup>、金森 功史<sup>1</sup>、河添 好孝<sup>2</sup>、杜 瑶瑶<sup>1</sup>、吉田 七唯<sup>1</sup>、湯浅 英哉<sup>1</sup> (1. 東京工業大学生命理工学院、2. 九州大学理学研究院)
- [2P-47] Photochemical invasion of long DNA duplex using artificial nucleic acid probes for genome manipulation  
\*ZUMILA HAILILI<sup>1</sup>, Fujimoto Kenzo<sup>1</sup> (1. Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology)
- [2P-48] 非酵素的な鎖伸長反応を基にした人工核酸の疑似翻訳反応の開発  
\*堀田 有輝<sup>1</sup>、沖田 ひかり<sup>1</sup>、村山 恵司<sup>1</sup>、浅沼 浩之<sup>1</sup> (1. 名古屋大学工学研究科)
- [2P-49] ハンマーヘッドリボザイムの酵素反応に関する理論的研究  
\*松山 綾夏<sup>1</sup>、田口 真彦<sup>2</sup>、林 重彦<sup>1</sup> (1. 京都大学大学院理学研究科、2. 東北大学多元物質科学研究所)
- [2P-50] 塩基修飾におけるリンカーアーム構造が DNAポリメラーゼ反応の効率に及ぼす影響  
\*片岡 由佳<sup>1</sup>、永谷 恵梨佳<sup>1</sup>、星野 秀和<sup>2</sup>、笠原 勇矢<sup>2,3</sup>、小比賀 聡<sup>3,4</sup>、柴原 正靖<sup>1</sup> (1. 日本大学大学院総合基礎科学研究科、2. 医薬基盤・健康・栄養研究所、3. 大阪大学大学院薬学研究科、4. 大阪大学先導的学際研究機構)
- [2P-51] 光架橋性ペプチド核酸による新規光駆動型ゲノム編集技術の開発  
\*中尾 樹希<sup>1</sup>、三瓶 悠<sup>1</sup>、松崎 有修<sup>1</sup>、駒野 淳<sup>2</sup>、柴田 淳史<sup>3</sup>、山本 剛史<sup>1</sup>、堂野 主税<sup>4</sup>、和田 健彦<sup>5</sup>、山吉 麻子<sup>1,6</sup> (1. 長崎大院医歯薬、2. 大阪医科薬科大薬、3. 慶応義塾大学薬学部、4. 大阪大産研、5. 東北大多元研、6. 東工大生命理工)
- [2P-52] 分子クラウディング環境に応答するグアニン四重鎖形成領域のゲノムワイドスクリーニング  
\*遠藤 玉樹<sup>1,2</sup>、奥田 修二郎<sup>3</sup>、凌 一葦<sup>3</sup>、建石 寿枝<sup>1,2</sup>、杉本 直己<sup>2</sup> (1. 甲南大学FIRST、2. 甲南大学FIBER、3. 新潟大学医学部)
- [2P-53] ニトロベンジル基修飾 DNAオリゴマーの低酸素細胞蓄積特性  
\*金山 愛里<sup>1</sup>、前原 大悟<sup>1</sup>、西原 達哉<sup>1</sup>、田邊 一仁<sup>1</sup> (1. 青山学院大学大学院理工学研究科)
- [2P-54] 液-液相分離における DNAトポロジーの効果  
\*千田 隆誠<sup>1</sup>、田立 ののか<sup>2</sup>、文屋 諒太郎<sup>2</sup>、田代 竜<sup>3</sup>、大吉 崇文<sup>1,2,4,5</sup> (1. 静岡大学大学院総合科学



技術研究科、2. 静岡大学理学部化学科、3. 鈴鹿医療科学大学薬学部、4. 静岡大学創造科学技術大学院、5. 静岡大学グリーン科学技術研究所)

- [2P-55] Terminal Deoxynucleotidyl Transferaseを用いた長鎖ポリヌクレオチドの作製とその生化学的応用

\*川本 明穂<sup>1</sup>、中村 光伸<sup>1</sup>、高田 忠雄<sup>1</sup> (1. 兵庫県立大学大学院工学研究科)

- [2P-56] In droplet実験進化による GFP模倣型蛍光 RNAアプタマーの機能構造相関の解析と性能向上変異体の創成

\*油屋 紫乃<sup>1</sup> (1. 富山大学大学院医薬理工学環)

- [2P-57] テロメラーゼ活性阻害を志向した光架橋性核酸の開発

\*西川 梨沙<sup>1</sup>、小畑 健太郎<sup>1</sup>、松原 一稀<sup>1</sup>、松尾 和哉<sup>1</sup>、和久 友則<sup>1</sup>、小堀 哲生<sup>1</sup> (1. 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科)

- [2P-58] Synthesis and applications of DNA scaffolded sensor to detect wide-range pH and cathepsin activity

\*Mashal Asif<sup>1</sup>, Eiji Nakata<sup>1,2</sup>, Peng Lin<sup>1,2</sup>, Morii Takashi<sup>3</sup> (1. Graduate school of Energy Science, Kyoto University, 2. Institute of Advanced Energy, Kyoto University, 3. Faculty of Health Science, Kyoto Koka Women's University, Japan)

- [2P-59] パラレル型グアニン四重鎖構造のループに CG配列を導入した免疫活性化 CpGオリゴデオキシヌクレオチドの特性

\*山崎 智彦<sup>1,2</sup>、PATHAK Soumitra<sup>1,2</sup>、百武 篤也<sup>3</sup>、池袋 一典<sup>4</sup> (1. 物質・材料研究機構高分子・バイオ材料研究センター、2. 北海道大学大学院生命科学院、3. 筑波大学数理物質系化学域、4. 東京農工大学大学院工学研究科)

- [2P-60] 次世代型核酸医薬を用いた標的遺伝子発現量の調節

\*松本 愛優<sup>1</sup>、勝田 陽介<sup>1,2</sup>、木田 朋輝<sup>1</sup>、佐藤 慎一<sup>1,2</sup>、北村 裕介<sup>1</sup>、井原 敏博<sup>1</sup> (1. 熊本大学大学院先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio)

- [2P-61] シクロスポリン Aの主鎖アミドN-メチル化様式が受動的膜透過性に与える影響の研究

\*菅野 紀希<sup>1</sup>、小野 高広<sup>1</sup>、上田 卓見<sup>2,3</sup>、竹内 恒<sup>3</sup>、森本 淳平<sup>1</sup>、山東 信介<sup>1</sup> (1. 東京大学工学系研究科、2. 大阪大学薬学研究科、3. 東京大学薬学系研究科)

- [2P-62] RGG配列をベースとした環状ペプチドの構造と G4 結合性

\*山口 朋也<sup>1</sup>、藤本 和久<sup>1</sup>、長門石 暁<sup>2</sup>、津本 浩平<sup>2</sup>、阪本 知樹<sup>3</sup>、山置 佑大<sup>3</sup>、永田 崇<sup>3</sup>、片平 正人<sup>3</sup>、柴田 奈津希<sup>4</sup>、大吉 崇文<sup>4,5,6</sup> (1. 九州産業大学生命科学部、2. 東大院工、3. 京大工ネ理工、4. 静大院理、5. 静大院創造、6. 静大グリーン研)

- [2P-63] FRETプローブで標識したペプチドヘテロダイマーの細胞内挙動の解析

\*田中 かれん<sup>1</sup>、山崎 正幸<sup>2</sup>、富崎 欣也<sup>1</sup> (1. 龍谷大学先端理工学部、2. 龍谷大学農学部)

- [2P-64] 鉄イオン結合部位を有するペプチド三量体を架橋ユニットに用いたハイドロゲルの開発

\*阪本 彩音<sup>1</sup>、日高 由梨<sup>1</sup>、池田 拓未<sup>1</sup>、大洞 光司<sup>1</sup>、林 高史<sup>1</sup> (1. 大阪大学大学院工学研究科)

- [2P-65] N末端に Hisタグを組み込んだコラーゲンモデルペプチドの合成と性質

\*神田 ららほ<sup>1</sup>、富崎 欣也<sup>1</sup> (1. 龍谷大学)

- [2P-66] 触媒三残基を擁する環状ペプチド型人工加水分解酵素の開発

\*秋山 脩斗<sup>1</sup>、笠原 彰友<sup>2</sup>、山次 健三<sup>2</sup> (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究院)

- [2P-67] アゾベンゼン導入環状 Tau由来ペプチドによる微小管構造制御

\*立石 万保子<sup>1</sup>、稲葉 央<sup>1</sup>、角五 彰<sup>2</sup>、松浦 和則<sup>1</sup> (1. 鳥取大学大学院工学部、2. 京都大学大学院理学部)

- [2P-68] Tau由来ペプチド二量体による微小管安定化  
\*早川 優衣<sup>1</sup>、稲葉 央<sup>1</sup>、角五 彰<sup>2</sup>、松浦 和則<sup>1</sup> (1. 鳥取大院工、2. 京大院理)
- [2P-69] 浮揚液滴を活用した SARS-CoV-2外殻タンパク質結合性ペプチドのセレクト  
ション  
\*川井 麻那歌<sup>1</sup>、佐藤 智典<sup>1</sup>、松原 輝彦<sup>1</sup>、鈴木 寧々<sup>1</sup> (1. 慶應義塾大学理工学部)
- [2P-70] 除去可能ステープリングによるペプチドの構造・機能制御  
\*土岐 優介<sup>1</sup>、小澤 英知<sup>1</sup>、林 剛介<sup>1</sup>、村上 裕<sup>1,2</sup> (1. 名古屋大学工学研究科、2. 名古屋大学未来社会創造機構ナノライフシステム研究所)
- [2P-71] 植物を光酸化ストレスから保護する葉緑体標的型抗酸化ペプチドの設計  
\*宮本 昂明<sup>1</sup>、沼田 圭司<sup>1,2,3</sup> (1. 理化学研究所バイオ高分子研究チーム、2. 京都大学大学院工学研究科、3. 慶応大学先端生命科学研究科)
- [2P-72] ポリフェノール化合物 Clovamideのアミロイドポリペプチド凝集制御および神経細胞保護効果  
\*繁森 英幸<sup>1,2</sup>、角田 達彦<sup>3</sup>、野本 悌吾<sup>3</sup>、藤井 七彩<sup>3</sup>、池本 光志<sup>4</sup>、宮前 友策<sup>1</sup> (1. 筑波大学生命環境系、2. 筑波大学微生物サステナビリティ研究センター、3. 筑波大学大学院理工情報生命学術院、4. 筑波大学体育系)
- [2P-73] 架橋位置をスイッチング可能な新規 DNA光クロスリンク法の開発  
\*武貞 龍<sup>1</sup>、小田井 柊也<sup>1</sup>、MO Junling<sup>1</sup>、藤本 健造<sup>1</sup> (1. (北陸先端科学技術大学院大、バイオ機能医工学研究領域)
- [2P-74] ペプチド超分子の水素結合ユニットの改変による細胞内取り込みの高効率化  
\*藤原 裕大<sup>1</sup>、若林 里衣<sup>1</sup>、神谷 典穂<sup>1</sup>、後藤 雅宏<sup>1</sup> (1. 九州大学大学院工学府)
- [2P-75] ペプチド内包巨大リポソームを用いたリン酸カルシウム生成の顕微鏡観察  
\*松本 翔太<sup>1</sup>、越山 友美<sup>1</sup> (1. 立命館大院生命科)
- [2P-76] トリペプチドの抗酸化活性に関わる量子化学的分子記述子  
\*宮地 輝光<sup>1</sup> (1. 東京工業大学物質理工学院)
- [2P-77] アジド修飾ゼラチン/アジド修飾ヒアルロン酸と水溶性歪みジインからなる複合ヒドロゲルへの生細胞封入ゲルの作製  
\*細川 紀代香<sup>1</sup>、佐藤 史也<sup>1</sup>、エルナンデス パニアグア リリアナ アレハンドラ<sup>1</sup>、稲垣 奈都子<sup>2</sup>、伊藤 大知<sup>2</sup>、吉野 大輔<sup>1</sup>、寺 正行<sup>1</sup> (1. 東京農工大学工学府、2. 東京大学大学院)
- [2P-78] グルコース修飾 turn-on型蛍光プローブを用いた細胞イメージング  
\*定井 佑樹<sup>1</sup>、金森 功史<sup>1</sup>、飛田 飛田健司<sup>1</sup>、能城 地洋<sup>1</sup>、小倉 俊一郎<sup>1</sup>、湯浅 英哉<sup>1</sup> (1. 東京工業大学生命理工学院)
- [2P-79] Oil-in-Water (O/W) エマルション界面を安定化する酵素反応性ペプチド集合体の探索とワクチンへの応用  
\*樋口 亜也斗<sup>1</sup>、若林 里衣<sup>1</sup>、後藤 雅宏<sup>1,2</sup>、神谷 典穂<sup>1,2</sup> (1. 九州大学工学府、2. 未来化学創造センター)
- [2P-80] Deep Cancer Cell Spheroids Delivery of Antisense Oligonucleotide by Peptide Amphiphiles  
\*Ingram Tan<sup>1</sup>, Rie Wakabayashi<sup>1</sup>, Noriho Kamiya<sup>1,2</sup>, Masahiro Goto<sup>1,2</sup> (1. Faculty of Engineering, Kyushu University, 2. Center for Future Chemistry, Kyushu University)
- [2P-81] DNA Origami法の DDSへの応用を指向した薬剤内包 DNA Origamiデンドリマーの抗がん活性評価  
\*谷本 晃一<sup>1</sup>、南出 悠貴<sup>1</sup>、橋本 毬亜<sup>1</sup>、田中 喜基<sup>1</sup>、真野 祐樹<sup>1</sup>、葛谷 明紀<sup>1</sup> (1. 関西大化学生命工)

- [2P-82] ホルムアルデヒド耐性を有する *Pseudomonas* sp. の単離とホルムアルデヒドジスムターゼ活性評価  
\*渡久地 格生<sup>1</sup>、小林 茉穂<sup>1</sup>、関 篤也<sup>1</sup>、小寺 南渡<sup>1</sup>、加藤 紀弘<sup>1</sup>、奈須野 恵理<sup>1</sup> (1. 宇都宮大学大学院地域創生研究科)
- [2P-83] 上皮成長因子受容体を標的とした局在性ゲフィチニブの合成と阻害活性評価  
\*三田村 啓史<sup>1</sup>、筒井 啓太<sup>1</sup>、吉川 優<sup>1</sup>、築地 真也<sup>1</sup> (1. 名古屋工業大学大学院工学研究科工学専攻)
- [2P-84] ゼラチン/アルギン酸カルシウム混合ゲルの物性測定と細胞接着性の評価  
\*西 航輝<sup>1</sup>、森 英樹<sup>1</sup>、原 正之<sup>1</sup> (1. 大阪公立大学大学院理学研究科生物化学専攻)
- [2P-85] 老化細胞選択性を付与した遺伝子指向性ケージドアニソマイシンの設計と合成  
\*朝倉 麟太郎<sup>1</sup>、古田 寿昭<sup>1</sup> (1. 東邦大学理学部)
- [2P-86] 機能性部位を導入できる Clickable ケージド化合物の設計と合成  
\*中居 猛秀<sup>1</sup>、古田 寿昭<sup>1</sup>、佐藤 創<sup>1</sup> (1. 東邦大学理学部)
- [2P-87] 凝集/解離によるプテリン型蛍光 off/on プロブの開発  
\*中井 咲輝<sup>1</sup>、河合 靖<sup>1</sup> (1. 長浜バイオ大学大学院)
- [2P-88] 膜酵素  $\alpha$  グルコシダーゼの活性を調節する 1-デオキシノジリマイシン集積ポリリタキサンの開発  
\*天満 裕太<sup>1</sup>、幡野 明彦<sup>2</sup> (1. 芝浦工業大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻、2. 芝浦工業大学大学院 理工学研究科 材料工学専攻)
- [2P-89] シクロデキストリンの特異的な色素取り込みを利用した蛍光標識抗体の効率的な作製法  
\*山口 浩靖<sup>1,2</sup>、岩井 悠馬<sup>1</sup> (1. 大阪大学大学院理学研究科、2. 大阪大学大学院理学研究科附属フォアフロント研究センター)
- [2P-90] 細胞間情報伝達分子の捕捉による *Bacillus subtilis* のクオラムセンシング阻害効果  
\*赤塚 夏芽<sup>1</sup>、牛島 成実<sup>2</sup>、奈須野 恵理<sup>2</sup>、加藤 紀弘<sup>2</sup> (1. 宇都宮大学工学部、2. 宇都宮大学大学院地域創生科学研究科)
- [2P-91] 臨床薬を用いたセロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の細胞種直交的な化学遺伝学的制御法の開発  
\*井上 始<sup>1</sup>、堂浦 智裕<sup>1</sup>、清中 茂樹<sup>1</sup> (1. 名古屋大学大学院工学研究科)
- [2P-92] 単一蛍光タンパク質を用いた新規グルコースセンサーの開発  
\*玉川 建和<sup>1</sup>、針尾 紗彩<sup>1</sup>、寺井 琢也<sup>1</sup>、キャンベル ロバート<sup>1</sup> (1. 東京大学大学院理学研究科化学専攻)
- [2P-93] ヒドロキシ化合物による励起状態分子間プロトン移動反応の制御  
\*黄 楽耘<sup>1</sup>、西村 賢宣<sup>1</sup> (1. 筑波大学)
- [2P-94] An efficient affinity maturation method for antibody-like proteins by using CRISPR/dCas9 system  
\*MingYao Yan<sup>1</sup>, Ryusei Matsuo<sup>2</sup>, Tomoshige FUJINO<sup>1</sup>, Gosuke HAYASHI<sup>1</sup>, Hiroshi MURAKAMI<sup>1,2</sup> (1. Graduate School of Engineering, Nagoya University, 2. Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University)
- [2P-95] ロイシン・イソロイシンのラベル化反応と HPLC 電気化学分析の迅速化  
\*横山 憲二<sup>1</sup>、丹羽 史佳<sup>1</sup>、上原 亜久理<sup>1</sup>、上村 英大<sup>1</sup> (1. 東京工科大学応用生物学部)
- [2P-96] シ<sup>+</sup>ヘ<sup>+</sup>フ<sup>+</sup>チト<sup>+</sup>ライブ<sup>+</sup>ラリーを用いた疾患特異的酵素活性の探索と超偏極分子イメージングへの応用  
\*有村 恵維<sup>1</sup>、Elhelaly Abdelazim<sup>2</sup>、明田 悠希<sup>1</sup>、兵藤 文紀<sup>2</sup>、松尾 政之<sup>2</sup>、大澤 毅<sup>1</sup>、小松 徹<sup>3</sup>、浦

野 泰照<sup>3,4</sup>、齋藤 雄太郎<sup>1</sup>、山東 信介<sup>1</sup> (1. 東京大学工学系研究科、2. 岐阜大学医学部、3. 東京大学薬学系研究科、4. 東京大学医学系研究科)

- [2P-97] ファージ提示法によって得られたペプチドを修飾したシリカ微粒子による SARS-CoV-2検出法の開発

\*森村 和花<sup>1</sup>、川井 麻那歌<sup>1</sup>、鈴木 寧々<sup>1</sup>、佐藤 智典<sup>1</sup>、松原 輝彦<sup>1</sup> (1. 慶應義塾大学理工学部)

- [2P-98] 低分子抗体と4量体酵素の融合による4価抗体酵素複合体の開発と電気化学イムノセンシングへの応用

織田 美帆<sup>1</sup>、\*徐 千茗<sup>2</sup>、平賀 健太郎<sup>3</sup>、早出 広司<sup>4</sup>、津川 若子<sup>1</sup>、池袋 一典<sup>1</sup>、浅野 竜太郎<sup>1</sup> (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 東京農工大学工学部、3. 自然機構ExCELLS、4. UNC/NCSU共同生命医工)

- [2P-99] 電位依存性カリウムチャンネル阻害剤を用いた N2aアッセイにおけるシガトキシンの高感度検出

横関 俊昭<sup>1,2</sup>、川畑 まどか<sup>1</sup>、藤田 和弘<sup>2</sup>、平間 正博<sup>1</sup>、\*円谷 健<sup>1</sup> (1. 大阪公立大学大学院理学研究科生物化学専攻、2. 日本食品分析センター研究開発部)

- [2P-100] ATPセンサー蛍光タンパク質 QUEENと白金ポルフィリンの発光寿命測定による細胞内 ATP・酸素濃度デュアルイメージング

\*藤原 優也<sup>1</sup>、尾台 俊亮<sup>1</sup>、伊藤 栄紘<sup>1</sup>、蒲池 利章<sup>1</sup> (1. 東京工業大学生命理工学院)

- [2P-101] 金ナノ材料の特異な電気化学特性を用いたバイオセンサ開発

\*大崎 脩仁<sup>1,2</sup>、民谷 栄一<sup>1,2</sup> (1. 産業技術総合研究所 先端フォトバイオラボ、2. 大阪大学 産業科学研究所)

- [2P-102] 無標識・低侵襲な多点同時ラマン分光分析による細胞・薬剤スクリーニング

\*畔堂 一樹<sup>1,2</sup>、Liao Hao-Xiang<sup>2</sup>、Li Menglu<sup>1,2</sup>、藤田 克昌<sup>2,1</sup> (1. 産業技術総合研究所、2. 大阪大学)

- [2P-103] 細胞の表現系に基づくハイスループット薬剤スクリーニング：ヒト直交性酵素を用いる多色 cell-ELISAの開発

\*平川 琉偉<sup>1</sup>、金子 諒右<sup>2</sup>、立石 宙也<sup>1</sup>、古賀 朗寛<sup>1</sup>、細川 尊夏<sup>1</sup>、加隈 綾晟<sup>1</sup>、谷戸 謙太<sup>1</sup>、山中 皓太<sup>1</sup>、新居 輝樹<sup>2</sup>、岸村 顕広<sup>2,3</sup>、森 健<sup>2</sup>、片山 佳樹<sup>2,3</sup> (1. 九州大学システム生命科学府、2. 九州大学工学府、3. 九州大学システム科学センター)

- [2P-104] ルテニウム-オスミウム連結錯体を鋳型特異的に形成脱離する新規 DNAプローブの合成とその核酸分析への応用

\*境 ちひろ<sup>1</sup>、成住 凌<sup>1</sup>、北村 裕介<sup>1</sup>、勝田 陽介<sup>1</sup>、井原 敏博<sup>1</sup> (1. 熊本大学大学院先端科学研究部)

- [2P-105] SolutionDesignRDBによる実験自動化の試み

\*酒井 雄介<sup>1</sup> (1. 理化学研究所生命機能科学研究センター)

- [2P-106] キノコのアレロケミカルに関する研究

\*松本 花奈<sup>1</sup>、三枝 拓<sup>1,2</sup> (1. 茗溪学園高、2. 筑波大院)

- [2P-107] チョコレート投与時のナルコレプシー様症状誘発に関する研究

\*小林 袈乃<sup>1</sup>、三枝 拓<sup>1,2</sup> (1. 茗溪学園高、2. 筑波大院)

- [2P-108] 挿し木の成功率を上げるために ～光の波長と発根の関係について～

\*福田 百合野<sup>1</sup> (1. 茨城県立並木中等教育学校)

- [2P-109] アレロケミカルと細胞周期の関係

\*渋谷 悠太<sup>1</sup>、石原 大馳<sup>1</sup> (1. 茨城県立並木中等教育学校)

## HOIP-PUB ドメインに対する高感度 monobody の開発

○坂井 聖晟<sup>1</sup>、真辺 諄<sup>2</sup>、門場 啓一郎<sup>2</sup>、藤野 公茂<sup>1</sup>、林 剛介<sup>1</sup>、森信暁雄<sup>2</sup>、岩井 一宏<sup>3</sup>、村上 裕<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名大院工、<sup>2</sup>京大院医リウマチ・臨床免疫学、<sup>3</sup>京大院医分子細胞生理学)

**Development of highly sensitive monobodies targeting the HOIP-PUB domain** (Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Nagoya University<sup>1</sup>, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Kyoto University<sup>2</sup>, Department of Molecular and Cellular Physiology Graduate School of Medicine Kyoto University.<sup>3</sup>) Kiyose Sakai<sup>1</sup>, Atsushi Manabe<sup>2</sup>, Keiichiro Kadoba<sup>2</sup>, Tomoshige Fujino<sup>1</sup>, Gosuke Hayashi<sup>1</sup>, Akio Morinobu<sup>2</sup>, Kazuhiro Iwai<sup>3</sup>, Hiroshi Murakami<sup>1</sup>

HOIL-1L (heme-oxidized IRP2 ligase 1L)、HOIP (HOIL-1L-interacting protein)、SHARPIN (SHANK-associated RH domain-interacting protein) からなる LUBAC (linear ubiquitin assembly complex) によってのみ生成される直鎖状ユビキチン鎖は、NF- $\kappa$ B シグナル伝達の重要な制御因子である<sup>1</sup>。LUBAC 活性の亢進は、全身性エリテマトーデス (SLE) のような自己免疫疾患や癌の発症に関連している<sup>1,2</sup>。実際に、LUBAC 活性は、活性中心を持つ HOIP の発現量で規定されている。従って、本研究では、細胞内の LUBAC の機能を詳細に研究するだけでなく、臨床研究において迅速に SLE 患者と健常者を識別するために、LUBAC の触媒サブユニットである HOIP の PUB (peptide: Nglycanase/UBA or UBX-containing proteins) ドメインに対する monobody<sup>3</sup>を開発した (図 1)。

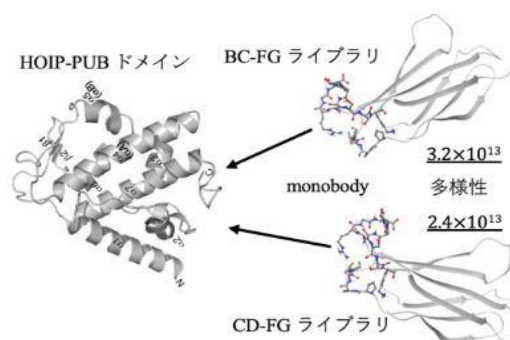


図1:HOIP-PUBドメインに対するmonobodyの選択

まず、monobody の BC ループと FG ループ、CD ループと FG ループの残基を各ランダムにした 2 種類の monobody ライブラリ (BC-FG ライブラリ、CD-FG ライブラリ) を調製した。次に、人工抗体高速創製法である TRAP ディスプレイ<sup>4</sup>を用いて、HOIP-PUB ドメインに強く結合する monobody を選択した。Monobody の選択を 6 ラウンド繰り返した後、回収した cDNA の塩基配列を次世代シーケンサーにより決定した。得られた 20 個を大腸菌で発現し、精製された monobody の速度論的パラメーターをバイオレイヤー干渉法 (BLI) により決定した所、そのうちの 9 個は解離定数が数 nM 以下と標的に強く結合する monobody の取得に成功した。さらに、cytoplasmic FACS 解析を用いて、選択した monobody の一部が細胞 (HEX293T) 内で過剰発現した HOIP や Jurkat T 細胞の HOIP に特異的に強く結合する事を確認した。現在は、患者から採取した PBMC と健常者をさらに明確に見分ける高感度 monobody の開発のために、ヘテロ monobody dimer の開発・monobody の N 末端あるいは C 末端に蛍光色素の多数付与・親和性成熟の 3 点を行っている。Monobody は細胞内タンパク質を解析するツールとして用いられてきたことから、本研究で得られた高感度 monobody は、細胞内 LUBAC のさらなる機能解明に役立つと期待される<sup>5</sup>。

1. Kirisako T., Tokunaga F., Iwai K., EMBO J., (2006);
2. Iwai K., Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci., (2021);
3. Koide A., Koide S., J Mol Biol., (1998);
4. Ishizawa., Murakami H., J Am Chem Soc., (2013);
5. Sha F., Koide S., J Mol Biol., (2023)

## タンパク質構造データを用いた機械学習による合理的な酵素工学法の提案

○湯沢哲至・Vavricka Christopher（農工大生命工学科）

Rational enzyme engineering method by machine learning using protein structure data

(TuAT Dept.Biothechnol.Life Sci.)

YUZAWA Satoshi; Vavricka Christopher John

酵素は生命活動において中心的な役割を果たし、自然界で起こる多くの化学反応や生物学的プロセスを触媒する。中でも cytochrome P450 (P450) と呼ばれる酵素ファミリーは有機合成が困難な化合物の生合成を可能とする有望な酵素として知られており、製薬やポリマー産業において重要な生合成経路かつ有機合成では困難な位置特異的、立体特異的な幅広い化学反応を触媒する。したがって P450 を合理的にエンジニアリングする手法を確立することはバイオ産業の発展を後押しすることが期待される。

我々の研究チームでは機械学習の予測に基づく手法により既存の酵素の反応経路を拡張する新たな酵素の発見に成功したことから、機械学習による予測が生物の機能の向上に繋がるといことが注目されている。従ってより高親和性な酵素配列の探索を行うため、本研究ではグラフ構造を用いた機械学習によるドッキングスコアの予測モデルの構築を行う。従来の中心的な手法であった配列を訓練データ群に用いる機械学習モデルと異なり、タンパク質構造をエッジとノードから構成されるグラフデータを入力とすることで残基間の三次元上の位置や物理的相互作用を直接反映できるため、配列ベースの機械学習モデルとは異なったアプローチが可能であることを示す。

本研究では化学反応に P450 による Tyrosine から L-DOPA への酸化反応に注目し、Uniprot 上に存在する P450 構造に対し tyrosine をドッキングして得られたスコアを用いてモデルのトレーニングを行う。グラフデータを使ったモデルによって予測された配列のスコアとドッキングによるスコアには一定の関係性が見られるため、この手法が基質との相互作用を捉えることが可能であると考えられる。

本モデルの構築した学習モデルを用いることで P450 の大規模変異体ライブラリのドッキングスコアの予測に掛かる時間を大幅に短縮できるため、効率的な高親和性の変異体の探索が可能になると考えられる。この手法が P450 のみならず他の酵素と天然及び非天然のリガンドへの親和性を向上させる有効な手段となることが期待される。

## 自動ドッキングに基づく新規抗ウイルス剤であるシアル酸アナログ の脱保護のためのカルボキシルエステラーゼの選択

○ニランジニ アラガッパン<sup>1</sup>・ヴァヴリッククリストファー<sup>1</sup>・清田 洋正<sup>2</sup> (<sup>1</sup> 東京農工大学 工学部生命工学科、<sup>2</sup> 岡山大学 環境生命自然科学学域)

**Automated Docking-Based Selection of Carboxylesterase for Deprotection of Novel Sialic Acid Analogues as Antiviral Prodrugs** (TUAT Dept. Biotechnol. Life Sci.<sup>1</sup>, Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ. <sup>2</sup>)  
NIRANNJHEENI Alagappan<sup>1</sup>; VAVRICKA Christopher John<sup>1</sup>; KIYOTA Hiromasa<sup>1</sup>

Our research group has recently developed a novel phosphonate analogue of sialic acid as an antiviral neuraminidase inhibitor. However, deprotection of our key phosphonate ester intermediate using synthetic organic chemistry methods has been proved to be difficult. Therefore, carboxylesterase (EC 3.1.1.1) is explored as a scaffold with potential to cleave phosphonate esters, as well as other carboxylate ester prodrugs. We selected an optimal scaffold by developing an automated docking protocol that screens the binding of our target substrate to the active sites of several hundred carboxylesterases. Then, to further optimize scaffold selection, the automated docking method was utilized to curate training sequences for machine learning-based classification. From our docking analysis, a carboxylesterase from *Octodon degus* was found to exhibit optimal predicted binding to our target substrate as well as the antiviral oseltamivir. To validate the selected scaffold, the gene encoding the target sequence was coexpressed in *Escherichia coli* cells together with molecular chaperones GroEL and GroES. We then analysed the soluble protein and developed a high-throughput screening method for esterase activity. This study shows that our automated enzyme selection and screening platform can effectively identify and evaluate optimal enzymes for production of pharmaceutical compounds including antivirals.



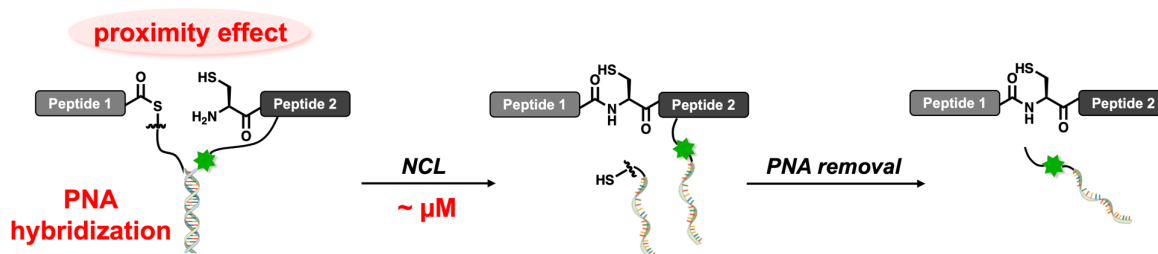
## PNA 足場ペプチド連結反応を用いたタンパク質化学合成

○鈴木沙依<sup>1</sup>・水嶋真吾<sup>1</sup>・竹内優紀乃<sup>1</sup>・林剛介<sup>1</sup>・村上裕<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>名大院工、<sup>2</sup>名大ナノライフ研)

**PNA hybridization-assisted peptide ligation for chemical protein synthesis** (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.<sup>1</sup>, Institute of nano-life-systems, Nagoya Univ.<sup>2</sup>) SUZUKI Sae<sup>1</sup>; MIZUSHIMA Shingo<sup>1</sup>; TAKEUCHI Yukino<sup>1</sup>; HAYASHI Gosuke<sup>1</sup>; MURAKAMI Hiroshi<sup>1,2</sup>

有機化学的にタンパク質を作製する「タンパク質化学合成法」は、翻訳系を用いた遺伝子工学的手法では合成困難な、鏡像タンパク質などの非天然タンパク質や修飾タンパク質の合成を可能にする。ヒトタンパク質の平均アミノ酸残基数は 460 程度であるが、ペプチド固相合成法で調製できるペプチドの長さは約 50 残基が限度であるため、長鎖タンパク質の合成ではペプチド断片を繋ぎ合わせるペプチド連結反応が用いられる。最も頻用されているペプチド連結反応は、C 末端にチオエステルを有するペプチドと N 末端にシステインを有するペプチドを反応させる Native Chemical Ligation (NCL) である<sup>1</sup>。NCL では、ペプチド断片を穏和な中性水溶液中でペプチド結合によって連結できる。しかし疎水性の高いペプチドは、通常~mM 程度のペプチド濃度を必要とする NCL 反応条件で凝集・沈殿してしまうため、連結が困難である。そこで当研究室では、DNA の二本鎖形成により加速するペプチド連結反応を開発してきた<sup>2</sup>。連結するペプチド断片に相補的な DNA を導入し、DNA の二本鎖形成がもたらすペプチド断片の近接効果を利用することで、低濃度条件 (~ $\mu$ M) での連結反応を達成している。

本研究では、人工核酸 Peptide Nucleic Acid (PNA) を足場として用いる NCL 反応を開発し、タンパク質化学合成へ応用することを試みた。PNA はアミド骨格を持つためペプチド合成と相性が良く、ペプチド-PNA コンジュゲートの合成が容易である。さらに、主鎖に電荷を持たないためストランド間の静電反発がなく、DNA より安定な二本鎖を形成するという利点もある。PNA はペプチドから除去可能な設計にすることで、連結反応後に天然配列のタンパク質が得られるようにした。PNA を足場としたペプチド連結反応を行った結果、従来法と比べて 1000 倍程低濃度 (~ $\mu$ M) で NCL 反応が進行することが明らかとなった。本発表では、ペプチド-PNA コンジュゲートの合成法および本手法のタンパク質化学合成への応用について報告する。タンパク質化学合成への応用では、翻訳後修飾 K122Ac を持つヒストンタンパク質 H3 を標的とした。低濃度での 3 断片の連結反応、脱硫反応および PNA 除去反応を全てワンポットで行うことで、従来法<sup>3,4</sup> より高収率で全長のヒストン H3 を得る事に成功した。



1. P. E. Dawson, *et al.* Science 266, 776-779 (1994)
2. G. Hayashi *et al.* Biomacromolecules 20, 3, 1246-1253 (2019)
3. N. Kamo *et al.* Org. Lett. 21, 20, 8378-8382 (2019)
4. K. Nakatsu *et al.* Org. Lett. 22, 12, 4670-4674 (2020)



## ヒンジループ改変ヒトシトクロム *c* の 2 量体構築とその細胞内発現

○太田 ことり・藤原 綱大・真島 剛史・小林 直也・金井 賢一・松井 貴輝・別所 康全・廣田 俊（奈良先端大先端科技）

**Dimer construction and intracellular expression of hinge-loop mutated human cytochrome *c*** (Graduate School of Science and Technology, Nara Institute of Science and Technology) OHTA, Kotori; FUJIWARA, Kodai; MASHIMA, Tsuyoshi; KOBAYASHI, Naoya; KANAI, Kenichi; MATSUI, Takaaki; BESSHO, Yasumasa; HIROTA, Shun

シトクロム *c* (cyt *c*) は、ミトコンドリア内膜で電子伝達を行うヘムタンパク質であり、アポトーシス誘導においても重要な役割を果たしている。Cyt *c* はエタノール添加、凍結乾燥、再溶解の操作を行うことで、3D ドメインスワッピングにより 2 量化する。また、ヒンジループを欠損させるとドメインスワッピングによる 2 量体形成が促進されることが様々なタンパク質で報告されている。ドメインスワッピングによるタンパク質の多量化は生体内でも起こる可能性があるが、その詳細は未解明である。本研究では、ヒンジループ近傍のアミノ酸残基を欠損させたヒト cyt *c* 変異体を作製し、その 2 量体形成を調べた。また、設計した変異体を HeLa 細胞内で発現させ、ドメインスワッピングが促進された cyt *c* が HeLa 細胞へ与える影響について調べた。

ヒト cyt *c* のヒンジループ近傍のアミノ酸残基を 2 ～5 個欠損させた変異体 (del8384, del82-84, del82-85, del81-85) を作製した (Fig. 1)。各変異体の酸化型のソールレ帯は 406 nm に観測され、野生型と比較して若干短波長シフトした。また、ヘム鉄と Met80 の結合に由来する 695 nm の吸収帯は、変異体では観測されなかった。これらのことから、変異体では Met80 がヘム鉄から解離していることが示唆された。変異体では、野生型と比較して円偏光二色性スペクトルでのランダムコイル成分が増大した。また、222 nm の楕円率による熱変性曲線より、各変異体の熱安定性はヒンジループ近傍のアミノ酸残基の欠損数が多いほど低下することが分かった。各変異体は 37°C で静置することで 2 量体を形成し、120 時間静置後のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析による 2 量体の形成割合は del81-85 ≒ del82-85 < del8384 < del82-84 であった (Fig. 2)。一般にヒンジループの欠損アミノ酸残基数が多いほどドメインスワッピングは助長されるが、本研究で欠損アミノ酸残基数が 4 個以上であると 2 量体形成時の立体障害により 2 量体構造が不安定化し、2 量体形成量が減少したと推測した。ヘマグルチニンタグを融合した cyt *c* を HeLa 細胞で発現させ、免疫染色にて観測したところ、野生型 cyt *c* はミトコンドリアに局在していた一方で、変異体は細胞質でも観測され、変異体で局在が変化することが分かった。

1) S. Hirota *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 12854–12859.

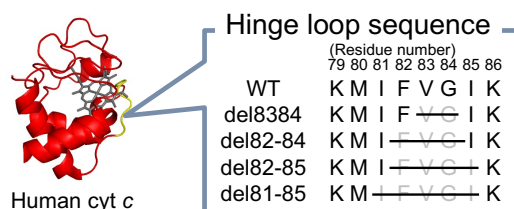


Figure 1. 本研究で用いた変異体ヒト cyt *c* のヒンジループ近傍のアミノ酸配列。

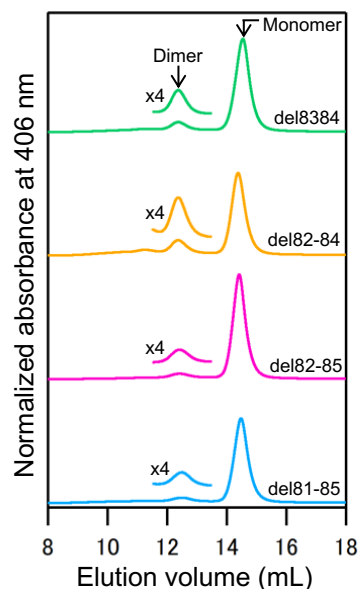


Figure 2. Cyt *c* 変異体を 37°C、120 時間静置した後の SEC 溶出曲線。

## 赤色蛍光を示す可逆的タンパク質ラベル化プローブの開発

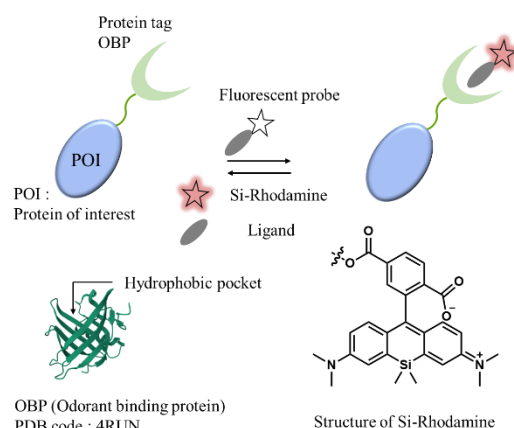
○大谷奈々<sup>1</sup>・蓑島維文<sup>1</sup>・菊地和也<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> 阪大院工、<sup>2</sup> 阪大免フロ)

**Development of Reversible Protein Labeling Probe with Red fluorescence** (Graduate School of Engineering, Osaka Univ.<sup>1</sup>, Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ.<sup>2</sup>) OTANI, Nana<sup>1</sup>; MINOSHIMA, Masafumi<sup>2</sup>; KIKUCHI, Kazuya<sup>1,2</sup>

タンパク質の蛍光ラベル化はイメージングにより細胞内動態を解析するためのとして重要なツールである。タンパク質ラベル化の手法として、タグタンパク質を用いた手法が広く用いられている。この手法では、標的タンパク質に蛍光プローブのリガンド部分と特異的に結合するタグとなるタンパク質をあらかじめ発現させておくことで、蛍光プローブがタグを介して標的のタンパク質をラベル化する<sup>(1)</sup>。共有結合によるラベル化の場合、不可逆的に蛍光プローブが導入されるため、色素が光褪色すると蛍光シグナルを失う。これは特に高強度のレーザーを用いる超解像イメージングや長時間のイメージングにおいて制限となる。一方、非共有結合によるラベル化の場合は繰り返しプローブが入れ替わることができ、光褪色してもプローブの入れ替わりにより、ラベル化状態を維持することが可能であるため、近年再評価されている<sup>(2)</sup>。

当研究室では、非共有結合によるラベル化に着目し、Odorant binding protein (OBP) を用いたタンパク質ラベル化システムを開発してきた<sup>(3)</sup>。OBP は鼻粘膜に限局して発現しているタンパク質で、本来は脂肪酸などの疎水性匂い分子と非共有的に結合し、運搬する働きがある<sup>(4)</sup>。私たちはこの性質を生かし、蛍光プローブが入れ替わり結合するタグとして用いている。これまでに、環境応答性のクマリン色素誘導体と脂肪酸からなる蛍光プローブを OBP のラベル化に用いてきた。しかし、これらのクマリン色素誘導体では、蛍光波長が青から緑色に限られてしまい、光安定性も十分でないといった課題がある。

これらの課題の解決のため、本研究では長波長の蛍光波長を持ち、光安定性の高い色素である Si-Rhodamine とその誘導体に着目し、OBP に結合する新たなプローブの開発を目的とした。Si-Rhodamine は非極性環境で閉環体、極性環境で開環体になることが知られている<sup>(5)</sup>。閉環体は無吸収かつ無蛍光で開環体になると近赤外領域に蛍光を発する。そこで、Si-Rhodamine を色素としたプローブを設計、合成した。合成したプローブを用いて、OBP との結合による発蛍光性を確認した。



1. G. Crivat and J. Taraska, *Tre. Bio.* **2012**, 30, 8.
2. J. Kompa *et al.*, *J. Am. Chem Soc.* **2023**, 145, 3075.
3. 蓑島 維文 他, 特願 2023-34762
4. P. Pelosi *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63, 1858.
5. G. Lukinavičius *et al.*, *Nat. Chem.* **2013**, 5, 132.

## 天然・転写 tRNA を用いた Ser/Leu 交換翻訳系の高収率化

○東長田泰斗<sup>1</sup>・藤野公茂<sup>1</sup>・園田凌吾<sup>1</sup>・三城恵美<sup>2</sup>・加納圭子<sup>2</sup>・村上裕<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup> 名大院工、<sup>2</sup> 名大 ITbM、<sup>3</sup> 名大ナノライフ)

**Highly efficient Ser/Leu-swapped translation with natural/in vitro transcribed-hybrid tRNA set** (Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>1</sup>, Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University<sup>2</sup>, Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University<sup>3</sup>)  
HIGASHINAGATA, Taito<sup>1</sup>; FUJINO, Tomoshige<sup>1</sup>; SONODA, Ryogo<sup>1</sup>; MISHIRO, Emi<sup>2</sup>; KANO, Keiko<sup>2</sup>; MURAKAMI, Hiroshi<sup>1,3</sup>

遺伝子組み換え生物(GMO)を用いたタンパク質の調製には組み換え遺伝子が外部環境へ漏洩するリスクへの対策が重要である。無細胞翻訳系は、GMO 個体の漏洩による遺伝子拡散のリスクは無くすることができるが、組み換え遺伝子の調製過程での組み換え DNA の漏洩リスクは残る。この問題を解決するために、我々は先行研究において Ser/Leu 交換遺伝暗号を考案した(図 1)。これは Ser/Leu コドンを入れ替えた遺伝子を、アンチコドンを入れ替えたキメラ tRNA<sup>Ser</sup><sub>GAG</sub>, tRNA<sup>Leu</sup><sub>GGA</sub> で翻訳することで、タンパク質の本来の配列通りに合成を行うというものである。Ser/Leu 入れ替え遺伝子は、通常の生物の持つ普遍遺伝暗号では正しい配列にならず不活性となるため、仮に遺伝子が漏洩した場合のリスクが低減できる。しかし、先行研究の Ser/Leu 交換翻訳系では、タンパク質合成量が通常の翻訳系と比較して非常に低くなってしまったという問題があった。これは、キメラ tRNA を含む全ての tRNA を *in vitro* 転写(IVT)によって調製したため塩基修飾を持たず、活性が低下したことが原因と考えられた。また、IVT により 21 種類の tRNA を調製する必要がある、翻訳系構築の手間が大きいという問題もあった。

そこで、本研究では、Ser/Leu 交換遺伝暗号の翻訳効率の改善を目的として、大腸菌から抽出した天然 tRNA と IVT によって調製した tRNA を組み合わせることで開発した、天然・転写ハイブリッド tRNA を利用することとした(図 2)。変性アクリルアミドゲル電気泳動によって大腸菌 tRNA から天然の tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Leu</sup> を除去し、IVT により調製したキメラ tRNA<sup>Ser</sup><sub>GAG</sub>, tRNA<sup>Leu</sup><sub>GGA</sub> と一部の tRNA を添加することでハイブリッド tRNA を作製した。これにより、Ser/Leu 交換遺伝暗号が読まれる。さらに、大部分の tRNA が天然のものとなったことで、Ser/Leu 交換遺伝暗号に基づくタンパク質の合成効率を、天然 tRNA を用いた通常が無細胞翻訳系と同程度まで改善することに成功した。天然 tRNA を用いた追加の利点として、使用可能なコドンの種類数も拡張することができる。実際に、レアコドンに対応する tRNA 遺伝子を追加した Rosetta2 株由来の tRNA を用いて系を構築することで、Ser/Leu 交換遺伝暗号において、61 個中 53 個のセンスコドンが利用可能であることを明らかにした。最後に、キメラ tRNA による Ser/Leu の交換導入のせい正確性について、詳細に検証することを目的に、翻訳産物の LC-MS/MS 解析についても

行った。本系は、目的タンパク質をバイオハザードのリスク無しに調製可能なツールとして今後の応用が期待される。

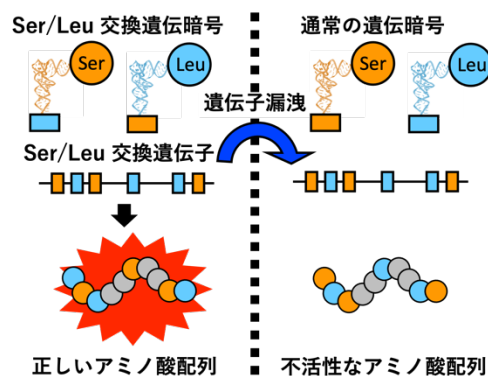


図1 Ser/Leu交換翻訳の原理

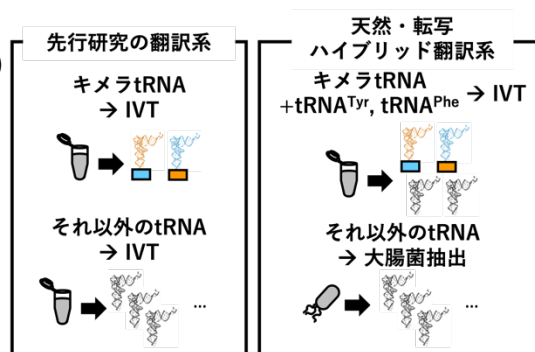


図2 天然・転写ハイブリッドtRNAを用いた遺伝暗号構築

## 拮抗薬とムスカリン受容体の複合体の構造情報に基づいた光応答性 リガンドの開発

○水野愛香、堂浦智裕、清中茂樹(名大院工)

**Development of photoresponsive ligands based on the structural information of the antagonist and muscarinic receptor complex** (Graduate School of Engineering, Nagoya University) MIZUNO, Aika; DOURA, Tomohiro; KIYONAKA, Shigeki

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は7回膜貫通型細胞膜受容体であり、リガンド結合に伴って構造変化を起こし、細胞内にシグナルを伝達する。GPCRは人体における様々な生理学的プロセスに関与するため、創薬標的として注目されている。同種のGPCRでも生体内に広範に発現し、発現箇所によって異なる生理機能に関与することが知られているが、従来の薬理学に代表される手法では部位選択的にGPCR活性を制御することは困難であった。そのためGPCRを部位選択的に活性制御する手法が求められている。

標的タンパク質を高い時空間分解能で制御する方法として我々は光薬理学的手法に着目した。この手法では標的タンパク質のリガンドに光応答性を付与することにより、リガンド投与と光照射による標的タンパク質の機能制御が可能である。

本研究ではムスカリン性アセチルコリン受容体(ムスカリン受容体)に対して光薬理学を適応し、光応答性リガンドによるムスカリン受容体の時空間的な活性制御を目指している。ムスカリン受容体はアセチルコリンを内在リガンドとするclass A GPCRであり、5つのサブタイプ(M1R, M2R, M3R, M4R, M5R)を有する。アルツハイマー病やパーキンソン病をはじめとする様々な疾患に関与している。しかし、末梢から中枢まで生体内で広範に発現しているため、特定の組織におけるムスカリン受容体の機能は未解明な部分が多く、より詳細な機能解明が望まれる。そこで我々はムスカリン受容体を制御可能な光スイッチングリガンドの開発に着手した。蛍光色素やペプチド等をM2Rの細胞外領域に接する部位にもつM2R拮抗薬Dibenzodiazepinone (DIBA)の誘導体の研究から、DIBA-pharmacophoreを変えずとも細胞外側の分子構造に依存して誘導体のムスカリン受容体に対する親和性を調節可能であると考えた<sup>1</sup>。そのため我々はDIBA誘導体のムスカリン受容体の細胞外領域に接する部位に光スイッチとして知られるアゾベンゼンを導入し、光照射に伴うアゾベンゼンの構造変化によりムスカリン受容体に対する親和性が変化するような光応答性リガンドの開発を目指した。結果として、光照射前後で受容体に対する親和性に差が生じる光応答性リガンドの取得に成功したため、本学会ではその結果について報告する。

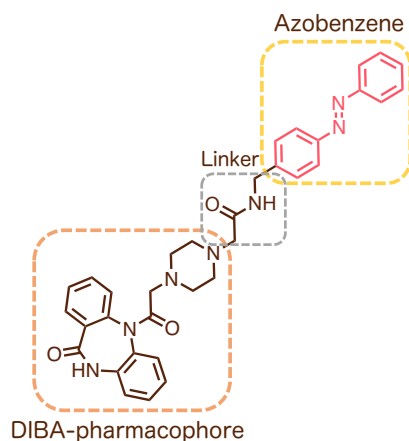


Figure 1. 光応答性リガンドの設計

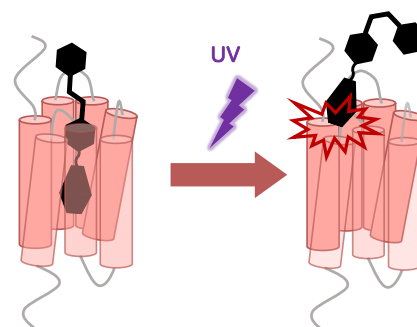


Figure 2. ムスカリン受容体の光制御

1. G. Corinna *et al*, *Eur. J. Med. Chem.*, **213**, 113159 (2021)



光応答性リガンドを用いたアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体選択的な光活性化

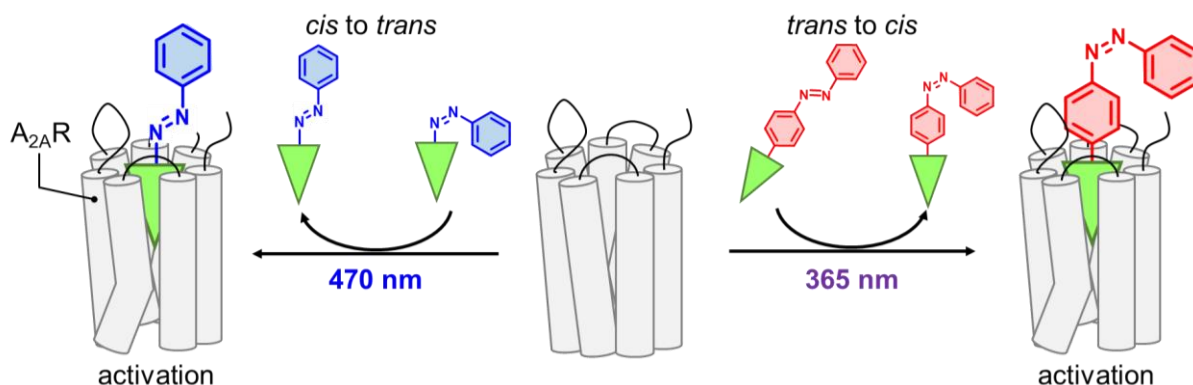
○鈴木啓文・松葉佑弥・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

**Photoactivation of Adenosine A<sub>2A</sub> receptor with photoresponsive ligands** (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.) SUZUKI, Harufumi; MATSUBA, Yuya; DOURA, Tomohiro; KIYONAKA, Shigeki

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は細胞膜受容体の中で最大のファミリーであり、ヒトには約 850 種が存在する。GPCR は細胞外の神経伝達物質やホルモンなどの内因性リガンド分子と結合することにより活性化し、細胞内へとシグナルを伝達する。様々な生理学的・病理学的プロセスに関与しており、内因性リガンドによって複数のグループに分類される。アデノシン受容体(AR)はアデノシンを内因性リガンドとする GPCR であり、A<sub>1</sub>R、A<sub>2A</sub>R、A<sub>2B</sub>R、A<sub>3</sub>R の 4 つのサブタイプから構成される。各サブタイプは異なる生理的役割を担っており、中でも A<sub>2A</sub>R は睡眠、血管新生、免疫抑制などの生理的プロセスやがん、パーキンソン病などの病理学的プロセスへの関与が知られる。そのため、A<sub>2A</sub>R の機能解明が求められているが、発現する細胞種によっても生理的役割は異なることから、A<sub>2A</sub>R の機能解明にはサブタイプ選択的かつ部位選択的に A<sub>2A</sub>R の活性を制御できる手法が必要となる。

そのため我々は光薬理学に着目した。光薬理学は光応答性リガンドを用いて標的タンパク質を光によって制御する手法であり、標的タンパク質を生きた細胞や動物において高い時空間分解能で機能制御することが可能である。したがって、A<sub>2A</sub>R サブタイプ選択的な光応答性リガンドは、組織や動物における A<sub>2A</sub>R の生理的・病理学的役割を解明する上で強力な手段となる。

本発表では A<sub>2A</sub>R を光活性化可能かつ A<sub>2A</sub>R サブタイプ選択的な 2 種類の光応答性リガンドを報告する。まず、我々は内在リガンドであるアデノシンに、紫外-可視光照射によって *trans* 体と *cis* 体に可逆的に構造変化するアゾベンゼン骨格を導入した光応答性リガンドを設計・合成した。続く細胞応答に基づくスクリーニングより、A<sub>2A</sub>R 選択的で光特性の異なる光応答性リガンドを 2 種類見出すことができた。興味深いことに、1 つの化合物は *trans* 体の親和性が高く、*cis* 体への可視光照射で A<sub>2A</sub>R の活性化を可能とした。対照的にもう一方は *cis* 体の親和性が高く、熱的安定性の高い *trans* 体への光照射で A<sub>2A</sub>R の活性化を可能とした。また、生細胞中において開発した光応答性リガンドが A<sub>2A</sub>R 発現細胞を選択的に光活性化可能であることを実証し、A<sub>2A</sub>R の機能解明において有用なツールであることを示した。



## 金属触媒と酵素触媒を利用した重水素導入ヌクレオシドの合成

○古賀麻由璃・島根絃熙・幡野明彦（芝浦工大院理工）

**Synthesis of deuterated nucleosides using metal and enzyme catalysts** (Grad. Sch. Sci. Eng., Shibaura Institute of Technol.) KOGA, Mayuri; SHIMANE, Genki; HATANO, Akihiko

化合物の重水素化は、医薬品やラマン散乱や安定同位体顕微鏡を用いたイメージングのトレーサーとして注目されている。これらのイメージングでは、ラマン散乱の効率が極めて低いことから信号対雑音（S/N）比を向上させるためには、露光時間を長くする必要があり問題であった。より短時間で測定を行うためには、重水素を目的分子に複数導入する必要がある。

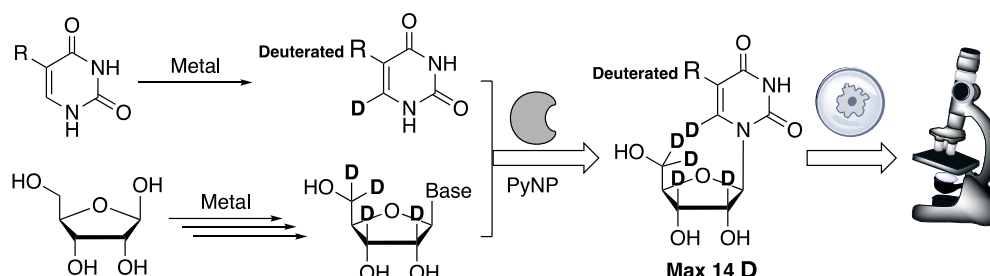


図1 金属イオンによる重水素化と酵素による塩基部位交換反応による重水素を最大 14 個有するヌクレオシドの合成

本研究では、生体分子であるヌクレオシドの分子構造内に重水素を複数導入する手法として、パラジウムや白金などの金属を用いて塩基部位とリボース部位にそれぞれ重水素を導入する。そして重水素化された塩基部位とリボース部位を核酸代謝酵素によりカップリングすることで、複数の重水素を有したヌクレオシドを効率良く合成することを検討した。

実験は、各種塩基、リボースと金属触媒を重水中に入れ、水素雰囲気下で反応を行った。生成物の確認と重水素化率の算出は、NMR を用いた。

塩基部位の重水素化は、パラジウム、白金触媒を用いると 5, 6 位の水素原子は重水素に効率良く交換された (72~99%)。しかし、ルテニウムを用いても全く重水素化されなかった。それに対し、リボース部位の重水素化では、表 2 に示すようにルテニウムが最も効率の良い触媒であり、他の金属はあまり効果が良くなかった。2,3 位は中程度 (40~68%) の重水素化を示し、5位は80%程度の重水素化率であった。しかし、ルテニウムでも4位は重水素化されなかった。

表1 各種金属を用いた 5-エチルウラシルの 5, 6 位重水素化反応

| Catalyst  | Time/h | D content/% |       |    |
|-----------|--------|-------------|-------|----|
|           |        | 5-(1)       | 5-(2) | 6- |
| Pd/C      | 24     | 88          | 72    | 90 |
| Ru/C      | 24     | 0           | 0     | 0  |
| Pt/C      | 24     | 85          | 82    | 90 |
| Pd/C+Pt/C | 72     | 90          | 90    | 99 |

表2 ルテニウムを用いたリボース部位の重水素化反応

| Temp/°C | Time/h | D content/% |    |    |    |
|---------|--------|-------------|----|----|----|
|         |        | 2-          | 3- | 4- | 5- |
| RT      | 24     | 0           | 0  | 0  | 0  |
| 80      | 24     | 50          | 50 | 0  | 80 |
| 80      | 72     | 68          | 68 | 0  | 83 |
| 110     | 72     | 40          | 40 | 0  | 65 |
| 110     | 168    | 49          | 51 | 0  | 80 |

# 繊維状タンパク質の末端重合による超巨大人工生体分子集合体の創製

○長谷彩沙<sup>1</sup>・南畑孝介<sup>1</sup>・石川聖人<sup>2</sup>・吉本将悟<sup>3</sup>・堀克敏<sup>3</sup>・神谷典穂<sup>1,4</sup>

(<sup>1</sup> 九大院工、<sup>2</sup> 長浜バイオ大、<sup>3</sup> 名大院工、<sup>4</sup> 九大未来化セ)

**Terminal-specific polymerization of fibrous proteins for the creation of ultra-large artificial biomolecular assemblies** (Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University<sup>1</sup>, Faculty of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology<sup>2</sup>, Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>3</sup>, Division of Biotechnology, Center for Future Chemistry, Kyushu University<sup>4</sup>) NAGATANI, Ayasa<sup>1</sup>; MINAMIHATA, Kosuke<sup>1</sup>; ISHIKAWA Masahito<sup>2</sup>; YOSHIMOTO, Shogo<sup>3</sup>; HORI, Katsutoshi<sup>3</sup>; KAMIYA Noriho<sup>1,4</sup>

## 【緒言】

枯渇資源に依存しない人工タンパク質繊維は、循環型社会の実現に貢献する次世代材料として注目されている。特に、シルクやコラーゲンなどの繊維状タンパク質は、生物の構造形成や機械的強度の維持において重要な役割を担っており、再生可能なタンパク質性資源としても注目されている。本研究では、優れた機械的特性を有する新規人工タンパク質繊維の創出に向け、繊維状タンパク質を末端選択的に連結させた超巨大タンパク質集合体の創製を目的とした。

繊維状タンパク質として、柔軟性と強靱性を兼ね備えた三量体タンパク質である AtaA の C 末端を構成する Cstalk に注目した。これとタンパク質間の特異的連結に利用される SpyTag (ST)-SpyCatcher (SC) システムを組み合わせ、Cstalk を主要な構成要素とする人工タンパク質繊維の形成を試みた。

## 【実験方法】

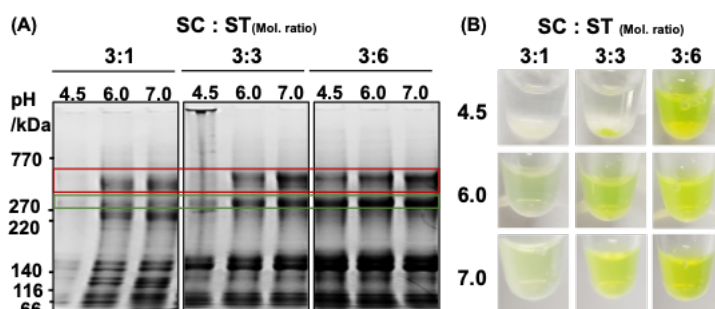
遺伝子組換え技術により SC が両末端に導入された SC-Cstalk-SC (190.5 kDa) と、ST が両末端に導入された人工リンカータンパク質 (ST-linker-ST, 43.0 kDa) を、大腸菌 BL21 (DE3) を宿主として発現・精製し、これらを組み合わせた Cstalk 連結反応を行った。

## 【結果及び考察】

まず、反応点の濃度比 (SC:ST) が Cstalk 連結反応に及ぼす影響を検討した。Cstalk は三量体タンパク質であるため、反応点である SC は末端に 3 つ存在する。ここでは、10  $\mu$ M SC-Cstalk-SC に対して 10  $\mu$ M ST-muGFP-ST を混合させた場合、SC:ST=3:1 と表記する。本条件下での連結反応において得られる Cstalk 集合体の分子量と反応点の濃度比の間には、明確な変化が見られなかった。続いて、低 pH 条件下で反応を

行った。その結果、pH 4.5 においては、SDS-PAGE ゲルの上部に溜まるほどの大きな分子量が確認され、溶液中においては沈殿物が確認された (Fig. 1)。従って、表面の負電荷の低下が Cstalk 同士の接近を容易にし、より高分子量の Cstalk 集合体の形成が促進されたと考えられる。

【謝辞】本研究は JSPS 科研費 JP21H01727, JP23H00247 の助成を受けたものです。



**Fig. 1 SC-Cstalk-SC と ST-muGFP-ST を各濃度比で反応させたサンプルの (A) SDS-PAGE 電気泳動結果, (B) 溶液画像**

## スプリットタンパク質プローブを用いた DNA 修復 foci のプロテオミクス解析法の開発

○八塚研治<sup>1</sup>・伊藤海児<sup>1</sup>・渡邊愛梨<sup>1</sup>・深田梨沙子<sup>1</sup>・田代有輝<sup>1</sup>・金岡英徳<sup>2</sup>・清中茂樹<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名古屋大院工、<sup>2</sup>愛知工業大工)

**A method for proteomics analysis of DNA damage foci using split protein probes** (Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>1</sup>, Faculty of Engineering, Aichi Institute of Technology<sup>2</sup>) YATSUZUKA, Kenji<sup>1</sup>; ITO, Kaiji<sup>1</sup>; WATANABE, Airi<sup>1</sup>; FUKATA, Risako<sup>1</sup>; TASHIRO, Yuki<sup>1</sup>; KANEOKA, Hidenori<sup>2</sup>; KIYONAKA, Shigeki<sup>1</sup>

我々の生命活動は高度に組織化された様々な細胞内小器官による複雑な制御によって成り立っている。細胞内小器官はミトコンドリアなどの脂質二重膜をもつオルガネラと、核小体などの膜構造を持たないメンブレンレスオルガネラ (MLO) に大別される。MLO はタンパク質や RNA が液-液相分離を起こして形成される構造体だが、その形成は一過的で、構成因子は絶えず入れ替わっている。MLO はこのようなダイナミックな挙動を介して生体制御に深く関わっているが、その性質のために解析が困難であり、形成機構や意義、及び構成因子の解明は不十分である。特にプロテオミクス研究においては構成因子のダイナミックな挙動のため、MLO 内やその近傍のみの標識が非常に困難となり、時空間を制御した MLO 解析法の開発が望まれている。本研究では MLO の中でも特に DNA 二本鎖切断時に形成される DNA 修復 foci に着目し、スプリットタンパク質プローブを活用した MLO の構成成分特異的な標識法の開発に取り組んだ。

DNA 修復 foci は SUMO 化やユビキチン化といった翻訳後修飾因子依存的なタンパク質-タンパク質間相互作用により DNA 修復因子が集積して形成される核内 MLO の一種である。DNA 修復 foci の形成因子の一つであるタンパク質 RAP80 は、SUMO との相互作用によって機能が制御されている。我々は RAP80 と SUMO それぞれに split 型蛍光タンパク質 (Venus) と split 型近接ラベル化酵素 (APEX2) を融合させたプローブを作製した (Fig. 1)。このプローブを用いることで RAP80 と SUMO のタンパク質間相互作用に依存した蛍光検出に加え、biotin-phenol と過酸化水素を用いた近接ラベル化が可能である。イメージングによる確認では、近接ラベル化によってビオチン化されたタンパク質に由来するシグナルはプローブ由来の蛍光周辺でのみ観測され、その局在は DNA 二本鎖切断部位とよく一致していた。以上の結果より DNA 修復 foci 周辺でビオチンラベル化が進行することを確認できたため、プロテオミクス解析へと展開した。本発表では RAP80 変異体を用いた修復 foci 内のプロテオミクス解析に向けた手法開発と解析結果について報告する。

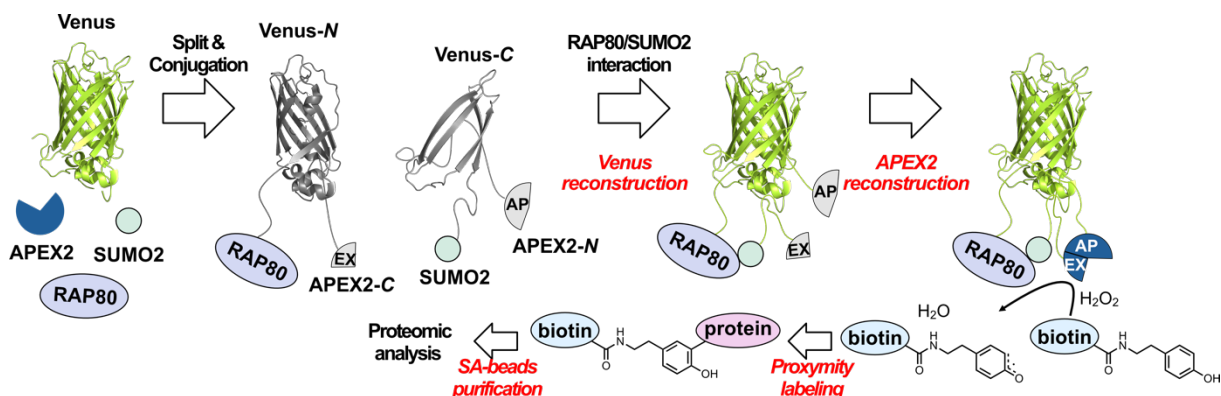


Fig. 1 : スプリットタンパク質プローブによる RAP80-SUMO 相互作用検出と近接ラベル化



## AMPA 受容体の迅速かつ可逆的な可視化を目指した蛍光標識リガンドの開発

○中川満結<sup>1</sup>・曾我恭平<sup>1</sup>・Hansel Adriel<sup>2</sup>・柴田晃大<sup>1</sup>・藤原孝彰<sup>2</sup>・南後恵理子<sup>2,3</sup>・  
清中茂樹<sup>1</sup>(<sup>1</sup>名大院工、<sup>2</sup>東北大多元研、<sup>3</sup>理研 Spring-8)

### Development of fluorescent labeling ligand of AMPA receptor for rapid and reversible visualization

(Grad. Sch. Eng. Nagoya Univ.<sup>1</sup>, IMRAM Tohoku Univ.<sup>2</sup>, Riken Spring-8<sup>3</sup>) Nakagawa, Mayu<sup>1</sup>, Soga, Kyohei<sup>1</sup>, Hansel Adriel<sup>2</sup>, Shibata, Akihiro<sup>1</sup>, Fujiwara, Takaaki<sup>2</sup>, Nango, Eriko<sup>2,3</sup>, Kiyonaka, Shigeki<sup>1</sup>

神経細胞には、突起上の構造であるシナプスが存在し、そこで神経伝達物質のやりとりを介して情報伝達を行っている。中枢神経系において、イオンチャネル型グルタミン酸受容体は速い興奮性の神経伝達を担っている。中でもポストシナプス膜上に存在する AMPA 型グルタミン酸受容体は、膜上の動態が厳密に制御されており、その動態は記憶・学習、アルツハイマー等の疾患と密接に関連している。従って、AMPA 受容体の動態解析を行うことは、記憶のメカニズムや病態を解明する手がかりになると考えられる。

細胞表層の AMPA 受容体可視化法として、当研究室ではリガンド指向性二段階ラベル化法が開発された。この手法は、AMPA 受容体を共有結合的に蛍光標識することが可能であり、受容体の半減期といった動態解析に成功している。しかし、1段階目の標識に長時間のインキュベーションが必要であることが課題であった。そこで当研究室では、従来法にはできない迅速なラベル化を目的として、色素をリガンドにリンカーを介して結合させた AMPA 受容体可視化蛍光標識リガンドの開発を試みた。本研究では、色素やリンカーの検討により、蛍光標識リガンドの最適化を行った。検討の結果、アニオン性の色素を持ち、リンカーのないプローブが高親和性であることが示唆された。また、AMPA 受容体のリガンド結合部位を取り出したリコンビナントタンパク質である S1S2J と蛍光標識リガンドの共結晶構造を取得した。その結果、色素とタンパク質が相互作用していることが分かり、高親和性プローブの分子メカニズムの解明に成功した。この結晶構造から、さらに詳細な分子設計が可能となることが期待される。

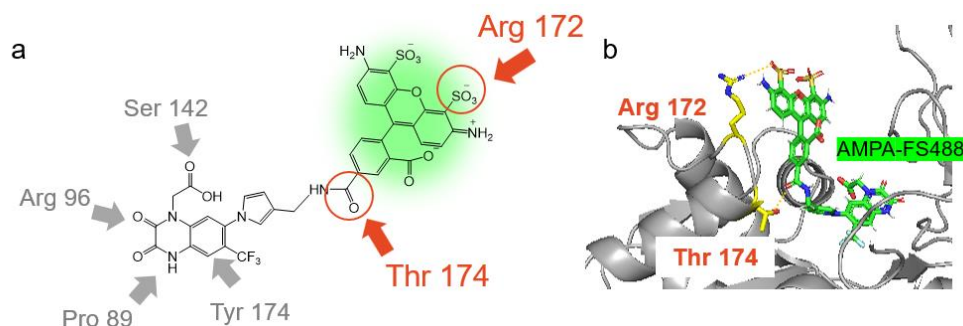


Fig. (a) Structure of AMPA-FS488. (b) Fig. 3-3 Cocrystal structure of S1S2J and AMPA-FS488.

## MBD 融合蛍光タンパク質と MBD 融合ルシフェラーゼを用いたゲノム DNA メチル化頻度測定法

○庄司悠人<sup>1</sup>・池田優乃<sup>2</sup>・林理恵<sup>1</sup>・田中祐圭<sup>3</sup>・吉田亘<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>東京工科大学院バイオニクス、<sup>2</sup>東京工科大学応用生物、<sup>3</sup>東京工業大学物質理工学院)

**Bioluminescence resonance energy transfer assay using MBD-fused luciferase and MBD-fused fluorescent protein for global DNA methylation level sensing** (Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology<sup>1</sup>, School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology,<sup>2</sup> Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology.<sup>3</sup>) SHOJI, Yuto<sup>1</sup>; IKEDA, Yuno<sup>2</sup>; RIN, Rie<sup>1</sup>; TANAKA, Masayoshi<sup>3</sup>; YOSHIDA, Wataru<sup>1,2</sup>

ヒトゲノム DNA の約 45%はレトロトランスポゾンなどの反復配列で構成されており、これらは通常高度にメチル化されている。一方、がん細胞ではこれら反復配列が低メチル化状態となっている。反復配列のメチル化頻度はゲノム DNA 全体のメチル化頻度と相関することから、これはがんのバイオマーカーとして利用できる。本研究ではこれまでに methyl-CpG binding domain 融合 firefly luciferase (MBD-Fluc) と DNA インターカレーター間で生じる生物発光共鳴エネルギー移動 (bioluminescence resonance energy transfer: BRET) を用いた、ゲノム DNA メチル化頻度測定法を開発した<sup>1-5</sup>。本手法では、まずゲノム DNA に DNA インターカレーターを結合させる。次に MBD-Fluc を結合させ、MBD-Fluc の発光により励起される DNA インターカレーターの蛍光強度 (BRET シグナル) を測定する。この BRET シグナルはゲノム DNA のメチル化頻度に依存するため、簡便にゲノム DNA のメチル化頻度を測定できる。しかし、本手法では DNA インターカレーターをゲノム DNA に結合させるために 30 分間の静置が必要であった。

そこで本研究では MBD 融合 NanoLuc luciferase (MBD-Nluc) と MBD 融合 monomeric Venus (MBD-mVenus) を構築し、これら間で生じる BRET シグナルを指標に迅速、簡便にゲノム DNA のメチル化頻度を測定する方法を開発することを目的とした。2 か所の近接したメチル化 CpG に MBD-Nluc と MBD-mVenus が結合すると、これら間で BRET が生じる。ゲノム DNA のメチル化頻度が高いほど、近接する MBD-Nluc と MBD-mVenus の割合が増えるため、この BRET シグナルを指標にゲノム DNA のメチル化頻度を測定できると想定した。pET30c-*Strep-tag II-MBD-Nluc* と pET30c-*Strep-tag II-MBD-mVenus* を用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。形質転換した BL21 (DE3) を OD<sub>600</sub> = 0.5 になるまで培養し、1.2 mM IPTG を添加することで MBD-Nluc と MBD-mVenus の発現誘導を行った。得られた湿菌体を破碎し、水溶性画分から Strep-Tactin カラムを用いてこれら融合タンパク質を精製した。DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine で HeLa 細胞を処理することで、低メチル化ゲノム DNA を調製した。このゲノム DNA に MBD-Nluc と MBD-mVenus を混合し、室温で 1 分間静置後、Nluc の発光基質を添加して、発光蛍光スペクトルを測定した。その結果、MBD-Nluc と MBD-mVenus 間で生じる BRET シグナルがゲノム DNA のメチル化頻度依存的に増加した。以上の結果より、MBD-Nluc と MBD-mVenus の間で生じる BRET シグナルを測定することで、迅速、簡便にゲノム DNA のメチル化頻度を測定できることが示された。

- 1) W. Yoshida, Y. Baba, I. Karube, *Anal. Chem.*, **88**, 9264 (2016)
- 2) W. Yoshida, Y. Baba, K. Banzawa, I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, **990**, 168 (2017)
- 3) Y. Baba, I. Karube, W. Yoshida, *Anal. Lett.*, **52**, 754 (2019)
- 4) Y. Baba, K. Yamamoto, W. Yoshida, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 4765 (2019)
- 5) T. Miyata, H. Shimamura, R. Asano, W. Yoshida, *Anal. Chem.*, **95**, 3799 (2023)

## 蛍光修飾メチル化プローブ DNA と MBD 融合ルシフェラーゼを用いた CpG メチル化頻度測定法

○早川貴覚<sup>1</sup>・黒田直希<sup>1</sup>・荒川貴博<sup>2</sup>・須磨岡淳<sup>2</sup>・吉田亘<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京工科大学院バイオニクス、<sup>2</sup>東京工科大学院サステイナブル工学)

**Detection of CpG methylation level using fluorescent modified methylated probe DNA with methyl-CpG binding domain-fused luciferase** (Graduate School of Bionics, Tokyo University of Technology<sup>1</sup>, Graduate School of Sustainable Engineering, Tokyo University of Technology<sup>2</sup>) HAYAKAWA, Takaaki<sup>1</sup>; KURODA, Naoki<sup>1</sup>; ARAKAWA, Takahiro<sup>2</sup>; SUMAOKA, Jun<sup>2</sup>; YOSHIDA, Wataru<sup>1</sup>

CpG のメチル化とは、ゲノム DNA 中のシトシンとグアニンの連続配列 (CpG) 中のシトシンの 5 位がメチル化される反応である。CpG のメチル化は遺伝子発現抑制に関与しており、正常な細胞では正常なメチル化パターンが形成されている。他方、がん細胞では、ゲノム DNA 全体のメチル化頻度が低下し、がん抑制遺伝子が高メチル化されている。そのため、これらはがんのバイオマーカーとして利用できる。本研究では、methyl-CpG-binding domain (MBD) 融合 firefly luciferase と DNA インターカレーター間で生じる生物発光共鳴エネルギー移動 (bioluminescence resonance energy transfer : BRET) を利用した、ゲノム DNA 全体のメチル化頻度測定法を開発した<sup>1-5</sup>。そこで、本研究では MBD 融合 NanoLuc luciferase (MBD-Nluc) と蛍光修飾メチル化プローブ DNA 間で生じる BRET を利用した、がん抑制遺伝子メチル化頻度測定法を開発することを目的とした。蛍光修飾メチル化プローブ DNA は標的領域に結合する。標的領域がメチル化されている場合は両鎖がメチル化されたフルメチル化 DNA が形成されるが、標的領域がメチル化されていない場合は片鎖のみメチル化されたヘミメチル化 DNA が形成される。MBD-Nluc はフルメチル化 DNA に特異的に結合するため、フルメチル化 DNA に結合した MBD-Nluc がプローブ DNA に修飾された蛍光色素を励起することで BRET が生じる。つまり、この BRET シグナルを測定することで標的領域のメチル化頻度を測定できると想定した。

pET30c-*StreptagII-MBD-Nluc* で形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) を培養し、OD<sub>600</sub> = 0.5 時に 1.2 mM IPTG を添加し、MBD-Nluc の発現誘導を行った。得られた湿菌体を破碎し、Strep-Tactin カラムを用いて MBD-Nluc を精製した。精製画分を SDS-PAGE により解析を行った結果、目的の位置付近にバンドが確認されたことから、MBD-Nluc を精製できたことが示された。5'末端に蛍光色素である TAMRA を修飾し、5'側から 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 17 番目のシトシンをメチル化したプローブ DNA を合成した。これらと相補的なメチル化標的 DNA を合成し、蛍光修飾メチル化プローブ DNA とハイブリダイゼーションさせた。100 nM DNA に 100 nM MBD-Nluc を加え、発光基質を添加後、400 - 650 nm の発光・蛍光スペクトルを測定した結果、BRET シグナルが最も高くなる蛍光色素と 5-メチルシトシンまでの最適な距離は 5 塩基であることが示された。次に、メチル化標的 DNA と非メチル化標的 DNA を用いて、メチル化頻度が 0, 25, 50, 75, 100% となる標的 DNA を調整した。この標的 DNA に蛍光修飾メチル化プローブ DNA をハイブリダイゼーションさせ、MBD-Nluc を添加後、BRET シグナルを測定した。その結果、標的 DNA のメチル化頻度依存的に BRET シグナルが増加することが示された。以上の結果より、本手法を用いることでがん抑制遺伝子のメチル化頻度を簡便に測定できることが示唆された。

- 1) W. Yoshida, Y. Baba, I. Karube, *Anal. Chem.*, 88, 9264 (2016)
- 2) W. Yoshida, Y. Baba, K. Banzawa, I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, 990, 168 (2017)
- 3) Y. Baba, I. Karube, W. Yoshida, *Anal. Lett.*, 52, 754 (2019)
- 4) Y. Baba, K. Yamamoto, W. Yoshida, *Anal. Bioanal. Chem.*, 411, 4765 (2019)
- 5) T. Miyata, H. Shimamura, R. Asano, W. Yoshida, *Anal. Chem.*, 95, 3799 (2023)

## DNA 修復 foci を選択的に可視化する新規蛍光タンパク質プローブを用いた動態解析

○伊藤海兎<sup>1</sup>・八塚研治<sup>1</sup>・渡邊愛梨<sup>1</sup>・深田梨沙子<sup>1</sup>・田代有輝<sup>1</sup>・金岡英徳<sup>2</sup>・清中茂樹<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名大院工、<sup>2</sup>愛工大工)

**Visualization and analysis of DNA repair foci using a specific fluorescent protein probe** (Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>1</sup>, Faculty of Engineering, Aichi Institute of Technology<sup>2</sup>) ITO, Kaiji<sup>1</sup>; YATSUZUKA, Kenji<sup>1</sup>; WATANABE, Airi<sup>1</sup>; FUKATA, Risako<sup>1</sup>; TASHIRO, Yuki<sup>1</sup>; KANEOKA, Hidenori<sup>2</sup>; KIYONAKA, Shigeki<sup>1</sup>

真核細胞は、タンパク質合成などの基本的な生物学的プロセスにおいて重要な役割を持つ様々な細胞内小器官を含んでいる。ミトコンドリアなどの典型的なオルガネラが脂質二重膜に囲まれているのに対し、細胞には膜構造を持たないメンブレンレスオルガネラも複数存在している。メンブレンレスオルガネラは、核・細胞質内のタンパク質や RNA の多価相互作用に基づく液-液相分離によって形成され、ダイナミックな挙動を介して生体制御に深く関わっていることが示唆されている。そのため生体機能をより理解する上でメンブレンレスオルガネラの解析は重要であると考えられるが、構成因子が一過的に変化するため解析は難しく未解明な部分も多い。

DNA 修復 foci は核内メンブレンレスオルガネラの一つであり、DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break : DSB) 時に形成され修復経路の選択や複雑な修復プロセスを制御している。DNA 損傷は癌などの重大な疾患へと繋がる可能性があり、その修復を担う DNA 修復 foci についての研究が進められている。一方で、動的な foci 形成を解析し、その形成に関わる因子や foci の機能を明らかにすることは困難であった。そこで本研究では DNA 修復 foci 特異的な可視化を可能とする新たな蛍光タンパク質プローブの開発を行った。DNA 修復 foci の形成にはユビキチン化や SUMO 化などの翻訳後修飾が大きく関与している。DNA 修復 foci の形成因子の一つであり DSB 初期の修復経路の選択を担うタンパク質 RAP80 は、SUMO と相互作用する SIM (SUMO-interacting-motif) を持ち、SUMO-SIM 相互作用によって機能が制御されている。我々は蛍光タンパク質 Venus を分割し、各断片に RAP80, SUMO をそれぞれ融合することで、SUMO-SIM 相互作用に基づくプローブを作製した (Fig. 1)。新たに作製したプローブでは、蛍光タンパク質をそのまま融合した GFP-RAP80 と比較して複合体形成非依存的な蛍光が大幅に減少し、SUMO-SIM 相互作用依存的な蛍光の検出に成功した。さらに、プローブ由来の蛍光シグナルと DNA 損傷マーカーとの局在解析を行った結果、大半のプローブと DNA 損傷部との共局在が確認された。また、RAP80 変異体を用いたプローブを作製し、DNA 修復 foci 形成における RAP80 の各ドメインの役割を明らかにした。

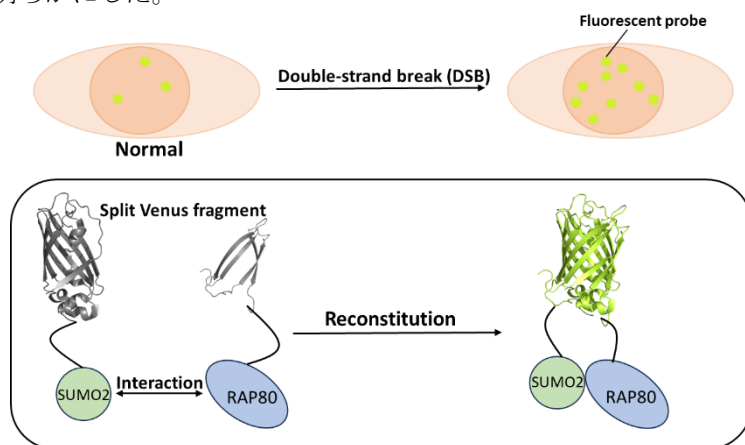


Fig. 1 DNA 修復 foci 選択的に可視化する SUMO-SIM 相互作用に基づいた蛍光タンパク質プローブ

## 代謝型グルタミン酸受容体 1 型の生理機能解明を目指した非侵襲的な in vivo ケモジェネティック制御法の開発

○近藤匠<sup>1</sup>・堂浦智裕<sup>1</sup>・山崎友照<sup>2</sup>・藤永雅之<sup>2</sup>・張 明栄<sup>2</sup>・掛川渉<sup>3</sup>・清中 茂樹<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>名大院工、<sup>2</sup>量子科学技術研究開発機構、<sup>3</sup>慶応義塾大医)

**Development of a non-invasive in vivo chemogenetic method for elucidating the physiological function of metabotropic glutamate receptor subtype 1** (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ<sup>1</sup>, National Institutes for Quantum Science and Technology<sup>2</sup>, Keio University School of Medicine<sup>3</sup>) KONDO, Takumi<sup>1</sup>; DOURA, Tomohiro<sup>1</sup>; YAMASAKI, Tomoteru<sup>2</sup>; FUJINAGA, Masayuki<sup>2</sup>; ZHANG, Ming-Rong<sup>2</sup>; KAKEGAWA, Wataru<sup>3</sup>; KIYONAKA, Shigeki<sup>1</sup>

GPCR はヒトに約 800 種類発現することが知られており、様々な生理現象に関与しているため、様々な疾患に対する創薬標的として注目されている。そのため、この受容体の機能解明は医療や生理現象の理解において、非常に重要である。いくつかの GPCR にはサブタイプ選択的な作用薬が知られており、これを用いることで特定の受容体を任意のタイミングで制御することが可能である。しかし、生体内では同じ受容体が様々な細胞種に発現し、各細胞種で異なる作用を示す。そのため、in vivo で細胞種選択的に特定の受容体を制御する手法が求められてきた。当研究室ではそのような手法として extracellular Loop-Engineered Chemogenetics (eLEC) を提唱している。この手法では、GPCR の細胞外ループ(ECL)に着目し、ここに変異を導入することにより、受容体機能に影響を与えることなく、人工リガンドに対する親和性を変化させることが可能となる。これを利用し、in vivo で細胞種選択的に変異型または野生型 GPCR を発現させることにより、人工リガンドを用いて特定の細胞種に発現する目的 GPCR を制御することが可能になると考えられる。

本研究では代謝型グルタミン酸受容体 1 型(mGlu1)に着目した。小脳や嗅球、視床、海馬等に多く発現しており、運動学習や記憶などに関与していることが知られている。また、mGlu1 選択的なアロステリック阻害剤として FITM が知られており、血液脳関門(BBB)透過性があることや経口投与が可能であることから in vivo での使用に適している。現在までに、mGlu1 の ECL にかさ高いトリプトファンを変異導入した T748W 変異体と、FITM をかさ高く誘導体化した FPET を用いて、野生型を選択的に阻害することに成功している。本発表ではこの野生型選択的な阻害を in vivo に適用し、小脳選択的な mGlu1 の機能解明について報告する。経口投与に向けて、FPET をより水溶性の高い MPET へ最適化を行い、PET プローブ実験によって生体内薬物動態を解析した。また、小脳における mGlu1 の生理機能の解明に向けて MPET により小脳のみを阻害可能な conditional KI マウスを作製した。MPET を処置したこのマウスを用いて行動実験を行うことにより、小脳における mGlu1 の生理機能解析を実施した。

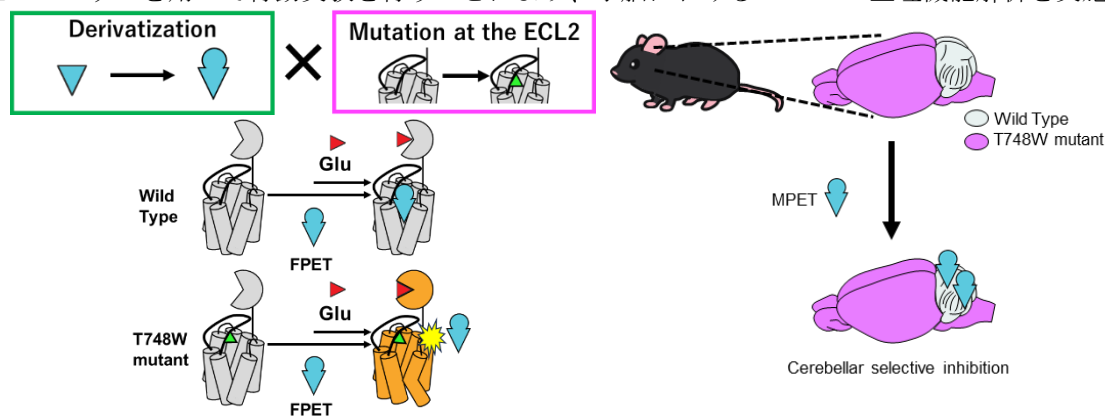


Fig. 1 eLEC による mGlu1 制御(左)と動物個体による細胞種選択的な mGlu1 制御(右)



## 重合可能な細菌性ナノファイバータンパク質の設計と構築

○横江優来<sup>1</sup>・杉本梨緒<sup>1</sup>・南畑孝介<sup>2</sup>・吉本将悟<sup>3</sup>・堀克敏<sup>3</sup>・神谷典穂<sup>2,4</sup>・石川聖人<sup>1</sup>

(長浜バイオ大院<sup>1</sup>、九大院工<sup>2</sup>、名大院工<sup>3</sup>、九大未来化学創造センター<sup>4</sup>)

**Design and construction of polymerizable bacterionanofiber proteins** (Grad. Sch. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. Technol.<sup>1</sup>, Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.<sup>2</sup>, Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.<sup>3</sup>, CFC, Kyushu Univ.<sup>4</sup>) YOKOE, Yuki<sup>1</sup>; SUGIMOTO, Rio<sup>1</sup>; MINAMIHATA, Kosuke<sup>2</sup>; YOSHIMOTO, Shogo<sup>3</sup>; HORI, Katsutoshi<sup>3</sup>; KAMIYA, Noriho<sup>4</sup>; ISHIKAWA, Masahito<sup>1</sup>

人類文明の発展において商業用繊維素材の開発と普及は重要な役割を果たしてきた。しかし近年では世界的な脱炭素社会実現の観点から、化石燃料由来の化学合成繊維に替わる再生可能な繊維素材の開発が求められている。*Acinetobacter* sp. Tol 5 の細胞表面に存在するナノファイバータンパク質 AtaA は 3630 アミノ酸残基から構成され、複数のドメイン構造を有する<sup>1</sup>。AtaA は強靱性と柔軟性といった力学的特性を有しており<sup>2</sup>、繊維素材創出のための基盤材料として活用できる可能性がある。しかし、その大きさは約 200 nm 程度で短く、Tol 5 株の細胞表面に生えているタンパク質であることから生産量も極めて限定的である。よって、材料化には AtaA タンパク質の大量生産方法と、それらを繋ぎ合わせて巨大化させる検討が必要がある。本研究では組換え AtaA タンパク質を大腸菌細胞内で大量生産し、その精製方法の確立及び精製タンパク質の重合体形成条件の検討を目的とした。

AtaA タンパク質を連結し、巨大化させるためにタンパク質間の連結を可能にする Y-Loop 配列<sup>3</sup>を両末端に有する Y-Loop-AtaA を設計した (図 1)。Y-Loop-AtaA 組換え大腸菌を 1L の LB 培地で培養し、超音波破碎した後、その可溶性画分を熱処理・硫酸分画・ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製物の SDS-PAGE により、目的タンパク質を高純度で得ることができた。精製タンパク質を CD スペクトルにより確認したところ、AtaA の特徴的な二次構造に由来する曲線が得られたことから、天然の AtaA と類似のフォールディング状態の組換えタンパク質を構築できたと考える。次に、得られた精製タンパク質の重合反応条件の

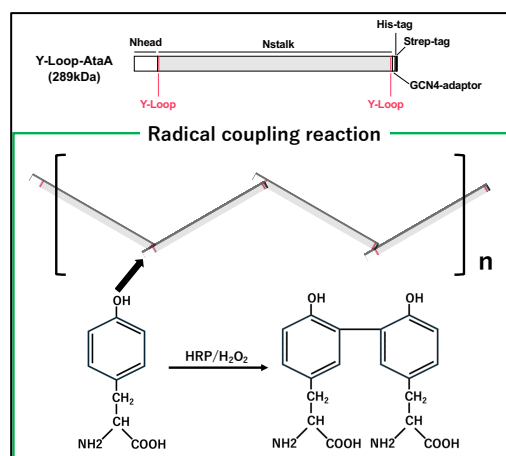


図 1. Y-Loop-AtaA とその重合反応の模式図

検討を行った。先行研究のチロシン残基間のラジカルカップリング反応を参考にし、精製タンパク質溶液に西洋わさびペルオキシダーゼと過酸化水素を添加し 2 時間反応させた。反応後、サンプルを SDS-PAGE で解析すると Y-Loop-AtaA 同士が連結し重合体になっている様子がバンドで確認できた。また精製タンパク質の濃縮方法による重合結果の違いを比較したところ、限外濾過膜による濃縮が AtaA タンパク質同士を近接させ効果的な重合体形成に寄与している可能性が示唆された。

[1] Ishikawa M *et al.*, *PLoS One.*, 7, 11, e48830(2012)

[2] Koiwai K *et al.*, *J Biol Chem.*, 291, 3705-3724(2016)

[3] Permana D *et al.*, *ACS Omega.*, 5, 5160-5169(2020)



## 人工細胞バイオフィルムの創出に向けたプログラム可能な凝集性リポソーム

○杉本 梨緒<sup>1</sup>・横江 優来<sup>1</sup>・吉本 将悟<sup>2</sup>・堀 克敏<sup>2</sup>・石川 聖人<sup>1</sup> (<sup>1</sup>長浜バイオ  
院バイオ、<sup>2</sup>名大院工)

**Programmable cohesive liposomes for bottom-up creation of artificial cellular biofilms** (Graduate School of Bioscience, Nagahama Inst. Bio-Sci. Technol.<sup>1</sup>, Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.<sup>2</sup>) SUGIMOTO Rio<sup>1</sup>; YOKOE Yuki<sup>1</sup>; YOSHIMOTO Shogo<sup>2</sup>; HORI Katsutoshi<sup>2</sup>; ISHIKAWA Masahito<sup>1</sup>

複雑な生物システムの理解に向けた人工細胞の研究が活発化している。ここでの人工細胞とは、生物機能の一部を発揮する膜小胞のことであり、リポソームは最も多く利用される。しかし、これまでに構築された人工細胞としてのリポソームの多くは、単細胞として機能するものであり、高等生物やバイオフィルムのように多細胞で機能するものはほとんどない。バイオフィルムは生きた微生物の集合体である。バイオフィルムを形成することで環境ストレスに対する頑強性を高めたり、高密度に集合することで物質変換効率を高めたりすることが知られている。単細胞の微生物はバイオフィルム中で多細胞化することにより高機能化しているといえる。本研究グループは、本来は生きた微生物の集合体であるバイオフィルムを、人工細胞による分子システムとしてボトムアップ構築することを目指している。本研究ではその第一歩として、細菌サイズのリポソームを任意に凝集させる方法の検討を行った。

以前、我々の研究グループは「何にでもくっつくことのできる人工細胞」の構築に成功した<sup>1</sup>。これは、接着性ナノファイバータンパク質 AtaA に SNAP タグを融合させたものと、リポソームにベンジルグアニン (BG) 誘導体を付与したものを反応させることで、微生物付着という機能を再現したものである。本研究では、特定のリポソーム同士を凝集させるために、Glass ら<sup>2</sup>が構築したナノボディと抗原のペアに SNAP タグを融合し、SNAP タグ融合ナノボディおよび SNAP タグ融合抗原を構築した。大腸菌発現系において、SNAP タグ融合ナノボディの大部分は封入体を形成したため、封入体からのリフォールディングを試み、SNAP タグとナノボディの両活性を回復した精製タンパク質を得ることに成功した。また、SNAP タグ融合ナノボディまたは SNAP タグ融合抗原で修飾したリポソーム同士を混合することで、抗原抗体反応によるリポソーム同士の凝集体形成を試みた (図1)。フローサイトメトリーや共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析したところ、特異的なリポソーム同士の集合による凝集体形成を示す結果が得られた。

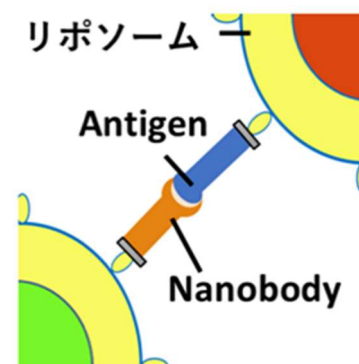


図1 抗原抗体反応によるリポソーム凝集のイメージ図

1. Noba K. *et al.*, *J Am Chem Soc.* 141, 48, 19058-19066 (2019)
2. Glass D.S. *et al.*, *Cell*, 174, 3, 649-658 (2018)

## ヒスチジンの触媒作用を利用した化学・位置選択的セリン修飾法の開発

○増井綾香・笠原彰友・山次健三（千葉大院薬）

**Serine-selective modification based on the catalytic ability of histidine** (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba Univ.) MASUI, Ayaka; KASAHARA, Akitomo; YAMATSUGU, Kenzo

アミノ酸の連結により構成されるタンパク質は生命活動の根幹をなす生体高分子であり、その機能解析および機能改変を可能とする化学変換技術が求められている。多種多数の極性官能基を有するタンパク質は、水中・中性・37℃の条件で取り扱う必要があり、現代の有機合成技術をもってしても未だ困難な対象である。特にタンパク質中の特定の位置にあるアミノ酸のみを修飾する、化学・位置選択的な修飾が課題となっている。これまでにリジン残基やシステイン残基といった求核性の高いアミノ酸残基の修飾が多数報告されているが、その反応性の高さゆえに位置選択性の実現は困難であった。

そこで本研究では、反応性の比較的低いセリン残基をターゲットとするタンパク質の化学・位置選択的な修飾法の開発を目指した(図1)。種々のアミノ酸配列を持つモデルペプチドと求電子剤の検討の結果、近傍ヒスチジン残基の触媒作用によってセリン残基のアシル化が可能になることを見出した。さらに、システイン残基を介するチオール-チオエステル交換反応と組み合わせることで、チオエステル誘導体をアシル化剤とするセリン残基のアシル化に成功した。本反応は、システインからヒスチジン、ヒスチジンからセリンへの多段階アシルトランスファーによって進行するものと想定している(図2)。本アプローチはタンパク質の位置選択的ラベル化や均質抗体薬物複合体合成の有効なツールへと発展可能であると期待される。

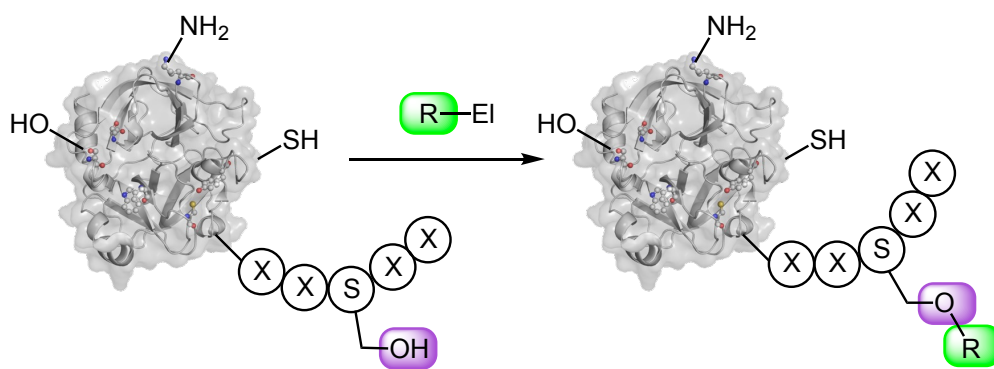


図1 本研究の目的：化学・位置選択的なタンパク質のセリン修飾

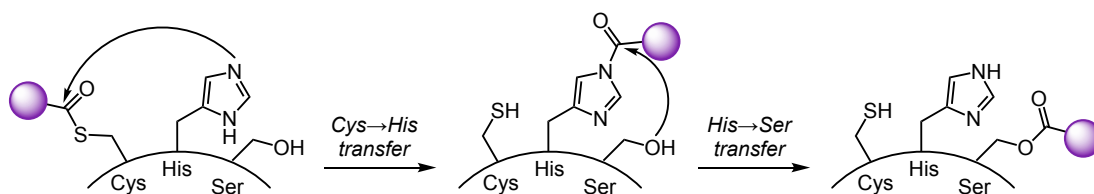


図2 システイン-ヒスチジン-セリン間の多段階アシルトランスファー

### 3D ドメインスワッピングで多量化する抗体軽鎖可変領域の探索と多量化への銅イオンの影響

○酒井 隆裕<sup>1</sup>、山口 将平<sup>1</sup>、真島 剛史<sup>1</sup>、小林 直也<sup>1</sup>、段 練<sup>2</sup>、藤木 涼<sup>2</sup>、Kowit Hengphasatporn<sup>2</sup>、重田 育照<sup>2</sup>、緒方 英明<sup>3</sup>、一二三 恵美<sup>4</sup>、宇田 泰三<sup>5</sup>、廣田 俊<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 奈良先端大先端科技、<sup>2</sup> 筑波大計算科学研究センター、<sup>3</sup> 兵庫県大院理、<sup>4</sup> 大分大研究マネジメント機構、<sup>5</sup> 九州先端研ナノテク)

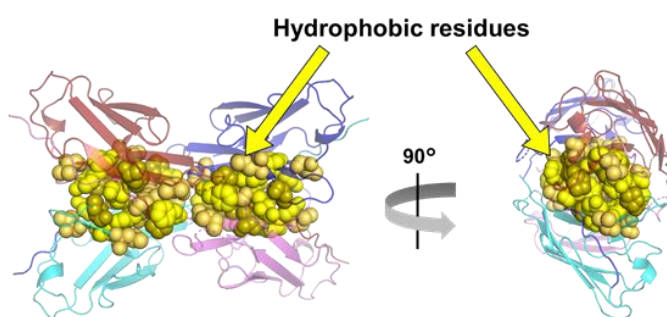
**Search of oligomerizable antibody light chains through 3D domain-swapping and effect of copper for the oligomerization** (Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST<sup>1</sup>, Cent. Comp. Sci., Univ. Tsukuba<sup>2</sup>, Grad. Sch. Sci., Univ. Hyogo<sup>3</sup>, Inst. Res. Mgmt., Oita Univ<sup>4</sup>, Nano-tech Lab., ISIT<sup>5</sup>) SAKAI, Takahiro<sup>1</sup>, YAMAGUCHI, Shohei<sup>1</sup>, MASHIMA, Tsuyoshi<sup>1</sup>, KOBAYASHI, Naoya<sup>1</sup>, DUAN, Lian<sup>2</sup>, FUJIKI, Ryo<sup>2</sup>, KOWIT, Hengphasatporn<sup>2</sup>, SHIGETA, Yasuteru<sup>2</sup>, OGATA, Hideaki<sup>3</sup>, HIFUMI, Emi<sup>4</sup>, UDA, Taizo<sup>5</sup>, HIROTA, Shun<sup>1</sup>

医薬品に幅広く利用されている抗体は不安定で会合しやすく、凝集により抗原を補足能力が低下する場合が多い。しかし、抗体の会合状態について原子レベルで調べた研究は限られている。我々は、ヒト抗体軽鎖#4 の可変領域 (V<sub>L</sub>) において、3D ドメインスワッピング (3D-DS) による 2 量体がさらに 2 量化して 4 量体を形成することを原子レベルでの立体構造から明らかにした (Fig. 1)<sup>1</sup>。本研究では、V<sub>L</sub> (#4) の 3D-DS 2

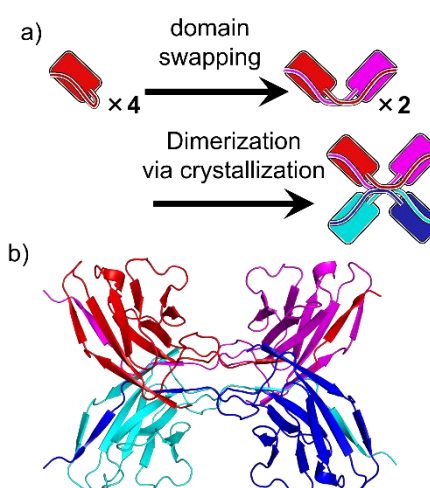
量体間の相互作用と構造安定化に重要と考えられるアミノ酸残基が多く保存された V<sub>L</sub> をデータベースから探索したところ、抗体軽鎖可変領域 P1V<sub>L</sub> が見つかり、その会合挙動を調べた。さらに、抗体様タンパク質 β-2-microglobulin の会合体形成が金属イオン添加により促進することが報告されており、銅イオン添加による P1V<sub>L</sub> の多量体形成の影響を調査した。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、P1V<sub>L</sub> は溶液中において多量体を形成し、単量体と多量体の平衡状態で存在することが見出された。次に、P1V<sub>L</sub> に 2 当量の銅イオンを添加したところ、多量体の割合が約 5% から約 20% に増加した。また、SEC により単離した単量体と多量体は、非還元 SDS-PAGE において、いずれも単量体の位置にバンドが確認され、多量体は非共有結合により形成されることが示された。銅イオン存在下での SEC-MALS 測定により、P1V<sub>L</sub> 多量体は 2 量体であることが明らかになった。P1V<sub>L</sub> 2 量体の X 線結晶構造では、P1V<sub>L</sub> は 3D-DS により 2 量体を形成し、2 量体がさらに 2 量化して 4 量体を形成することが明らかになった (Fig. 2)。本研究では、#4 以外のヒト抗体軽鎖で 3D-DS による多量体構造を明らかにし、抗体軽鎖の 3D-DS による多量化の一般性を示した。今回得られた情報をもとに 3D-DS による抗体の凝集を阻害できれば抗体の品質向上に繋がる。また、本現象は新しい抗体作製法としても期待される。

1. Sakai, T. et al., *Nat. Commun.*, **14**, 7807 (2023).



**Figure 1.** Tetrameric structure of V<sub>L</sub> (#4).



**Figure 2.** a) Tetramerization mechanism of P1V<sub>L</sub>, b) Crystal structure of P1V<sub>L</sub> (Resolution: 2.0 Å).

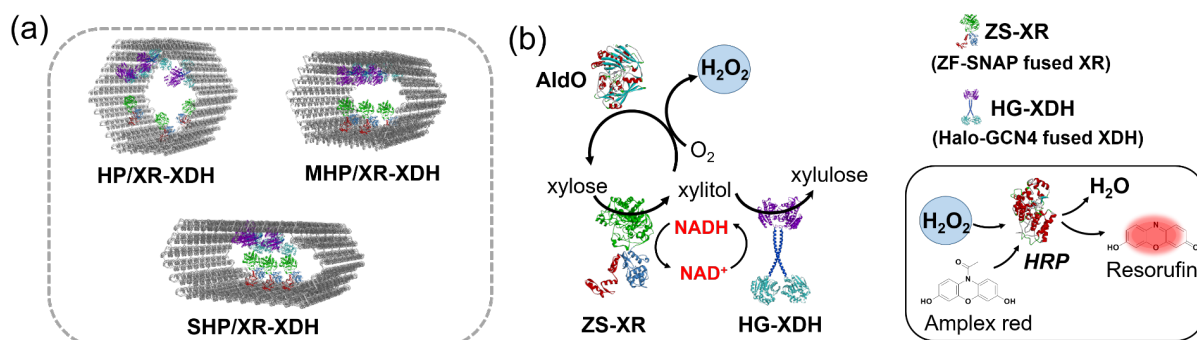
## DNA 折り紙コンパートメント内の人工代謝経路

OLin Peng<sup>1</sup>・Yang Hui<sup>2</sup>・中田 栄司<sup>1</sup>・森井 孝<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>京都大学エネルギー理工学研、  
<sup>2</sup>京都大学大学院エネルギー科学研究科、<sup>3</sup>京都光華女子大学)

**Artificial metabolic pathways in DNA origami-based compartments** (<sup>1</sup>Institute of Advanced Energy, Kyoto Univ., <sup>2</sup>Graduate School of Energy Science, Kyoto Univ., <sup>3</sup> Department of Health and Nutrition, Kyoto Koka Women's Univ.) LIN, Peng;<sup>1</sup> YANG, Hui;<sup>2</sup> NAKATA, Eiji;<sup>1</sup> MORII, Takashi<sup>1,3</sup>

DNA origami is a technique that fold a long single-stranded DNA with short DNA short staple strands into the pre-design two-dimensional (2D) or 3D DNA nanostructures.<sup>1,2</sup> With the advantages of precise addressability, DNA nanoscaffolds provide the superior platforms for the spatial organization of biomolecules such as enzymes. In this study, DNA origami-based compartments were constructed to for implementing efficient metabolic pathways.

The DNA scaffolds of hexagonal prism (HP), medium HP (MHP), and shallow HP (SHP) were prepared by the DNA origami method (Fig. 1a).<sup>3</sup> The cascade enzymes of xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH) were spatially co-assembled in the DNA compartment with precise control over the enzyme stoichiometry, and inter-enzyme distance by the modular adaptor method.<sup>4</sup> XR and XDH were encapsulated in the closed states of HP, MHP, and SHP with an estimated inter-enzyme distance of 18 nm, 10 nm, and 4 nm, respectively (Fig. 1a). To evaluate the free diffusion of intermediates, alditol oxidase (AldO) was used as a competing enzyme for XDH. Xylitol was consumed by AldO to produce xylose and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which was detected by a horseradish peroxidase-coupled enzyme assay (Fig. 1b). The production of xylulose was analyzed by HPLC by coupled with the xylulose kinase. We systematically studied the cascade reactions of enzymes in DNA-based compartments. These systems provide the fundamental insights into the cellular environment for enzyme reactions and offer novel strategies for constructing artificial compartments.



**Figure1.** (a) Scheme of the DNA scaffold of HP, MHP and SHP encapsulated with enzymes. (b) The cascade reaction of XR and XDH, and the competitive reaction of alditol oxidase (AldO).

- 1) P. W. K. Rothmund, *Nature*, **440**, 297 (2006)
- 2) S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature*, **459**, 414 (2009)
- 3) P. Lin, H. Dinh, Y. Morita, E. Nakata, T. Morii, *Adv. Funct. Mater.*, **33**, 2215023 (2023)
- 4) E. Nakata, H. Dinh, T. A. Ngo, M. Saimura, T. Morii, *Chem. Commun.*, **51**, 1016 (2015)



## 自律的な膜増殖によって進化する人工細胞の構築に向けて –膜合成系におけるリゾリン脂質アシルトランスフェラーゼの探索–

○瀬尾海渡・Liam M Longo・松浦友亮（東工大 地球生命研究所）

**Towards construction of autonomously evolving artificial cells by self-membrane synthesis: Exploring lysophospholipid acyltransferases for membrane synthesis systems** (Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology) SEO, Kaito; LONGO, M. Liam, MATSUURA, Tomoaki

人工細胞の開発は生命現象の理解やバイオテクノロジー創出といった複数の側面から重要な課題である。細胞が持つ要素の一つである膜は細胞の自己と外界の区別という役割の他、分裂を通して生命の特徴である自己複製を可能とする。生命は自ら膜と遺伝情報を複製することで進化するが、同様の機能を合わせ持つ人工細胞が作られた例はない。膜を自身で合成する能力に遺伝情報の複製能力を組み合わせれば、遺伝情報に基づいた膜増殖によって自律的に進化する人工細胞を作ることができる。本研究ではこの自律進化する人工細胞の構築に必要な膜合成系の開発を目的とした。

リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ (LPLAT) は脂肪酸アシル CoA とリゾリン脂質からリン脂質を合成する反応を触媒する膜タンパク質である。LPLAT は真核生物ではリン脂質の脂肪酸鎖を付け替えるリモデリング経路、細菌では主にホスファチジン酸 (PA) の合成経路で使われている。人工細胞においても LPLAT を用いた膜合成系によって自身の膜を合成する例が報告されている (Eto S., *et al.*, *Commun Biol.* 2022, Blanken D., *et al.*, *Nat Commun.* 2020)。これまでに人工細胞で再構成された膜合成経路は複雑すぎる (Eto S., *et al.*, *Commun Biol.* 2022, Blanken D., *et al.*, *Nat Commun.* 2020)、あるいは自発的の反応に依存するために膜合成機能が遺伝情報と結びついていない (Bhattacharya A., *et al.*, *J Am Chem Soc.* 2021)、などの問題があり、遺伝情報を介した進化を行うのは困難であった。ここで自発的の反応を LPLAT による酵素反応に置き換えることで、進化を可能とする単純な膜合成経路が構築できると考えた (図 1)。しかし既に活性が調べられている LPLAT は目的の活性を持たないものや *in vitro* での発現に不向きなものなどが多く、膜合成系の作成に適していない。

そこで本 膜合成経路に使用する LPLAT の条件として、無細胞翻訳系による発現を前提にするため修飾が少ないことで知られる①細菌由来であること、そして安定な膜が生じるために産物が②ホスファチジルコリン (PC) であることが挙げられる。しかし細菌では LPLAT は主に PA を合成しており、PC を作る細菌由来 LPLAT はわずか 3 つしか確認されていない (Zhang Y., *et al.*, *Trends Microbiol.* 2023)。そこで我々は

既知の LPLAT 配列を解析することで、①と②の条件に合致する LPLAT を探索することを目的とした。真核生物では PC 合成酵素を含む基質特異性が低い LPLAT が見つかっていることから、PC を合成できる細菌由来 LPLAT も配列情報のみが知られている可能性がある。まずタンパク質のファミリーやドメインのデータベースである InterPro から LPLAT のドメインを含むタンパク質配列を約 21 万個取得した。しかしこのままでは配列数が多く、全体像を掴むこともままならない。そこで配列数を減らすため、代表生物種をまとめたデータベースである GTDB (Genome Taxonomy Database) と EukProt を参照し、代表生物種が持つ LPLAT 配列を抽出した。次に抽出した配列を元に、配列類似性に基づいたネットワーク構造を生成する SSN (sequence similarity network) によって LPLAT 配列の類似性を可視化した上で配列解析を行なった。本発表では解析の結果に基づいて選択した LPLAT の代表遺伝子と、それらが無細胞翻訳系で発現させた際の活性を元に再構成する膜合成系について議論したい。

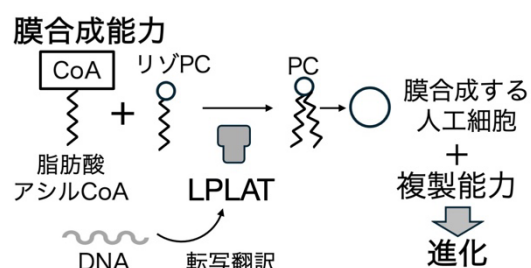


図 1. 本研究の概要

## 微小ゲルビーズを人工区画として利用する架橋酵素選抜系の構築

○折田兼成<sup>1</sup>・古賀大晴<sup>1</sup>・大川優生<sup>1</sup>・伊藤 智之<sup>3</sup>・南畑孝介<sup>1</sup>・梅津 光央<sup>3</sup>・神谷典穂<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>九州大学大学院工学研究院、<sup>2</sup>九州大学未来化学創造センター、<sup>3</sup>東北大学工学研究科)

**High-throughput screening system for active mutants of crosslinking enzyme by combining hydrogel beads and cell-free protein synthesis** (<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, Graduate School of Engineering,) ORITA, Kensei<sup>1</sup>; KOGA, Taisei<sup>1</sup>; OKAWA, Yui<sup>1</sup>; ITO, Tomoyuki<sup>3</sup>; MINAMIHATA, Kousuke<sup>1</sup>; UMETSU, Mitsuo<sup>3</sup>; KAMIYA, Norihiro<sup>1,2</sup>

### 【目的】

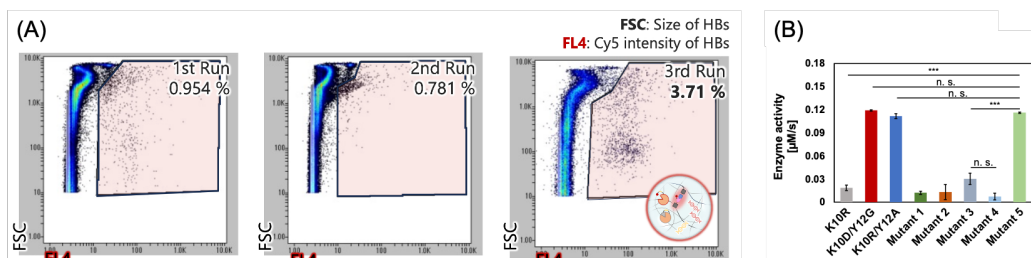
酵素（生体触媒）は持続可能な社会の構築を担う触媒の有力な候補であるが、天然由来の酵素の多くは、その実用化に際して活性や安定性が不十分なことが多く、利用範囲に制限が生じる。そこで、望みの機能を発現する酵素を迅速に選抜する様々な提案がなされている<sup>1)</sup>。当研究室ではハイドロゲルビーズ (HBs) と無細胞タンパク質合成 (CFPS) を組み合わせた新規酵素選抜系の構築を目標としている。本発表では、架橋酵素の一種である微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) をモデルとした選抜系の構築と得られた変異体の機能評価について報告する。

### 【方法】

ゲル基材 (8 分岐型 PEG-SH)、CFPS 試薬、ランダム変異を導入した MTG の遺伝子断片、蛍光ペプチド基質を内包した Water-in-Oil エマルションを作製し、内水相中での CFPS とゲル化により、MTG 内包 HBs を作製した。内包された MTG の触媒活性に基づき蛍光染色された HBs を、On-chip Sort を用いて選抜し、回収された HBs の集団に還元剤を添加して HBs を崩壊することで、内包酵素由来の遺伝子を回収した。回収遺伝子を次世代シーケンサー (NGS) を用いて解析し、得られた幾つかの高活性候補変異体を大腸菌で発現・精製し、架橋活性を評価した。

### 【結果と考察】

MTG の選抜において、選抜を繰り返すにつれて蛍光染色された HBs 集団が増加したことから、高活性な MTG 変異体を内包する HBs 集団が濃縮されたことが示唆された (Fig. 1 (A))。また、NGS 解析の結果、酵素活性に影響を与える領域にアミノ酸置換が入った変異体の選択的な濃縮が明らかとなった。これらの変異体の活性を評価したところ、高活性な新規 MTG 変異体が存在することが明らかとなったことから、本選抜系の有効性が示された (Fig. 1 (B))。



**Fig. 1 (A) Results of cell sorting in each round (B) Assessment of the activity of novel mutants.**

【参考文献】 1) Markel U. *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 49, 233-262 (2020).

【謝辞】本研究は JSPS 科研費 JP19H00841, JP23H00247 ならびに国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託業務の助成を受けたものです。



## 抗原テンプレート反応におけるリンカー部分の影響

○秋葉宏樹<sup>1,2</sup>・西山健太郎<sup>1</sup>・鎌田春彦<sup>1,2</sup>・大野浩章<sup>1,2</sup>

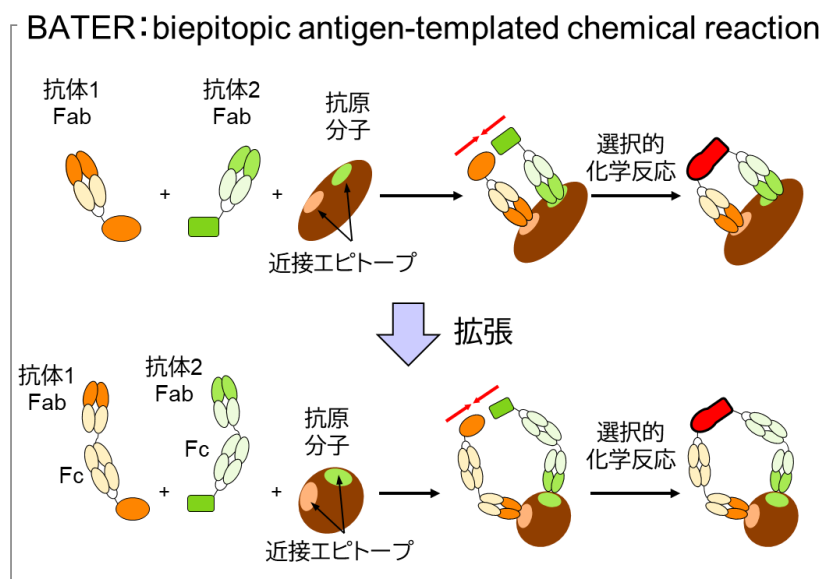
(<sup>1</sup>京大院薬、<sup>2</sup>医薬健栄研)

**Influence of the linker on biepitopic antigen-templated chemical reactions** (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ.<sup>1</sup>, NIBIOHN<sup>2</sup>) AKIBA, Hiroki<sup>1,2</sup>; NISHIYAMA, Kentaro<sup>1</sup>; KAMADA, Haruhiko<sup>1,2</sup>; OHNO, Hiroaki<sup>1,2</sup>

テンプレート反応は鑄型分子の存在下で近接効果を得て大きく加速される化学反応である。我々は近年、2つの異なるエピトープに結合する抗体を利用することで抗原蛋白質を鑄型分子とする、biepitopic antigen-templated chemical reaction (BATER)を新たなテンプレート反応として開発してきた<sup>[1]</sup>。BATERは抗原存在下での生体直交性反応の大幅な加速を特徴とする。初期の検討においては、TNFR2の細胞外ドメインに結合する3つの抗体に由来する抗原結合フラグメント (Fab) を取得し、そのC末端ジスルフィド結合に対して選択的に 3-azidocoumarin と bicyclononyne を修飾した。これらを TNFR2 と共存させると、隣接するエピトープに結合する抗体ペアを利用した際に反応が観察された。また、クリック反応基と修飾部の間のポリエチレングリコール (PEG) リンカーを最長 24 ユニットまで伸長すると、長いものほど反応が加速された。この長さの PEG リンカーが自由運動する場合の末端間距離は約 2.5 nm であり、抗原結合時に Fab の C 末端が約 3 nm の距離に位置する 2 つの Fab 間の反応加速には十分であると考えられた<sup>[1]</sup>。

次いで、Her2 の細胞外ドメインに結合する抗体群を利用した BATER を検討対象とした。しかしこの場合においては、エピトープの近接する抗体ペア (MF3958, 39S) を利用しても、反応の進行はわずかに観察されるのみであった。この組み合わせでは、抗原結合時に Fab の C 末端が約 7 nm の距離に位置するため、PEG リンカーが十分に伸展した状態でないと届かない。これを解決するために、天然の抗体構造の Fc 領域をもつ Fab-Fc 構造に置き換え、Fc の C 末端に選択的に官能基導入を実施した。その結果、Fc が比較的自由度の低いリンカー様のふるまいをみせることで、BATER による反応の加速が観察された。以上より、BATER にはエピトープに依存して適切な長さのリンカー設計が求められるが、Fc のような蛋白質ドメインを利用することでこれが容易になると示された。

[1] Nishiyama, K. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, e202306431.

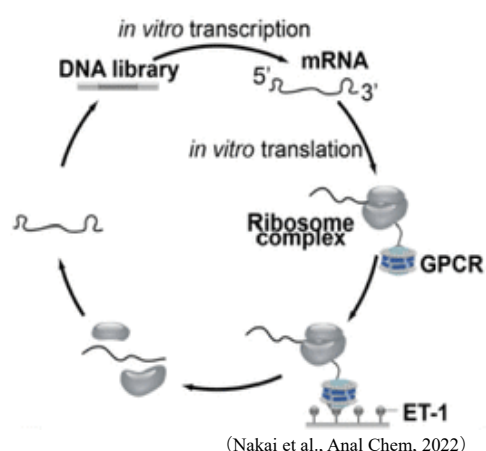


## リボソームディスプレイ法によるエンドセリン受容体 B 型の熱安定性変異体の探索

○西垣遥<sup>1</sup>・村田武士<sup>2</sup>・安田賢司<sup>2</sup>・福永圭佑<sup>3</sup>・松浦友亮<sup>3</sup> (<sup>1</sup>東工大院、生命理工、<sup>2</sup>千葉大院、理学部、<sup>3</sup>東工大、地球生命研究所)

**Exploration of thermostabilized human endothelin type b receptor (ETBR) mutants by ribosome display.**  
(School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology<sup>1</sup>, Graduate School of Science, Chiba University<sup>2</sup>, Earth Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology<sup>3</sup>) NISHIGAKI, Haruka<sup>1</sup>; MURATA, Takeshi<sup>2</sup>; YASUDA, Kenji<sup>2</sup>; FUKUNAGA, Keisuke<sup>3</sup>; MATSUURA, Tomoaki<sup>3</sup>

【背景及び目的】 進化分子工学は、生物が繰り返してきた突然変異と選択/淘汰の進化サイクルを模倣し、実験室内で核酸やタンパク質などの機能を改変・改良する手法である。これまで、膜タンパク質に *in vitro* 進化分子工学を適用することは困難であったが、近年本グループは、無細胞翻訳系の 1 つである PURE system に Nanodisc を加えることで膜タンパク質を可溶化させ、複数の G タンパク共役型受容体 (GPCR) に対して進化工学的手法の 1 つであるリボソームディスプレイ法 (RD 法) を適用できることを報告した (Nakai et al., Anal Chem, 2022)。GPCR の変異体はバイオセンサー開発や創薬研究に有用であるが、その取得には多くの試行錯誤が伴い、ハイスループットスクリーニングが可能な RD 法による獲得はこれまで報告されていない。そこで本研究では、endothelin type b receptor (ETBR) の熱安定性変異体の獲得を目的とし、ライブラリーの合理的設計と熱を選択圧としたセレクション系の構築を行った。



【結果及び考察】 ETBR ライブラリーの設計は、生体膜のエントロピーに着目して自由エネルギー関数を用いるエントロピー基盤法 (Yasuda et al., J Phys. Chem. B, 2016) を適用し、ETBR の熱安定性に寄与する可能性が高いアミノ酸残基を計算・予測した。それらの結果を元に変異導入箇所を 5 つ定め、飽和変異ライブラリーを作製した。構築したライブラリーを次世代シーケンサー (NGS) で解析し、変異導入した全 5 ヶ所が 20 種類のアミノ酸にほぼ均等に置換されていることが確認できた。

RD 法では、mRNA・リボソーム・タンパク質の三者複合体を形成させる必要があるが、この複合体が熱処理に耐えうるか不明であった。そこで、既報 ETBR の熱安定性変異体 (ETBY5) (Okuta et al., J Mol. Biol, 2016) を用いて、三者複合体の熱安定性を評価した。リボソームにディスプレイされた ETBY5 を 50 度で 15 分間処理した後、リガンドによる ETBY5 の回収を行ったところ、mRNA の共回収も確認された。これらの結果から、熱処理に対しても三者複合体は安定であり、熱耐性を指標とした膜タンパク質の指向性進化に RD 法が適用可能であることが示唆された。

【将来展望】 今後は、作製した飽和変異ライブラリーを用いて *in vitro* 進化実験を行う。その際、ラウンドごとに熱処理等の選択圧を最適化し、より熱安定性の高い変異体の獲得を目指す。各ラウンドで回収した mRNA の配列解析を行い、ETBR 変異体の同定する予定だ。そして ETBR 変異体を *in vitro* 合成し、熱安定性やリガンド結合能の評価を行いたいと考えている。

チロシン残基人工糖修飾によるアミロイド $\beta$ の凝集性変化

樋口凜<sup>1</sup>・中根啓太<sup>1</sup>・菊池智子<sup>1</sup>・安田早緒理<sup>1</sup>・池之上達哉<sup>2</sup>・佐藤伸一<sup>1,3</sup>・○  
友重秀介<sup>1</sup>・石川稔<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東北大院生命、<sup>2</sup>東大院理、<sup>3</sup>東北大学際研)

**Pseudo-glycosylation of Amyloid  $\beta$  by Laccase-catalyzed Tyrosine Click Reaction Alters Its Aggregation Property** (Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.<sup>1</sup>, Grad. Sch. Sci, Univ. Tokyo<sup>2</sup>, FRIS, Tohoku Univ.<sup>3</sup>) HIGUCHI, Rin<sup>1</sup>; NAKANE, Keita<sup>1</sup>; KIKUCHI, Tomoko<sup>1</sup>; YASUDA, Saori<sup>1</sup>; IKENOUE, Tatsuya<sup>2</sup>; SATO, Shinichi<sup>1,3</sup>; TOMOSHIGE, Shusuke<sup>1</sup>; ISHIKAWA, Minoru<sup>1</sup>

アルツハイマー病など一部の神経変性疾患では、凝集性のタンパク質がその原因となっている。たとえばアルツハイマー病ではアミロイド $\beta$  ( $A\beta$ ) やタウが該当し、これら凝集性タンパク質は $\beta$ シート構造に富む変性構造へと容易に変化するとともに凝集性を示すようになる (図 A)。変性したタンパク質は多量体であるオリゴマーを経て、繊維状の凝集構造体 (アミロイド繊維) として組織に析出する。このオリゴマーやアミロイド線維が細胞毒性を示す。タンパク質凝集は元の機能に関わらず進行するため、機能調節に立脚した従来の低分子創薬では対応できない標的であり、バイオ医薬品を中心に凝集性タンパク質を克服する新しいアプローチの開発が進められている。我々は、より安価で安定性・動態に優れた合成医薬品による凝集性タンパク質克服の実現を目指している。その戦略として、タンパク質翻訳後修飾の一つであるグリコシル化がタンパク質安定性に影響することに着目した<sup>1</sup>。すなわち、合成化合物を用いて易凝集性タンパク質を人工糖修飾し、タンパク質の凝集性を変化させることができれば、合成医薬品による凝集性タンパク質克服を可能とするアプローチになると考えた。今回、概念実証として我々が開発した酸化酵素ラッカーゼと修飾剤を用いるチロシン修飾反応 (図 B)<sup>2</sup>を採用し、 $A\beta_{40}$ に対する人工的な糖構造の付加と  $A\beta_{40}$  の凝集性の変化を達成したので報告する。

グルコースなど3種類の糖構造を連結した修飾剤をそれぞれ合成し、これらを用いてラッカーゼによる修飾反応を行ったところ、凝集前および凝集後どちらの  $A\beta_{40}$  を用いた条件でも  $A\beta_{40}$  の10番目のチロシン残基 (Y10) が糖修飾されることを確認した。糖修飾した凝集前  $A\beta_{40}$  を HPLC で精製し、その凝集性を評価した。アミロイド繊維特異的なセンサー色素であるチオフラビン T (ThT) を用いた凝集過程の経時評価では、未修飾  $A\beta_{40}$  と比較して ThT シグナルの上昇が抑えられる傾向を示した。また、凝集後  $A\beta_{40}$  の糖修飾では、ThT シグナルが経時的に減少し、アミロイド繊維が可溶化することが示唆された。本発表ではより詳細なデータも交え、人工糖修飾による凝集特性の変化について議論する。

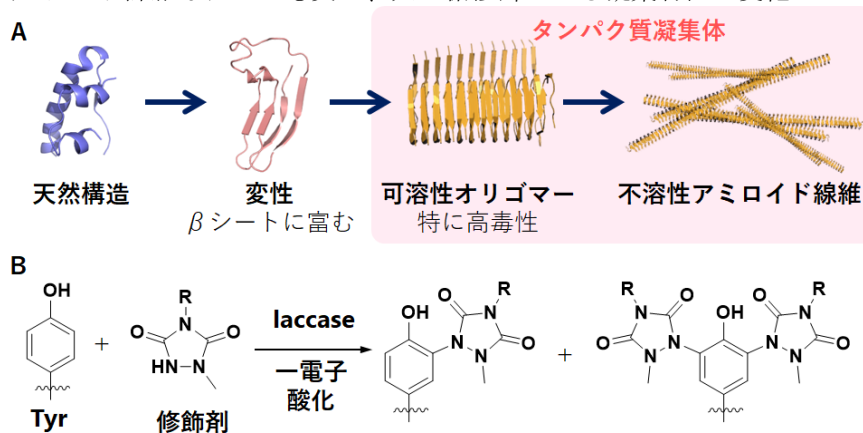


図. A) タンパク質の凝集過程. B) laccase を用いた糖修飾. R に種々の糖構造を導入した.

[1] Mohammed A.H. et. al. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 3, 1164. [2] Sato S., Hatano K., Tsushima M., Nakamura H. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 5871.

## ポリスチレン系樹脂担持型カルコゲン化合物による酸化的タンパク質フォールディングの加速

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

### Acceleration of oxidative protein folding by polystyrene-based resin-supported chalcogenide compounds

(<sup>1</sup>Department of Chemistry, School of Science, Tokai Univ., <sup>2</sup> Institute of Advanced Biosciences, Tokai Univ.)

NISHIZAWA Yuya<sup>1</sup>; ARAI Kenta<sup>1,2</sup>

合成タンパク質が生理活性を発揮するためには、分子内のジスルフィド (SS) 結合の架橋とそれに伴う蛋白質の立体構造形成、すなわち酸化的フォールディングが、必須の工程である。生体内では、小胞体に内在する Protein disulfide isomerase (PDI) が、新生タンパク質の SS 結合を形成促進するとともに、掛け違えた SS 結合を修正する異性化反応も触媒する。このような PDI 触媒活性を低分子有機化合物で模倣することは、バイオ医薬品をはじめとするペプチド系、蛋白質系製剤の生産において極めて重要である。一方、有機合成において、SS 形成反応に用いられる従来の酸化剤および触媒は、化学選択性に乏しいことから SS 結合だけでなく不要な副反応を生じる場合があるだけでなく位置選択的なジスルフィド結合の形成が困難である。加えて、反応後の試薬および触媒の除去には精製工程が必要であり、より簡便な SS 架橋法の開発が望まれる。以前我々は、環状ジセレニド (**1**) が、PDI 様触媒サイクルによってタンパク質の酸化的フォールディングを促進することを報告した (図 1a)。そこで本研究では、化合物 **1** の更なる蛋白質生産への応用性を飛躍させるため、反応後の触媒の除去が簡便な不均一系触媒としてのジセレニド化合物の応用を試みた (図 1b)。

以前に我々が報告した手法に従って、化合物 **1** をポリスチレン系樹脂と縮合し、樹脂担持型ジセレニド化合物 **2** 得た。次に、化合物 **2** の酸化的フォールディング触媒能力を評価するために、好氣的条件下で、6 つのシステイン SH 基を有するヒルジン還元体 (R 体) と化合物 **2** を混合し、反応進行を HPLC を用いて追跡した。化合物 **2** の存在下で、R 体は速やかに SS 中間体へと酸化され、その後、正しい架橋位置に SS 結合を形成した天然型 (N 体) が徐々に生成した。重要なことに、化合物 **2** は不均一系触媒として用いた化合物 **1** よりも良好な触媒活性を発揮し、より迅速に N 体を生成させた (図 2)。ポリスチレン系樹脂が、その疎水的細孔に変性蛋白質が露出させている疎水性アミノ酸残基を取り込むことで、SS 結合の架橋と異性化が速度論的に強化されたものと考えられる。ポスター発表では、詳細な分子メカニズムについて議論する。

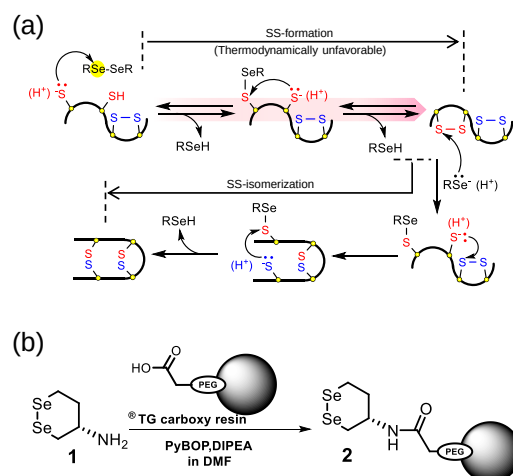


図 1: (a) PDI 様触媒メカニズムによって促進される蛋白質の坂のフォールディング (b) 樹脂担持型ジセレニド化合物 **2** の合成。

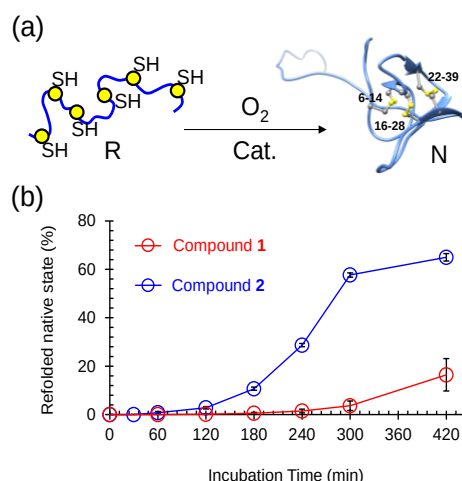


図 2: (a) ヒルジン還元体の段階的な酸化的フォールディング。(b) ヒルジン R 体の酸化的フォールディングにおける N 体の生成速度の比較。



## マルチサブユニット型 CRISPR-Cas システムの細胞内会合制御機構の解析とその応用の可能性

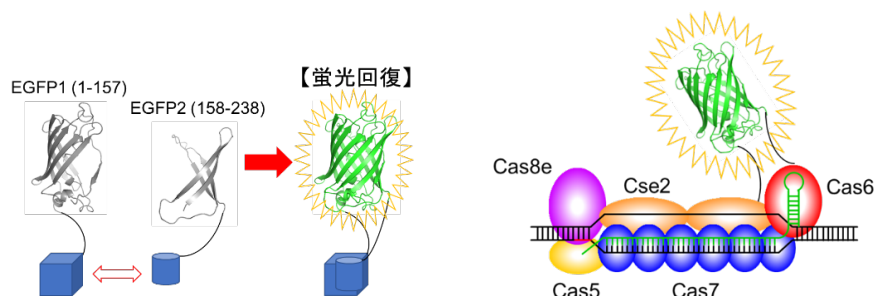
木野晴揮<sup>1</sup>・楳村青央空<sup>1</sup>・濁川清美<sup>1,2</sup>・○野村渉<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>広島大院医系科学、<sup>2</sup>広島大薬)

**Analysis of Assembly Mechanisms of Multi-subunit Type CRISPR-Cas System and its Applications**  
(Graduate School of Biomed. Health Sci., Hiroshima Univ.<sup>1</sup>, School of Pharmaceutical Sci., Hiroshima Univ.<sup>2</sup>)  
KINO, Haruki<sup>1</sup>; Umemura, Aozora<sup>1</sup>; Nigorikawa, Kiyomi<sup>1,2</sup>; NOMURA, Wataru<sup>1,2</sup>

【序論】細菌の防御機構である CRISPR-Cas システムは大きく二つのクラスに分類される。ゲノム編集技術として広く利用されている CRISPR-Cas9 はクラス II に該当し、単一のヌクレアーゼタンパク質とガイド RNA (gRNA) が複合体を形成して標的 DNA を切断する。クラス I に分類される Type I CRISPR-Cas システムは、複数の Cas サブユニットによって構成される”CRISPR-Associated Complex for Antiviral Defense; Cascade”が gRNA と複合体を形成し、さらに Cas3 ヌクレアーゼが作用することで標的 DNA 切断を起こす。CRISPR-Cascade において、Cas サブユニットがヘテロドメイン複合体を細胞内で形成する特徴に着目した場合、任意のタンパク質間相互作用を制御できるプラットフォームとして期待できる。しかし、それぞれの Cas サブユニットの細胞内での存在状態や各サブユニット間での相互作用状態は詳細に解析されてきていない。本研究では、非自己会合型 split EGFP を利用し、各サブユニット間の相互作用状態を緑色蛍光の回復で検出する系（下図）の構築と詳細なサブユニット間相互作用機構の解析を目的とした。

【実験方法】大腸菌由来の Type I-E EcoCascade を構成する 5 種類のサブユニット (Cas5, Cas6, Cas7, Cas8e, Cse2) に NLS (核内移行シグナル) あるいは NES (核外移行シグナル) を付加し、それらの N 末端または C 末端に EGFP (1-157) と EGFP (158-238) を融合させたタンパク質をコードする発現プラスミドを構築した。非自己会合型 split EGFP を用いているため、融合したタンパク質ドメイン同士が相互作用する条件下でのみ蛍光が回復する。分割型 EGFP 融合 Cas サブユニットを細胞内で発現させ、蛍光顕微鏡による蛍光観察と FACS による定量的測定によって細胞内での会合状態を調べた。

【結果・考察】構築した Cas サブユニット発現ベクターと Cas3 ヌクレアーゼ発現ベクター、gRNA 発現ベクターを同時に細胞内に導入した場合に標的遺伝子での DNA 切断が検出されたことから、構築したベクターは Cascade 複合体を正確に形成するサブユニットを確実に発現することが確認された。Cascade 複合体が細胞内で形成される条件下で分割型 EGFP 融合 Cas サブユニットの組み合わせを検討したところ、複数の組み合わせで蛍光回復が確認された。分割型 EGFP 融合 Cas サブユニットのみ発現させた場合にも、複数の組み合わせで蛍光回復が確認され、Cascade 形成条件下と比較して蛍光強度の増大と、蛍光回復を示す細胞数の増加が確認された。特に Cas5 の存在が Cas7 の会合に影響を与えており、この相互作用が Cascade 複合体形成において重要な役割を果たしている可能性がある。核小体で強い蛍光が観察される場合もあり、核小体中の small RNA との相互作用なども今後検討する必要がある。



## PLP-oxidase の変異体を用いた 6-chloroindole-3-acetic acid の生合成のための基盤作成

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

**Creation of a basis library for the biosynthesis of 6-chloroindole-3-acetic acid using mutants of PLP-oxidase**  
(TUAT Dept. Biotechnol. Life Sci.<sup>1</sup>)

SHIOURA Noriyuki<sup>1</sup>; YUZAWA Satoshi<sup>1</sup>; VAVRICKA Christopher John<sup>1</sup>

工業用化学品の生合成は、有機合成よりもコストや環境負荷を抑えることができる。一方で、生合成するための新しい非天然酵素の開発を始めるにあたり、現状多くのコストがかかる。本研究では、非天然化合物の生合成可能な酵素を発見・開発するための機械学習システムを開発し、この問題を解決する。この手法は、基盤酵素の自動選択モジュール、構造に基づく酵素改変モジュール、反復的機械学習モジュールの3つのモジュールからなる。この方法で機械学習に基づく酵素選択とアミノ酸配列の最適化を行うにあたり、最初のトレーニングデータセットとして、変異体ライブラリを反復プロセスにおける初期のトレーニングデータに用いることにより、この機械学習システムを構築する。機械学習を用いた酵素の自動選択とハイスループットスクリーニングを用いた構造に基づく酵素改変を組み合わせた手法により、pyridoxal 5'-phosphate 依存性オキシダーゼ (PLP-oxidase) の変異体を用いて非天然抗がん性プロドラッグである 6-chloroindole-3-acetic acid の生合成に応用する。



## RNA 脱メチル化酵素 FTO のアスコルビン酸依存的な阻害剤

田中和無爲<sup>1</sup>, 西岡 葉李<sup>2</sup>, 田井 章博<sup>2</sup>, 二木史朗<sup>1</sup>, ○今西未来<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京大化研、<sup>2</sup>徳大院創生化学、<sup>3</sup>徳大院社会産業理工)

**Screening of ascorbic acid-dependent inhibitors of RNA demethylase, FTO** (Institute for Chemical Research, Kyoto Univ.<sup>1</sup>, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Tokushima Univ.<sup>2</sup> Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima Univ.<sup>3</sup>) TANAKA, Kamui<sup>1</sup>; NISHIOKA, Shiori<sup>2</sup>; TAI, Akihiro<sup>3</sup>; FUTAKI, Shiroh<sup>1</sup>; IMANISHI, Miki<sup>1</sup>

RNA の化学修飾は、ゲノムから転写された情報を、タンパク質に変換する過程で重要な役割を果たす。特に、高頻度で転写産物に存在する N<sup>6</sup>-メチルアデノシン (m<sup>6</sup>A) は、発生や分化をはじめ、がんなど種々の疾病に関わる。アデノシン N<sup>6</sup>位のメチル化は、METTL3/14 をコアとするメチル基転移酵素複合体によって書き込まれ、また鉄—ケトグルタル酸依存性ジヒドロゲナーゼに属する脱メチル化酵素 FTO および ALKBH5 によって動的に制御されている (図 1)。アデノシンのメチル化状態を人為的に制御する方法の開発は、がん細胞の増殖抑制など治療薬としての展開や、種々の生命現象における RNA メチル化の意義の解明への貢献が期待される。本研究では、脱メチル化酵素 FTO の阻害剤の探索を行った。

FTO 阻害剤のスクリーニングには、m<sup>6</sup>A 感受性の RNA 切断酵素 MazF を用いた in vitro における FTO 酵素活性のハイスループット検出系を用いた (図 2) (Imanishi, et al., *Chem. Commun.*, 53, 12930-12933 (2017))。その結果、キサンチン骨格を有する化合物がヒット化合物として得られた (Tanaka, et al., *Chem. Commun.*, 59, 10809-10812 (2023))。これらは、類似の脱メチル化機構を有する ALKBH5 や DNA 脱メチル化酵素 TET には影響を与えず、FTO 選択的であることが確認された。また、基質や鉄イオン、ケトグルタル酸とは競合しなかった。一方、その阻害活性は、系中に加えられているアスコルビン酸濃度に依存することが明らかになった。一般に鉄—ケトグルタル酸依存性ジヒドロゲナーゼの反応において、アスコルビン酸は抗酸化剤として用いられる。しかし、FTO による m<sup>6</sup>A 脱メチル化反応において、アスコルビン酸を種々の還元剤には置換できないこと、アスコルビン酸が直接 FTO に結合することを見出した。したがって、アスコルビン酸には還元剤としてのみならず、FTO にアロステリックに作用して脱メチル化反応を促進する役割があることが示唆された。キサンチン化合物の FTO 阻害メカニズムの詳細は明らかではないが、これらのヒット化合物の FTO 結合親和性自体はアスコルビン酸の有無によって影響を受けなかったことから、これらの化合物はアスコルビン酸依存的な FTO の活性化を阻害している可能性が考えられる。これらの化合物は、FTO の脱メチル化機構の解明や FTO 選択的作用薬の開発に役立つことが期待される。

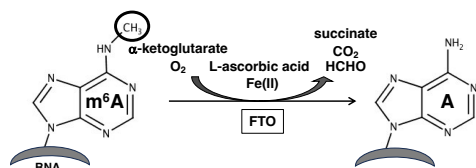


図 1. FTO による m<sup>6</sup>A 脱メチル化

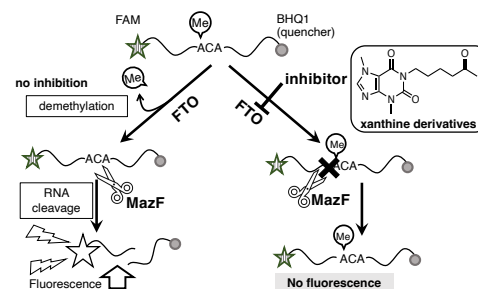


図 2. FTO 阻害剤スクリーニング系

## GlcN-GlcNAc, GlcNAc-GlcN 間ヘテログリコシド結合に対して反応特異性を有するキトサナーゼ活性部位の構築

○小島 摩利子<sup>1</sup>・Mehdi Davari<sup>2</sup>・小野田 晃<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北大院地球環境科学、<sup>2</sup>ライプニッツ植物科学研究所)

**Engineering of the active site of chitosanase hydrolyzing hetero  $\beta$ -1,4-glycosidic linkage between GlcN and GlcNAc** (<sup>1</sup>Faculty of Env. Earth Science, Hokkaido University, <sup>2</sup>Leibniz Institute of Plant Biochemistry)  
KOJIMA Mariko<sup>1</sup>; DAVARI Mehdi<sup>2</sup>; ONODA Akira<sup>1</sup>

### 【緒言】

キトサンはグルコサミン (GlcN) と N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の  $\beta$ -1,4 結合多糖類であり、海洋生物の甲殻や細菌の細胞壁などから取得可能なバイオマス原料として注目されている (図 1a) [1]。分子量 200–数十 kDa の低・中分子量キトサンが持つ抗菌作用や抗酸化作用は GlcN と GlcNAc の重合度と配列に依存すると考えられており、天然のキトサンから均一な機能性キトサンを取得する試みが行われてきた。その一つにキトサンの加水分解酵素キトサナーゼの改変による反応特異性の高い活性中心の創出が注目されているが、高活性と反応特異性を兼ね備えた活性中心の設計指針は確立されていない。そこで本研究では、キトサナーゼの基質結合部位の *in silico* 設計により、ヘテロなグリコシド結合である GlcN-GlcNAc 結合または GlcNAc-GlcN 結合に特異的な変異型キトサナーゼの創出を目指す。基質結合部位に網羅的に変異を導入したモデルのドッキングシミュレーションを行い、結合特異性に基づく *in silico* スクリーニングをもとに、*Bacillus circulans* MH-K1 のキトサナーゼ活性部位の改変と反応性を評価した。

### 【方法と結果】

本研究では、キトサナーゼのキトサンオリゴマー複合体 MD シミュレーションにより、キトサンの結合に関与するアミノ酸 11 残基を特定し、変異箇所の候補とした (図 1b)。これらの残基にランダムで変異を導入したモデルを構築し、ヘテロ結合を持つキトサンオリゴマーと高い親和性を示す変異体をスクリーニングする *in silico* 設計プログラムを作成した。本プログラムは、変異体モデルの構築、ドッキングシミュレーション、スクリーニングの 3 段階で構成され、スクリーニングでは、ドッキングスコア、触媒活性サイトからの基質キトサンオリゴマーの距離、還元末端の向きの 3 条件に基づくフィルタリングを行なった。GlcN, GlcNAc の配置がランダムな 2–4 量体のキトサンオリゴマーを基質分子として *in silico* スクリーニングを行なった結果、8 箇所のアミノ酸が変異箇所として選定され、31 種類の変異体が提案された (図 1c)。これらの変異体を用いた場合の脱アセチル化度や平均分子量が異なるキトサンに対する加水分解反応と、HPLC、LC-MS、NMR による生成物の分析結果を報告する。

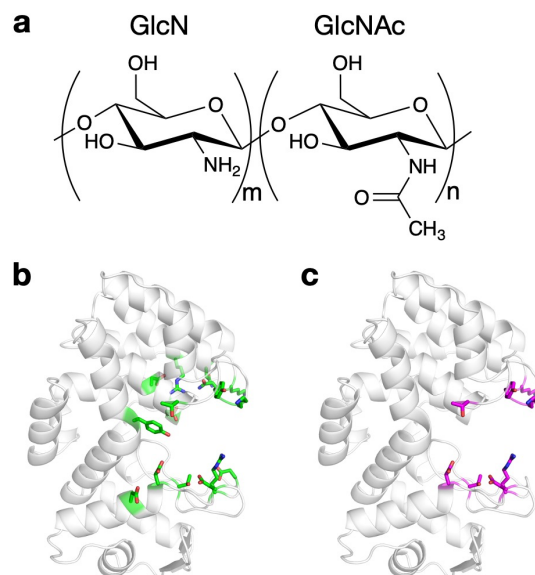


図 1. (a) キトサンの化学構造. (b) MD シミュレーションによって検出されたキトサナーゼ内の基質結合に関与する残基 (PDB ID: 1QGI). (c) *In silico* スクリーニングにより選定された 8 箇所の変異箇所.

[1] S. Lee, *et al.*, *Adv. Mater.* 2023, 35, 2203325

## 転写因子 Sp1 の zinc finger 構造を検出する蛍光タンパク質型バイオセンサーの構築

○田嶋俊介<sup>1</sup>・中田栄司<sup>2</sup>・森井孝<sup>2,3</sup>・桑原淳<sup>1</sup> (<sup>1</sup>同志社女大薬、<sup>2</sup>京大エネ研、<sup>3</sup>京都光華女子大学健康科学部)

**Construction of auto-fluorescent protein-based biosensor visualizing zinc finger structure of transcription factor Sp1** (Fac. Pharm. Sci., Doshisha Women's Col.<sup>1</sup>, Inst. Adv. Energy, Kyoto Univ.<sup>2</sup>, Dept. health and Nutr., Kyoto Koka Women's Univ.) TAJIMA, Shunsuke<sup>1</sup>; NAKATA, Eiji<sup>2</sup>; MORII, Takashi<sup>2,3</sup>; KUWAHARA, Jun<sup>1</sup>

Sp/KLF family に属するユビキタス転写因子 Sp1 は、代表的な DNA 結合モチーフである C2H2 zinc finger を 3 個有し、核内で胚発生や分化など、多くの遺伝子発現に関与する。一般的に、核内へは、核移行シグナル (NLS) を介して核輸送タンパク質により輸送される。当研究室では、Sp1 の NLS が、典型的な短鎖の塩基性クラスターではなく、約 90 残基からなる 3 個の zinc finger そのものであることを明らかにし<sup>1,2</sup>、さらに、zinc finger の特徴的な立体構造が核移行に関与することを示唆してきた<sup>3</sup> (図 1 (A))。しかしながら、細胞質内  $Zn^{2+}$  濃度は非常に低く (0.25 ~ 1 nM)、タンパク質合成後、核移行以前に Sp1 の zinc finger が  $Zn^{2+}$  と配位し、細胞質内で既に特徴的な立体構造を形成しているかは明らかになっておらず、実に興味深い。この命題の解明には、生細胞内での zinc finger 構造の可視化が必要である。

蛍光タンパク質を用いたバイオセンサーは、蛍光検出による高い時空間分解能に加え、遺伝子導入による低侵襲性や長時間測定への適性などから、生細胞内での生体分子の挙動解明に広く使われている。一般的には、標的との反応・結合によるタンパク質機能構造の構造変化を、融合した蛍光タンパク質の蛍光発光変化として検出する。我々は、カルシウム透過型イオンチャネル TRPC5 の部分構造を、蛍光タンパク質 EGFP の蛍光団近傍に導入することで、TRPC5 の開口に伴う予想される構造変化を、EGFP の蛍光発光変化として効率的に検出した<sup>4,5</sup>。EGFP の末端ではなく、その内部に標的となるタンパク質機能構造を内包するこの手法は、生細胞内で Sp1 の zinc finger 構造を可視化するバイオセンサーを構築する上で有効であると考えた。

本研究では、EGFP を蛍光団近傍である N145 と P146 の間で分割し、そこに Sp1 の 3 個の zinc finger を導入した (図 1 (B))。試験管内評価ではあるが、 $Zn^{2+}$  配位除去に伴う zinc finger 構造の変化を蛍光強度の変化として検出可能であることが示唆された。本発表では、その詳細について報告する。

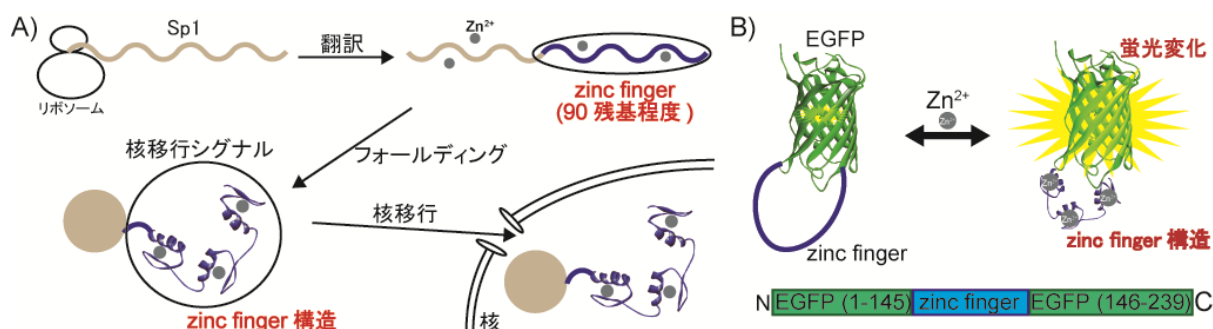


図 1 (A) Sp1 の予想される核移行経路。(B) Zinc finger バイオセンサーの模式図

- 1) J. Kuwahara, M. Azumano and T. Takeda, *Nucleic. Acids Symp. Ser.*, **1999**, 42, 293-294.
- 2) J. Kuwahara, Y. Watanabe, T. Kayasuga and K. Itoh, *Nucleic. Acids Symp. Ser.*, **2000**, 44, 265-266.
- 3) T. Ito, M. Azumano, C. Uwatoko, K. Itoh and J. Kuwahara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2009**, 380, 28-32.
- 4) S. Tajima, E. Nakata, R. Sakaguchi, M. Saimura, Y. Mori and T. Morii, *Bioorg. Med. Chem.*, **2020**, 28, 115430.
- 5) S. Tajima, E. Nakata, R. Sakaguchi, M. Saimura, Y. Mori and T. Morii, *RSC adv.*, **2022**, 12, 15407-15419.

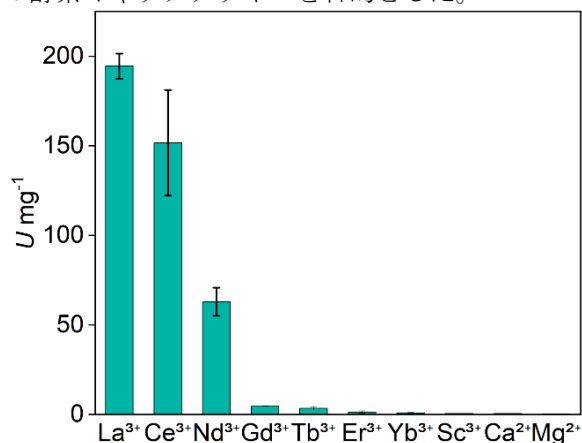
## 新しい PQQ 依存性脱水素酵素の発現系の構築と活性評価

○市川明葉<sup>1</sup>・武田康太<sup>2</sup>・五十嵐圭日子<sup>3</sup>・中村暢文<sup>1</sup>( <sup>1</sup>東京農工大院工、<sup>2</sup>産総研化学プロセス、<sup>3</sup>東大院農)

**Construction of an expression system for a novel PQQ-dependent alcohol dehydrogenase and evaluation of the activity of the obtained enzyme** (Dept. Biotechnol. Life Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol.<sup>1</sup>, Chem. Proc. Technol. Res. Inst., AIST<sup>2</sup>, Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo.<sup>3</sup>) ICHIKAWA, Akiha<sup>1</sup>; TAKEDA, Kota<sup>2</sup>; IGARASHI, Kiyohiko<sup>3</sup>; NAKAMURA, Nobuhumi<sup>1</sup>

Pyrroloquinoline quinone (PQQ)は、アルコールや糖質を基質とする脱水素酵素の酸化還元補酵素としてエネルギー代謝に関わる。通常、PQQ を補酵素する酵素の活性中心には  $\text{Ca}^{2+}$  などの 2 価イオンが結合しており、触媒反応に必須となっている。しかし、2011 年にメタン資化細菌中から  $\text{La}^{3+}$  が結合した PQQ 依存性のメタノール脱水素酵素が発見された<sup>1</sup>。近年、 $\text{La}^{3+}$  をはじめとする希土類金属イオンを積極的に利用する生物の存在が明らかになりつつあるが、希土類金属を補因子として利用する酵素は、現状、PQQ 依存性のアルコール脱水素酵素に限定的である。希土類金属を利用する酵素の機能解明と産業用酵素触媒への応用に向けて、本研究では、新規なランタノイド-PQQ 依存性脱水素酵素と推定されたホモログ遺伝子のタンパク質発現系の構築とその酵素キャラクタライズを目的とした。

グラム陰性菌 *Youhaiella tibetensis* 由来のランタノイド-PQQ 依存性アルコール脱水素酵素ホモログ (*YtADH*) の大腸菌による組換え発現系の構築を試み、精製した酵素の活性評価を行った。組換え発現により得られた粗酵素液を、アフィニティーカラムと陰イオン交換カラムを用いて精製した。取得した *YtADH* に、PQQ、 $\text{La}^{3+}$  を加え、グルコースを基質として phenazine methosulfate (PMS)、2,6-dichloroindophenol (DCIP) の 2 種類の電子受容体を用いた系でのグルコース酸化活性を評価した。その結果、酵素活性が示され、タンパク質 1 mg あたりの比活性は約  $190 \text{ U mg}^{-1}$  であった。一方で、PQQ のみ添加した場合や、PQQ と  $\text{La}^{3+}$  どちらも添



**Fig. 1 Specific activity of D-glucose oxidation upon addition of various metal ions.**

加しないアが酵素のみの場合、活性は示されず、 $\text{Ca}^{2+}$  もしくは  $\text{Mg}^{2+}$  の添加でもほとんど活性を示さなかったことから、本酵素がランタノイド-PQQ 依存性酵素であることが明らかになった (Fig. 1)。 $\text{La}^{3+}$  の代わりに他の希土類金属イオンを添加して比較したところ、 $\text{Ce}^{3+}$  や  $\text{Nd}^{3+}$  の添加でも活性を示したものの、 $\text{La}^{3+}$  を添加した場合が最大であった。次に *YtADH* の基質選択性について調べた。D-グルコース、D-ガラクトース、D-フコースなどに対して  $70 \text{ U mg}^{-1}$  以上の活性を示した。特に、D-フコース(6 位水酸基がデオキシ化された D-ガラクトース)に対して、 $830 \text{ U mg}^{-1}$  と高い酸化活性を有していることがわかった。メタノール、エタノールの比活性は低い ( $2 \text{ U mg}^{-1}$ ) が、ブタノールに対しては高い活性を示した ( $240 \text{ U mg}^{-1}$ )。これまでに報告されているランタノイド-PQQ 依存性メタノール(もしくはエタノール)脱水素酵素とは異なり、*YtADH* は比較的分子量の大きい基質の酸化が可能な新規ランタノイド-PQQ 依存性酵素であることが示された。また、グルコースを基質として反応させた酵素反応溶液の NMR 測定の結果、4.11 ppm、4.12 ppm にグルコン酸特有の 2 つのピークが見られた。このことから本酵素はグルコースの C1 位の水酸基を優先的に酸化することがわかった。

1. Y. Hibi et al., *J. Biosci. Bioeng.*, **2011**, 111, 547-549



## ONOO<sup>-</sup>応答性タンパク質ラベル化剤の開発と Conditional Proteomics への応用

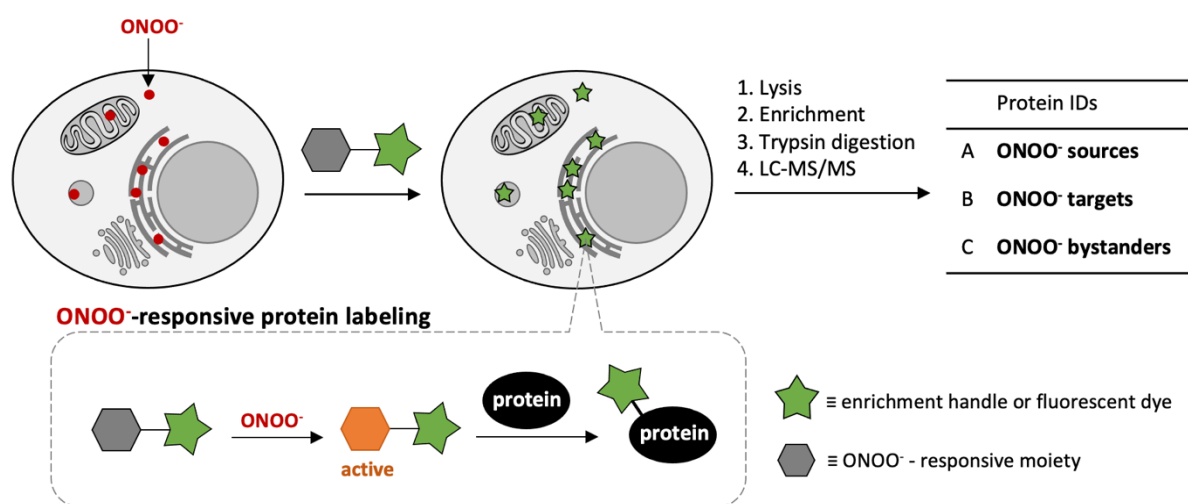
○宇野寛彬<sup>1</sup>・朱浩<sup>1</sup>・松葉恭一<sup>1</sup>・浜地格<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>京大院工、<sup>2</sup>ERATO, JST)

**Development of ONOO<sup>-</sup>-responsive protein labeling reagents for conditional proteomics** (Graduate School of Engineering Kyoto Univ.<sup>1</sup>, ERATO, JST<sup>2</sup>) Uno, Hiroaki<sup>1</sup>; Hao Zhu<sup>1</sup>; Matsuba, Kyoichi<sup>1</sup>; Hamachi, Itaru<sup>1,2</sup>

ONOO<sup>-</sup> (peroxynitrite) は一酸化窒素 NO とスーパーオキシド O<sub>2</sub><sup>•-</sup> の拡散律速の反応で生じる活性酸素/窒素種である。ONOO<sup>-</sup> は、タンパク質などの生体分子を酸化、ニトロ化し、分子の立体構造や機能を修飾することが知られている。こういったタンパク質の修飾は、細胞シグナル伝達の微妙な変調から細胞死まで様々な細胞応答を引き起こし、炎症や、血管系疾患、神経系疾患、ガン等の疾患との関連も指摘されている。これまでの生体内の ONOO<sup>-</sup> を検出する手法としてニトロ化されたチロシンを認識する 3-ニトロチロシン(3-NT)抗体や ONOO<sup>-</sup> 応答性の蛍光プローブによる検出が行われてきた。3-NT 抗体を用いた組織の免疫染色により、様々な病態においてタンパク質のニトロ化が進行することが明らかにされた。一方で、この手法は、ONOO<sup>-</sup> によって酸化・ニトロ化されたアミノ酸残基のうち 3-NT しか検出できないという課題がある。また、蛍光プローブにより生細胞内の ONOO<sup>-</sup> をイメージングできるが、ONOO<sup>-</sup> 関連タンパク質を調べることはできない。

そこで、本研究では ONOO<sup>-</sup> の生体内での役割を明らかにするために、ONOO<sup>-</sup> 周辺のタンパク質を網羅的に同定する新しい手法の開発を行った。この手法では、ONOO<sup>-</sup> によって選択的に活性化し周辺のタンパク質を化学標識するラベル化剤を用いて、生体内の ONOO<sup>-</sup> 周辺タンパク質をラベル化する。ラベル化タンパク質は、細胞の破碎後、ラベル化剤のタグを利用して濃縮され、LC-MS/MS によって網羅的に同定される。この手法により同定されたプロテームから ONOO<sup>-</sup> の生成や局在、修飾に関する情報を得ることができる。

今回の発表では、ONOO<sup>-</sup> 応答性タンパク質ラベル化剤の開発、ラベル化メカニズムの解明とともに、本ラベル化剤の生細胞への応用について紹介する。



1. T. Miki, I. Hamachi et al. *Nat. Methods* **2016**, 13, 931.
2. Y. Nishikawa, I. Hamachi et al. *ACS Chem. Biol.* **2019**, 14, 397.
3. H. Zhu, I. Hamachi et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 15711.

タンパク質複合体の *in situ* 構築による細胞内分子の電顕可視化○ 高嶋 一平<sup>1</sup>・高橋 泰人<sup>1</sup>, 齊藤 知恵子<sup>2</sup>, 吉川 雅英<sup>2</sup>, 水上 進<sup>1</sup>( <sup>1</sup>東北大多元研、<sup>2</sup>東大院医)

***In-situ* construction of protein assembly to visualize intracellular target by EM imaging.** (Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku Univ.<sup>1</sup>, Graduate School of Medicine, Tokyo Univ.<sup>2</sup>)  
**TAKASHIMA, Ippei<sup>1</sup>; TAKAHASHI, Hiroto<sup>1</sup>; SAITO, Chieko<sup>2</sup>; KIKKAWA, Masahide<sup>2</sup>; MIZUKAMI, Shin<sup>1</sup>**

電子顕微鏡 (以下電顕) による細胞内分子イメージングは詳細な細胞内局在や複合体構造の情報を与えることから、機能的蛋白質複合体の分子機序解明への応用が期待されている。一方で、電子密度が低い標的分子は電顕イメージングでの識別は困難であるため、電子密度が高いタグを標識して可視化する。従来は、金ナノ粒子を抗原-抗体反応で標的分子に標識する手法が用いられてきた。しかし、化学固定などの操作により抗原性は失われやすく、さらに嵩高い抗体はサンプル深部へ浸透しにくいために修飾率が低いなど、標的分子の適用範囲は限定される。その問題を解決するために、近年では標的分子へ電顕可視のタグ分子を分子生物学的に導入する手法が注目されている。たとえば、miniSOG や APEX2 といった酵素を利用した 3,3'-diaminobenzidine ポリマー形成、ferritin (or Ferri-tag) や GEM などのタグ構造が挙げられるものの<sup>[1]</sup>、拡散や分子サイズによる分解能の低下や、比較的低い電子密度ゆえの低感度の問題が残されている。一方で、メタロチオネイン(MT) タグは 6 kDa と小さいサイズであるものの、MT 上に金ナノ粒子を形成して高感度に検出できる。しかし、本手法も MT タグの導入に伴う標的分子の発現量や局在への重大な影響、内因性 MT による背景ノイズ、化学固定などで容易に失活する問題が明らかとなってきた。そこで発表者らは MT タグに関する上記の問題を解決するために、MT タグを標的分子に複数連結した特異構造を *in situ* で構築する手法の開発を目指した。

本技術は、標的分子に対して Halo Tag を介して tetrazine (Tz) を複数導入し、化学固定後に IEDDA 反応を介して標識した複数の MT を核として金ナノ粒子を形成させる。この複合構造体は、標的分子-HaloTag 融合タンパク質に対して、Halo tag ligand (HTL)-Tz 化合物、*transcyclooctene* (TCO)-SNAP tag ligand (STL) 化合物、SNAP tag-MT 融合タンパク質による 4 元複合体を形成する。HTL-Tz 化合物・TCO-STL 化合物に関して分枝した誘導体を設計・合成し、標的分子に対する MT 修飾数や位置を制御することを目指した。タンパク質構造は AlphaFold2 を利用して化合物結合部位や MT の位置を設計し、リンカーにはプロリンリッチリンカーを導入して構造偏差を低減させた。これら合成モジュールおよび単離生成した蛋白質モジュールによる複合体形成・金ナノ粒子形成・透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を実施して、本システムを検証した。その結果、Tz 構造は化学固定による失活はほとんど見られず、IEDDA 反応と SNAP tag を介して標的分子上に MT 集合体を形成した上で、化学固定後に金ナノ粒子形成反応を行うことで、本複合体上において 2 つ以上の金ナノ粒子を有する構造を形成できることを見出した。一方で、従来手法に見られる直接 MT を標的分子へ導入した融合タンパク質を使用した場合、化学固定後に金ナノ粒子形成反応を行っても金ナノ粒子の形成が見られなかった。以上のことから、本手法が化学固定した生体サンプルの電顕イメージングで有用な標識技術であり、複数の金ナノ粒子形成によって内因性 MT のノイズシグナルとの区別が可能な技術であると示唆した。本発表では、電顕画像を介して本手法の有用性を議論するとともに、発蛍光性 IEDDA 反応型の HTL-Tz 化合物を用いた光-電子相関顕微鏡法への応用展開についても解説する。

[1] S. Cuilen-Haering, J. Mahamid, et al. *Nat. Methods*, **2023**, 20, 1900-1908; M. Kikkawa, *Microscopy*, **2022**, 71, i60-i65.



## フェロケラターゼ共発現系を用いて作製した

## コバルト置換シトクロム P450 のキャラクターゼーション

○中澤真優<sup>1</sup>・赤川絵里<sup>1</sup>・澤田真希<sup>1</sup>・武田康太<sup>2</sup>・藤井敏司<sup>3</sup>・養王田正文<sup>1</sup>・中村暢文<sup>1</sup> (<sup>1</sup>農工大院工、<sup>2</sup>産総研、<sup>3</sup>甲南大 FIRST)

**Characterization of cobalt-substituted cytochrome P450 produced using ferrochelatase co-expression system.** (Depart. of Biotechnol. Life Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol.<sup>1</sup>, National Inst. of Advanced Industrial Sci. and Technol. (AIST)<sup>2</sup>, Depart. of Nanobiochem., FIRST (Faculty of Frontiers of Innovative Research in Sci. and Technol.), Konan University<sup>3</sup>) NAKAZAWA, Mahiro<sup>1</sup>; AKAGAWA, Eri<sup>1</sup>; SAWADA, Maki<sup>1</sup>; TAKEDA, Kouta<sup>2</sup>; FUJII, Satoshi<sup>3</sup>; YOHDA, Masafumi<sup>1</sup>; NAKAMURA, Nobuhumi<sup>1</sup>

シトクロム P450 (P450) は、不活性な炭化水素部位への一原子酸素添加反応を触媒するヘムチオレートタンパク質である。当研究室では、好酸好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* strain 7 株由来の P450 (P450st) についての機能解明や工業応用のため研究を行っている。P450st は、高い熱安定性や広範囲な pH 耐性を持つことに加え、過酸化水素駆動型の一原子酸素添加反応が可能のため、工業的な利用が期待できる。以前の研究で、ポルフィリン環に鉄が導入されない P450st が発現される問題を解決するため、ポルフィリンへの鉄導入を触媒する酵素フェロケラターゼ (FC) との共発現系を構築した。ヘムタンパク質の機能解明や新たな反応性の開発のために金属置換ヘムタンパク質の作製が行われていることを鑑み、本研究では、FC 共発現系を用いて、鉄以外の金属イオン、特にコバルトイオンが導入された P450st の作製を試み、そのキャラクタライズを行った。

野生型 P450st と大腸菌 K12 株由来の野生型 FC をコードする pETDuet-1

プラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。Co<sup>2+</sup>添加培養は、培養液に 250 μM 5-アミノレブリン酸、500 μM CoCl<sub>2</sub>、250 μM IPTG を添加

|                     | Metal content (mol/mol-protein) |      |                     |
|---------------------|---------------------------------|------|---------------------|
|                     | Co                              | Fe   | Total Metal Content |
| Co-incubated P450st | 0.66                            | 0.05 | 0.71                |
| FeP450st            | N.D.                            | 0.73 | 0.73                |

して行った。熱処理後、His tag カラム、ゲルろ過カラムを用いてタンパク質を精製した結果、FC 共発現系を用いて作製した Co<sup>2+</sup>添加培養 P450st のうち金属が配位しているものの収量は培地 1 L あたり 11 mg であり、FC 共発現系を用いず P450st のみを発現した時のおよそ 10 倍であった。作製したサンプルについて UV-vis スペクトル測定および誘導結合プラズマ発光分析測定 (ICP-MS) を行い、目的の金属イオンの導入を確認した。得られた Co<sup>2+</sup>添加培養 P450st の UV-vis 吸収スペクトルや還元剤の添加によるピークシフトの挙動は、3 価のコバルトイオンが導入された別の P450 について報告されたものと同じであった<sup>[1]</sup>。ICP-MS の結果、タンパク質全体に対し、コバルトイオンが結合している割合はおおよそ 66 %であり、鉄イオンが結合している割合は 5 %程度であることが判明した。コバルトイオンを添加せず培養して得られた FeP450st には、鉄イオンが 71%の割合で結合していた。配位金属の電子状態を電子常磁性共鳴 (EPR) スペクトル測定により調べたところ、77 K での EPR 測定では、シグナルは観測されず、コバルトイオンは 3 価高スピン状態である可能性が示唆された。得られた Co<sup>2+</sup>添加培養 P450st が過酸化水素駆動型の一原子酸素添加反応を行うか調べた。過酸化水素を添加し、インドールの水酸化により得られるインディゴに由来する 670 nm の吸光度変化の測定を試みた。基質と過酸化水素を添加したところ、気泡が発生し吸光度を測ることが困難であった。これは過酸化水素の不均化を促進している可能性を示唆する。

[1] L. J. Perkins, et al., PNAS, 16, 118 (2021).

## 遺伝子ノックインと細胞膜局在性リガンドを用いた分裂酵母の内在性タンパク質の細胞膜局在化および細胞機能操作

○中村彰伸<sup>1,2</sup>・後藤祐平<sup>2,3</sup>・杉山博紀<sup>2,4</sup>・築地真也<sup>5</sup>・青木一洋<sup>2,3</sup>  
 ( <sup>1</sup>産総研バイオメディカル、<sup>2</sup>自然科学研究機構 生命創成探究センター (ExCELLS)、<sup>3</sup>京大院生命、<sup>4</sup>東大院工、<sup>5</sup>名工大院工 )

Optimization of synthetic ligand-induced protein translocation (SLIPT) system for fission yeast and chemogenetic control of endogenous signaling proteins. ( <sup>1</sup>Biomed. Res. Inst., AIST; <sup>2</sup>Exploratory Res. Center Life Living Syst. (ExCELLS), NINS; <sup>3</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto Univ.; <sup>4</sup>Graduate School of Engineering, Univ. Tokyo; <sup>5</sup>Graduate School of Engineering, Nagoya Inst. Technol. ) NAKAMURA, Akinobu<sup>1,2</sup>; GOTO, Yuhei<sup>2,3</sup>; SUGIYAMA, Hironori<sup>2,4</sup>; TSUKIJI, Shinya<sup>5</sup>; AOKI, Kazuhiro<sup>2,3</sup>

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) は、真核単細胞生物であり、哺乳類細胞に類似する細胞分裂の様式を示すことから、さまざまな細胞機能の制御メカニズムを解明するための有用なモデル生物として広く用いられている。これまでに、分裂酵母では特定遺伝子を欠失させる遺伝子ノックアウトにより、その遺伝子がコードするタンパク質と細胞機能の関係が研究されてきた。しかし、遺伝子ノックアウトによるアプローチでは、致死性遺伝子の研究が困難であることや、時間分解能が低いという問題があった。

我々は、ミリスチン酸に D 体システインを連結した化合物 ( $m^Dc$  モチーフ) が、細胞膜に自発的に局在化することを見出し、大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) に特異的に結合するリガンドであるトリメトプリム (TMP) を連結することで、細胞膜局在性 TMP ( $m^Dc$ TMP) を開発することに成功している。 $m^Dc$ TMP を哺乳類細胞の培地に添加すると、細胞膜を透過して細胞内の  $iK6$ DHFR (eDHFR のループ領域にリジン残基6個を挿入したタンパク質タグ) に結合することで、その局在を細胞質から細胞膜に移行誘導することが可能である。我々は、この  $m^Dc$ TMP のように化合物単独で特定のオルガネラに局在化する小分子化合物を「自己局在性リガンド」(Self-localizing Ligand; SL) と名付け、SL を用いた細胞内タンパク質の移行誘導系を SLIPT (SL-Induced Protein Translocation) システムと名付けた。

本研究では、分裂酵母の内在性タンパク質の C 末端に  $iK6$ DHFR を遺伝子ノックインで導入し、SLIPT システムを用いた内在性タンパク質の強制的な細胞膜局在化による細胞機能制御を目指した。まず、 $m^Dc$ TMP の分裂酵母における細胞壁/細胞膜の透過性、および細胞膜局在化能を調べるために、 $iK6$ DHFR に緑色蛍光タンパク質 (mNeonGreen) を連結した融合タンパク質 ( $iK6$ DHFR-mNG) を発現する分裂酵母株を樹立した。この分裂酵母株の培地に、 $m^Dc$ TMP を添加することで、細胞質 (および核内) を拡散する  $iK6$ DHFR-mNG を細胞膜選択的に局在化させることに成功した。しかし、長時間イメージングの結果、1~2 時間後には  $iK6$ DHFR-mNG の細胞膜局在化が解消し、細胞質と核内に戻ることが明らかとなった。我々は、 $m^Dc$ TMP のアミド結合が、分裂酵母のプロテアーゼにより切断されたものと推測し、 $m^Dc$ TMP のアミド結合の窒素原子をメチル化することでプロテアーゼ耐性を高めた  $m^Dc$ TMP<sub>4Me</sub> を新たに設計・合成した。この  $m^Dc$ TMP<sub>4Me</sub> を用いることで、分裂酵母での  $iK6$ DHFR の細胞膜局在化を 12 時間以上持続できることが明らかとなった。さらに、遺伝子ノックインで、分裂酵母のさまざまな内在性タンパク質の C 末端に  $iK6$ DHFR-mNG を融合した株を樹立し、 $m^Dc$ TMP<sub>4Me</sub> で内在性タンパク質の細胞膜局在化を誘導することで (細胞周期、分裂溝形成といった) 細胞機能を阻害し、(細胞形態の変化、細胞死といった) 表現型を誘導することに成功した。また、 $m^Dc$ TMP<sub>4Me</sub> 添加前後の分裂酵母をタイムラプスイメージングで観察することで、表現型が現れるまでの過程を高い時間解像度で捉えることに成功した。本ポスターでは、上記の結果について詳細に報告する。

● A. Nakamura, Y. Goto, H. Sugiyama, S. Tsukiji, K. Aoki, *ACS Chem. Biol.* 18(12), 2506-2515 (2023).

## 可逆的光架橋を利用したプリン塩基への架橋反応の高速化

○藤岡 啓<sup>1</sup>・平原令偉<sup>1</sup>・莫竣凌<sup>1</sup>・藤本健造<sup>1</sup>（<sup>1</sup>北陸先端科学技術大学院大学、  
バイオ機能医工学研究領域）

Accelerated photo-cross-linking to purine bases in duplex using reversible DNA photocross-linking

(Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology.<sup>1</sup>)

FUJIOKA Akira<sup>1</sup>; HIRAHARA Rei<sup>1</sup>; MO, Junling<sup>1</sup>; FUJIMOTO, Kenzo<sup>1</sup>

DNA 鎖間の架橋は SNP タイピング・転写及び翻訳の制御・遺伝性疾患の治療といった応用に繋がることが知られている。また、DNA 鎖間を架橋する際にプリン塩基への架橋には長時間必要であることも知られている。我々はこれまで光架橋素子 3-cyanovinylcarbazole nucleoside (CNVK)を中心とした光応答性人工核酸を用いた核酸類光操作法について報告している<sup>1</sup>。この光架橋素子を DNA 鎖に組み込んだ光応答性人工核酸は光照射により、DNA 鎖や RNA 鎖内に存在するチミンやシトシンといったピリミジン塩基と[2+2]光還元することで、位置選択的な光架橋反応を示す。また、最近クロスリンク法に関して、チミンにのみ選択的な光架橋を示す 4-methylpyranocarbazole nucleoside (MEPK)の開発に成功し、その結果について当研究室より報告している<sup>2</sup>。この様にピリミジン塩基への架橋例は多いのに対しプリン塩基への架橋についてはあまり報告されていない。しかも、DNA 鎖間を架橋する際にプリン塩基への架橋には長時間必要であることも知られている。そこで、我々は既の開発済みの超高速光クロスリンカー（CNVK）による可逆的な DNA 光クロスリンクを経由させることでプリン塩基への速度を向上させられないかと考え実験をおこなったので報告する。これまで先行研究で報告されている無塩基部位を組み込んだ人工核酸を用いたプリン塩基への光架橋率が1日当たり0.015%であるのに対し、可逆的光架橋を経由させた際のプリン塩基への光架橋率が1日当たり37%となり約2500倍加速させることに成功した。以上の通りプリン塩基を持つグアニンへの架橋率を向上させることに成功し、先行研究にて架橋に長時間必要であるとされてきた問題を改善できた。今後、今回開発した高速化されたプリン塩基への光クロスリンクは遺伝子解析や遺伝子診断といった分野での貢献が期待される。

## 参考文献

1. Y. Yoshimura, K. Fujimoto, *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3227.
2. J. Mihara, K. Fujimoto, *Organic & Biomolecular Chem.*, **2021**, 10, 1039

グアニン四重鎖を安定化する Dehydroevodiamine 誘導体の創製

○馬悦<sup>1</sup>・小山田知輝<sup>2</sup>・影近弘之<sup>2</sup> (<sup>1</sup>医科歯科大RCC、<sup>2</sup>医科歯科大生材研)

**Development of Dehydroevodiamine derivatives as G-quadruplex ligand** (Research Core Center, Tokyo Med. Dent. Univ.<sup>1</sup>, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Med. Dent. Univ.<sup>2</sup>) MA, Yue<sup>1</sup>; OYAMADA, Tomoki<sup>2</sup>; KAGECHIKA, Hiroyuki<sup>2</sup>

【背景・目的】 グアニン四重鎖 (G-quadruplex; G4) とは、グアニン豊富な核酸配列で形成される高次構造の一つであり、四分子のグアニンから構成される G-quartet 平面が  $\pi$ - $\pi$  相互作用を介して積み重なることで形成されている。G4 形成配列はゲノムワイドに存在することが知られており、構造が安定化されることにより様々な生命現象に影響を与えることが報告されている。がん関連遺伝子である *c-myc* のプロモータ領域は GGA のリピート配列であり、G4 構造を形成する。当該 G4 が形成・安定化されることにより、遺伝子発現が抑制され、グリオーマのがん幹細胞がアポトーシスへ誘導されることがわかっている<sup>1)</sup>。このことから、*c-myc* G4 を安定化する低分子化合物 (G4 リガンド) はがん幹細胞を標的とした治療薬になりうると考えられる。また、天然物である Dehydroevodiamine (DHED: **1**, Figure 1) は *c-myc* G4 と結合することが報告されているが<sup>2)</sup>、*c-myc* G4 に対する結合様式や G4 安定化能は明らかになっていない。そこで本研究では、DHED 誘導体を合成し、*c-myc* G4 に対する DHED 類の結合様式と相互作用能を解析することを目的とした。

【結果】まず、チアゾールオレレンジを用いた G4-FID アッセイにより、*c-myb* G4 に対する DHED (**1**) の相互作用部位を調べたところ、**1** は G4 の G-quartet 平面に結合していることが示唆された。この結果を基に、窒素上置換基 R の変換を行った誘導体 **2-4** と、母骨格の芳香環を増環した誘導体 **5** を設計した (Figure 1)。まず、3-(インドール-3-イル)プロピオン酸をアジド化した後、クルチウス転位によって三環性の共通中間体を得た。この共通中間体と種々のアントラニル酸メチル誘導体とを塩化ホスホリルを用いて縮合することにより、誘導体を用いて、*c-myb* G4 および G4 非形成配列に対する。この結果、いずれの化合物も *c-myb* G4 を安定化し、G4 非とがわかった。また、**1** と比較し、**2-4** は安定化能の向化能を示した。これは、母骨格の  $\pi$  平面を拡張したこと作用が強くなったためであると考えられる。**5** の骨格を斥性の向上を目指す。

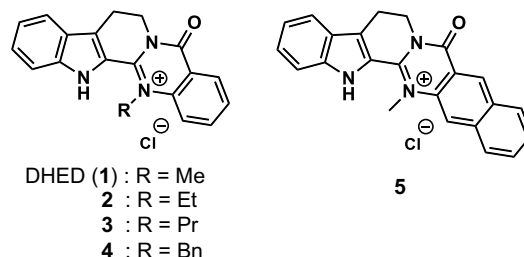


Figure 1 DHED (1) と誘導体2-5の構造

とを塩化ホスホリルを用いて縮合することにより、誘導体 **2-5** の合成を行った。合成した DHED 誘導体を用いて、*c-myb* G4 および G4 非形成配列に対する安定化能を FRET 融解実験により評価した。その結果、いずれの化合物も *c-myb* G4 を安定化し、G4 非形成配列である二本鎖 DNA を安定化しないことがわかった。また、**1** と比較し、**2-4** は安定化能の向上はみられなかったが、**5** は **1** よりも高い安定化能を示した。これは、母骨格の  $\pi$  平面を拡張したことにより、母骨格と G-quartet 平面との  $\pi$ - $\pi$  相互作用が強くなったためであると考えられる。**5** の骨格をもとに構造展開を行うことにより、*c-myb* G4 選択性の向上を目指す。

### 【参考文献】

- 1) Nakano, I. *et al. Clin. Cancer Res.*, **2012**, 18, 1268-1280.
- 2) Yuan, G. *et al. Int. J. Mass Spectrom.*, **2017**, 414, 39-44.

## 化学的な鋳型合成におけるキラルな核酸の重要性

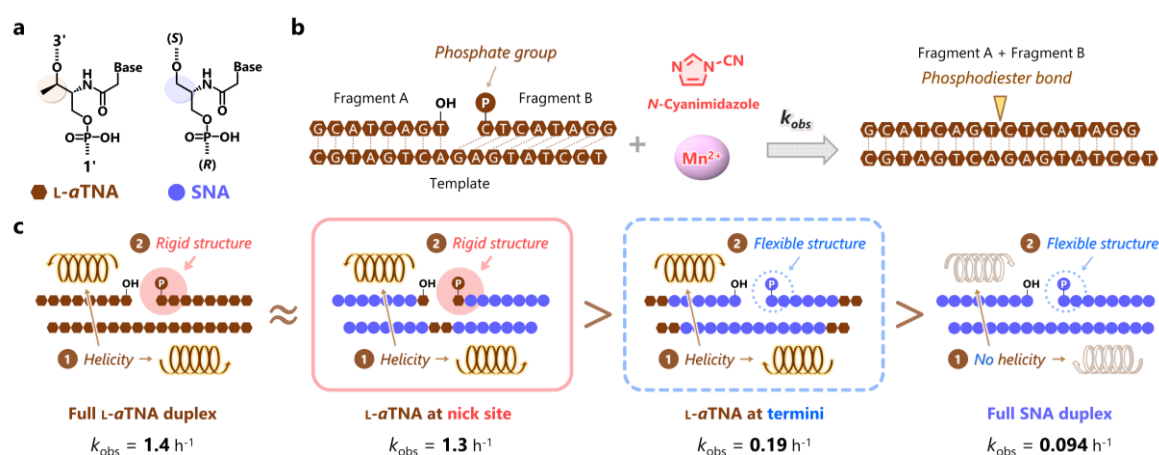
○沖田ひかり・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

**Importance of Chiral Nucleic Acid on Chemical Template-Directed Synthesis** (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.) OKITA, Hikari; MURAYAMA, Keiji; ASANUMA, Hiroyuki

天然に存在する DNA の D-リボース環状骨格や L-アミノ酸のように、生命活動に使用される化合物はキラリティーを有している。「なぜ生命はキラルな化合物を選択したのか。」これは生命の起源を考える上で極めて重要な問いかけである。本研究ではその謎を解き明かすべく、生命に必要な不可欠である”自己複製”の能力の観点からキラリティーの重要性を明らかにすることにした。

ここでは、連結させる核酸として当研究室で開発されたキラルな骨格を有する非環状型の人工核酸 L-*a*TNA (acyclic L-threoninol nucleic acid)<sup>[1]</sup>とアキラルな基本骨格を有する SNA (serinol nucleic acid)<sup>[2]</sup>に注目した(Fig. 1a)。これらの核酸はそれぞれ天然アミノ酸 L-スレオニンとセリン由来の骨格を持ち、メチル基の有無以外に化学構造に全く差がないことから、キラリティーが連結反応に与える影響をより厳密に精査できると考えた。また、原始地球では酵素が存在せず、化学的な連結手法を用いて自己複製を行っていたと考えられているため、本研究では有機小分子である縮合剤 *N*-シアノイミダゾールと二価金属イオンの  $Mn^{2+}$ を用いた化学連結法を利用することにした(Fig. 1b)<sup>[3,4]</sup>。

はじめに、全て L-*a*TNA 鎖もしくは全て SNA 鎖を用いた 8-mer フラグメントの連結反応を比較したところ、キラルな L-*a*TNA ( $k_{obs} = 1.4 \text{ h}^{-1}$ )の方がアキラルな SNA ( $k_{obs} = 0.094 \text{ h}^{-1}$ )よりも 12 倍以上速く連結反応が進行することが示された(Fig. 1c)。さらに、L-*a*TNA と SNA のヘテロなフラグメントの組み合わせによる連結反応や SNA 鎖の一部を L-*a*TNA に変えた L-*a*TNA-SNA キメラフラグメントを用いた連結反応の調査を通して、キラルな L-*a*TNA による「①ラセン構造の誘起」や「②連結部位におけるリン酸基の固定化<sup>[2]</sup>」が連結効率の向上に寄与し、さらに SNA 鎖の連結部位に 4 つの L-*a*TNA を導入した場合、①と②の効果より、全て L-*a*TNA のときと同様な速度( $k_{obs} = 1.3 \text{ h}^{-1}$ )を示すことが明らかになった。また、キラルな骨格を有する DNA や RNA を用いてもアキラルな SNA よりも高い連結効率を示すことから、化学的な鋳型合成においてキラリティーによる効果が重要であることが示された。さらに本技術を応用することで、最終的に RNA から L-*a*TNA への 9 塩基分の逆転写系の構築にも成功した。



**Fig. 1.** (a) Chemical structures of chiral L-*a*TNA and achiral SNA. (b) Chemical ligation method and sequences. (c) Effect of chiral L-*a*TNA scaffold on chemical template-directed synthesis.

[1] K. Murayama *et al*, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 6500. [2] H. Kashida *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 1285. [3] K. Murayama, H. Okita *et al*, *Nat. Commun.*, **2021**, 12, 804. [4] H. Okita *et al*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145, 17872.



## 非環状型核酸を基にした新規環状型人工核酸へのホスホロジアミデート結合の導入

○柴田珠花・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

**Installation of phosphorodiamidate bonds into novel cyclic artificial nucleic acids based on acyclic nucleic acids.** (Graduate School of Engineering, Nagoya University) SHIBATA, Mika; MURAYAMA, Keiji; ASANUMA, Hiroyuki

天然には存在しない構造を持つ人工核酸は、天然核酸の限界を越える様々な機能を示す。特に糖骨格部位を改変した人工核酸 XNA は天然核酸に比べ二重鎖形成・多重鎖形成の性質が大きく変化することが知られている。当研究室で開発された人工核酸 SNA、L-*a*TNA (Fig. 1) は、非環状型の骨格を有し、自身の相補的な配列と非常に安定な二重鎖を形成する<sup>[1]</sup>。天然核酸とも二重鎖を形成するほか、酵素耐性を持つことから、生物学的ツールへの応用が行われてきた。しかしながら、柔軟な非環状型骨格を持つゆえに天然核酸と二重鎖を形成する際のエントロピーロスが大きくなってしまうため、天然核酸とのヘテロ二重鎖の安定性が不十分であった。

先行研究において、私たちは SNA/RNA 二重鎖の 3 次元結晶構造<sup>[2]</sup>を基に、SNA の骨格を架橋し環状にしたピペラジンを主鎖骨格として持つ新規環状型人工核酸を設計した。環状骨格による剛直性がエントロピーロスを緩和し、二重鎖形成能が向上することを期待した設計となっている。対応するチミン導入新規骨格 (CT) のモノマーを合成し、L-*a*TNA 鎖中に導入した配列を合成したが、HPLC による精製後、緩衝液中のギ酸によってオリゴマーの一部が分解されることが明らかとなった。その原因として、新規骨格中の P-N 結合が酸性条件下で加水分解されやすいことが挙げられる。そのため、新規骨格のみで構成された人工核酸オリゴマーを安定的に合成できないことが課題であった。

そこで本研究では P-N 結合を持つ XNA であるモルフォリノ核酸 (PMO)<sup>[3]</sup>に注目した。PMO は糖骨格部位をモルフォリン環に置換した人工核酸であり、スプライシング制御型 ASO などに用いられている。PMO は骨格構造に P-N 結合を有しているが、リン酸部分がジメチルアミノ基を含むホスホロジアミデートに改変されているため酸による分解が抑制されている。本研究ではこの構造を参考にし、環状新規骨格にホスホロジアミデート結合を導入した新たな人工核酸モノマーを設計した (Fig. 2)。この設計においてはリン酸負電荷反発も解消されるため、更なる二重鎖形成能の向上が期待される。対応するモノマーを合成し、DNA 合成機を用いて T<sub>8</sub> 配列を合成したところ、脱トリチルのステップにおいて呈色を確認されたことから、完全長配列が合成できていることが示唆された。本発表では、他の核酸への結合特性について調査した結果についても報告する。

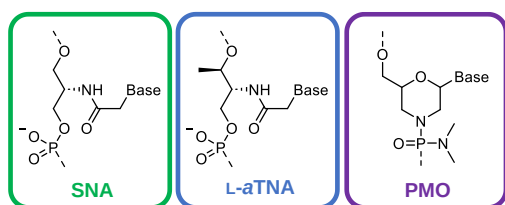


Fig. 1 Chemical structures of SNA, L-*a*TNA and PMO.

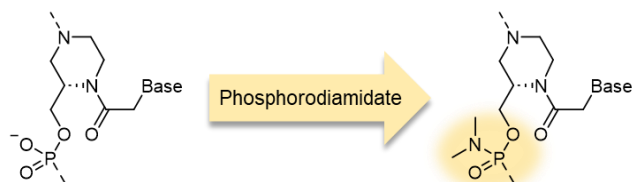


Fig. 2 Installation of phosphorodiamidate bonds into novel cyclic artificial nucleic acids.

[1] (a) H. Kashida *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, 1285., (b) K. Murayama *et al.*, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 6500.

[2] Y. Kamiya *et al.*, *Commun. Chem.*, **2020**, 3, 156.

[3] J. Summerton, D. Weller, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **1997**, 7, 187.

## Histidine- $\text{Cd}^{2+}$ 錯体を用いた人工核酸 L-aTNA の非酵素的ライゲーション反応の解析

○別所弘麻・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

**Analysis of the non-enzymatic ligation reaction of L-aTNA with histidine- $\text{Cd}^{2+}$  complexes.** (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.) BESSHO, Hiroma; MURAYAMA, Keiji; ASANUMA Hiroyuki

骨格改変型人工核酸 XNA は、特徴的な二重鎖形成能や高い酵素耐性を持つため、様々な生物学的応用が展開されている。当研究室で開発した人工核酸 L-aTNA は相補的な L-aTNA 鎖だけでなく、DNA や RNA とも安定な二重鎖を形成できるため新たな核酸ツールの骨格として有用である(Fig. 1 左)<sup>1</sup>。しかし多くの XNA と同様に酵素反応には応用できない。そこで、酵素の代わりに縮合剤 *N*-cyanoimidazole と二価金属イオンを用いたケミカルライゲーション法を利用することにより、L-aTNA の鋳型異存的な鎖伸長反応を確立することに成功した(Fig. 1)<sup>2</sup>。しかし、配列複製を実現するために熱サイクルによる増幅を検討した結果、*N*-cyanoimidazole の分解により反応が阻害されることが確認された。そこで本研究では、系中で imidazole 類縁体と BrCN を反応させることで縮合剤 (*N*-cyano 化合物) を合成し、ライゲーション反応を行う手法について検討した。

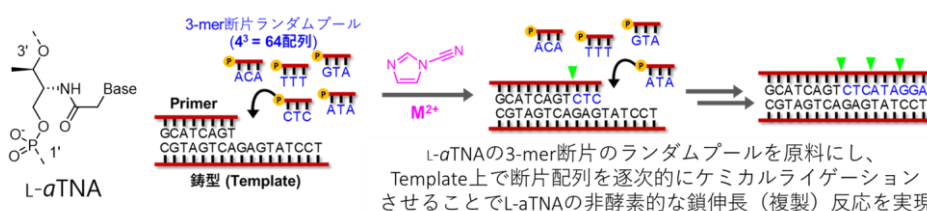


Fig. 1. L-aTNA の化学構造とケミカルライゲーションによる鎖伸長反応

二価金属イオン存在下、BrCN と imidazole が反応し *N*-cyanoimidazole を生成することで、ライゲーションが進行することが明らかにされている<sup>3</sup>。imidazole 類縁体として pyrazole、triazole、tetrazole、4-nitroimidazole、2-methylimidazole、histidine などを用いて反応性を評価した結果、ほとんどの場合反応速度は大幅に低下した一方、histidine/BrCN を用いた場合には比較的高効率にライゲーションが進行することが明らかとなった(Fig. 2)。Histidine の金属錯体形成による影響が考えられたため、NMR で histidine :  $\text{Cd}^{2+}$  の滴定実験を行った。その結果、histidine :  $\text{Cd}^{2+}$  = 2 : 1 で錯体形成していることが確認され、過去の報告とも一致する結果となった<sup>4</sup>。また、histidine :  $\text{Cd}^{2+}$  = 2 : 1 の条件においても反応が進行したことから、histidine と  $\text{Cd}^{2+}$  が錯体形成していても L-aTNA の高効率なライゲーションが可能であることが確認された。この結果は、適切な金属配位子を L-aTNA に連結しておくことで、人工リガーゼが構築できることを示唆しているだけでなく、天然アミノ酸である histidine が鎖伸長に利用できるという点において、酵素が出現する以前の原始地球における生命モデルとしても興味深い。

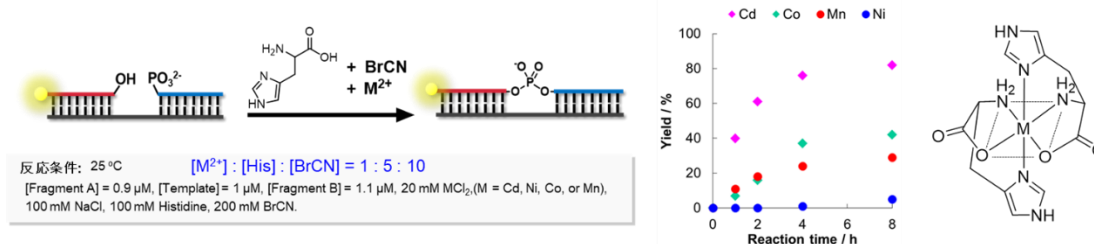


Fig. 2. histidine/BrCN による L-aTNA のケミカルライゲーションと His/ $\text{M}^{2+}$  錯体の構造

1. K. Murayama *et al.*, Chem. Commun., 51, 6500-6503 (2015), 2. K. Murayama *et al.*, Nat. Commun. 12, 804 (2021), H. Okita *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 145, 17872-17880 (2023), 3. E. Kanaya *et al.*, Biochemistry 25, 7423-7430 (1986), 4. K. A. Fraser *et al.*, Chem. Commun. (London), 344-345 (1965)

## 四重鎖 DNA を内包した人工ウイルスキャプシドの創製

○石井楽乃<sup>1</sup>・稲葉央<sup>1</sup>・遠藤玉樹<sup>2</sup>・建石寿枝<sup>2</sup>・杉本直己<sup>2</sup>・松浦和則<sup>1</sup> (<sup>1</sup>鳥取大院工、<sup>2</sup>甲南大 FIBER)

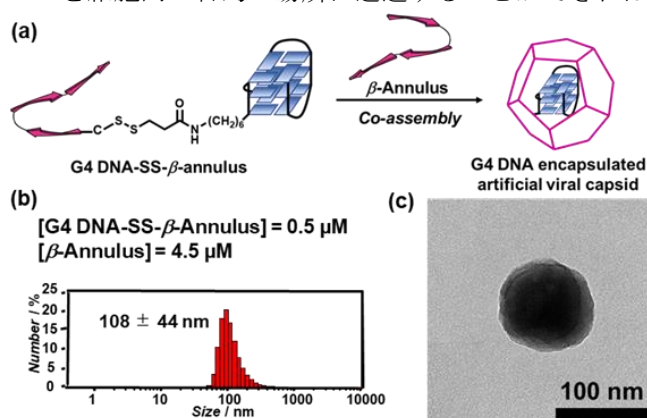
**Creation of artificial viral capsid encapsulated quadruplex DNA** (Graduate School of Engineering, Tottori University<sup>1</sup>, The Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research, Konan University<sup>2</sup>) ISHII, Motono<sup>1</sup>; INABA, Hirioshi<sup>1</sup>; ENDOH, Tamaki<sup>2</sup>; TATEISHI-KARIMATA, Hisae<sup>2</sup>; SUGIMOTO, Naoki<sup>2</sup>; MATSUURA, Kazunori<sup>1</sup>

核酸には、二重らせん構造以外に三重鎖・四重鎖などの非二重らせん構造が存在し、それらの安定性によって遺伝子発現効率が制御されていることが知られている。特に、グアニン四重鎖 DNA(G4)の形成が癌関連遺伝子のプロモーター領域に存在していることから、G4 は癌のバイオマーカーおよび治療の標的としての可能性を持っている<sup>1</sup>。しかし、細胞内環境に応じた G4 の構造や機能について、まだその詳細は明らかになっていない。そのため、G4 を細胞内の目的の場所に送達することができれば、G4 構造の細胞内での影響や制御機構などを議論することが可能になると思われる。一方当研究室では、トマトブッシースタントウイルス由来の 24 残基の  $\beta$ -Annulus peptide (INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS) の自己集合により、30~50 nm の人工ウイルスキャプシドを構築することに成功しており、様々な分子を内包できることを示している<sup>2</sup>。本研究では、ジスルフィド結合を介して  $\beta$ -Annulus ペプチドの N 末端に G4 を連結した G4 DNA-SS- $\beta$ -Annulus を合成し、G4 DNA を内包した人工ウイルスキャプシドを創製した(Fig. 1a)。

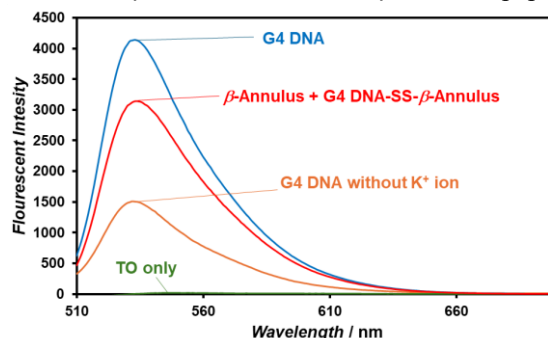
Fmoc 固相法を用いて Cys- $\beta$ -Annulus peptide (CINHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS)を合成した。5' Amino-G4 DNA (5'-NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGA-3')と架橋剤である *N*-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) を縮合することにより PySS-G4 DNA を合成した。Cys- $\beta$ -Annulus peptide と PySS-G4 DNA をジスルフィド交換反応により G4 DNA-SS- $\beta$ -annulus peptide を合成した。10 mM リン酸カリウム buffer(pH7.5)中で、G4 DNA-SS- $\beta$ -annulus と未修飾の  $\beta$ -Annulus peptide を 1:9 で共集合させたところ、100 nm 程度の球状集合体を形成することを DLS 測定と TEM 観察により確認した (Fig. 1b,c)。G4 に選択的に結合し、蛍光を発することが知られているチアゾールオレンジ (TO)を用いて、キャプシド内の DNA が G4 構造を形成しているかどうかを蛍光スペクトルで確認した結果、キャプシド内 DNA の一部が G4 構造を保持していることが示唆された(Fig. 2)。今後、蛍光修飾 G4 DNA 内包人工ウイルスキャプシドの細胞内導入を検討する予定である。

1) R. H. Hertsch, M. D. Antonio, S. Balasubramanian, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 279 (2017).

2) K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **54**, 8944 (2018).



**Fig. 1** (a) Construction of G4 DNA-encapsulated artificial viral capsid. DLS size distribution (b) and TEM image (c) of G4 DNA-encapsulated artificial viral capsids at 5  $\mu$ M.



**Fig. 2** Fluorescence spectrum of thiazole orange in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5).

## フェニルアゾチアゾール基を導入した光応答性人工核酸の合成と遺伝子制御

○田村 洸樹<sup>1</sup>・西原 達哉<sup>1</sup>・田邊 一仁<sup>1</sup>・(青山学院大院理工)

## Synthesis of photo-responsive artificial nucleic acids with phenylazothiazole groups and gene regulation.

(Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin Univ<sup>1</sup>) TAMURA, Kouki<sup>1</sup>; NISHIHARA, Tatsuya<sup>1</sup>; TANABE, Kazuhito<sup>1</sup>

光刺激応答性の人工核酸は、任意の時間に任意の場所で核酸の機能を制御できることから、非常に有用である。これまでにアゾベンゼンを導入した人工核酸が報告され、光異性化を通じて DNA 二重鎖の形成・不安定化を行い、核酸機能の光制御が実現されてきた。<sup>1</sup> 本研究では、新たなアゾ基含有 DNA として、フェニルアゾチアゾール(PAT)基を導入した光応答性の人工核酸の開発を試みた。PAT 基のチアゾール部分は電子供与性の硫黄原子を持つことで  $\pi \rightarrow \pi^*$  遷移のエネルギーギャップが小さくなり、最大吸収波長が長波長化することが知られる。また、PAT は trans 体では平面構造をとるが、cis 体では T 字構造をとることも知られている。そこで今回は、既存のフォトクロミック化合物とは異なる特性を持つ PAT 基を導入した人工核酸を開発し、長波長の光照射によって二重鎖の形成・解離をより効率よく制御することを目指した。

まず、PAT を導入した人工核酸(P-ODN)を、ホスホロアミダイト法を用いて合成した。次に、PAT 基をそれぞれ 0, 1, 3, 5 個導入した人工核酸に相補鎖を添加し、融解温度( $T_m$ )測定を行った。365nm の光を照射したサンプルと、530 nm を照射したサンプルを準備し、 $T_m$  を測定したところ、530 nm の光照射を行った場合に、高い  $T_m$  値を示した。また、PAT 基の導入数が多いほど、各光照射条件下での  $T_m$  値に差が大きく生じた。その差は最大で、PAT 基を 5 個導入した場合に 9.5 °C であった。これらの結果は、P-ODN は trans 体の場合はインターカレーターとしての機能し二重鎖を安定化させる一方、365 nm の光照射により cis 体へと光異性化し、T 字構造をとることで二重鎖を不安定化させ得ることを示している。また、この結果からアゾベンゼン誘導体である PAT でも同様に光照射による二重鎖制御が可能であることが確認できた。すなわち、PAT でもアゾベンゼンと同様に光照射による二重鎖制御が可能であることから、PAT 基に様々な修飾を加えることで、より長波長での二重鎖制御が可能であることが示唆された。

本発表では P-ODN の合成、二重鎖形成特性、およびこの DNA 鎖を用いた遺伝子制御の結果について報告する予定である。

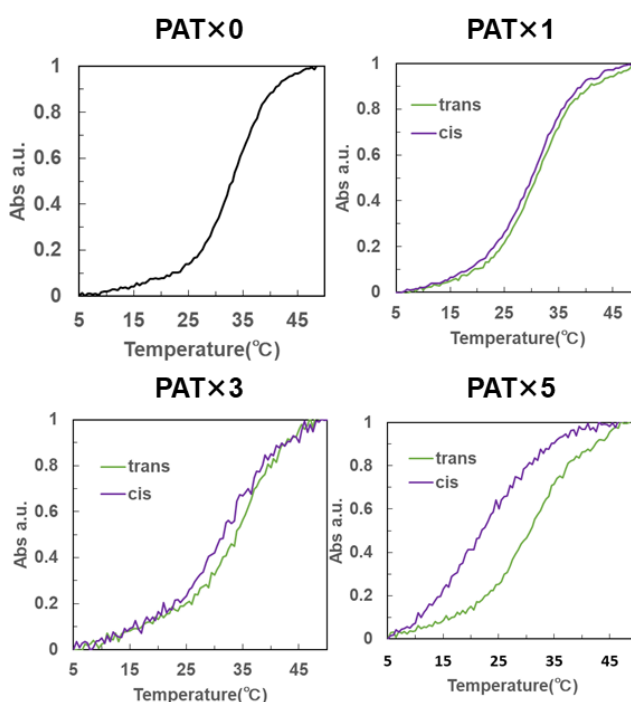


Figure 1. Melting Temperature of P-ODN

1. M. Liu, H. Asanuma, M. Komiyama, J Am. Chem. Soc. 128, 1009-1015 (2006).
2. R. Lin, P. K. Hashim, S. Sahu, A. S. Amrutha, N. M. Cheruthu, S. Thazhathethil, K Takahashi, T Nakamura, T Kikukawa, and N Tamaoki, J. Am. Chem. Soc. 145, 16, 9072–9080 (2023).



## 酸化損傷塩基の修復機構解明を指向した光増感剤修飾プラスミド

## DNA の開発

○小澤雅史<sup>1</sup>・金森功史<sup>1</sup>・河添好孝<sup>2</sup>・杜瑤瑤<sup>1</sup>・吉田七唯<sup>1</sup>・湯浅英哉<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東工  
大院生命理工、<sup>2</sup>九州大院理)

## Photosensitizer-modified plasmid DNA for elucidation of repair mechanisms of oxidative DNA damage.

(School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology<sup>1</sup>, Faculty of Science, Kyushu University<sup>2</sup>)

OZAWA Masashi<sup>1</sup>; KANAMORI Takashi<sup>1</sup>; KAWASOE Yoshitaka<sup>2</sup>; DU Yaoyao<sup>1</sup>; YOSHIDA Nanai<sup>1</sup>, YUASA Hideya<sup>1</sup>

本研究では、当研究室が開発した小型光増感剤をプラスミド DNA に導入し、酸化損傷の修復を細胞模倣環境で詳細に解析する実験系の構築に成功した。

酸化損傷を受けた DNA は様々な機構により修復されている。主要な修復機構として、酸化損傷塩基を取り除く塩基除去修復や、酸化損傷塩基が近接して複数生じた場合にヌクレオチドをまとめて取り除くヌクレオチド除去修復などが知られている。これらの修復機構の生化学的な解析の多くは、酸化損傷塩基を予め組み込んだプラスミド DNA を用いて行われてきた。<sup>1</sup>しかし、この方法ではクロマチン形成と修復が同時に進行してしまい、クロマチン形成下での損傷修復を詳細に調べることが困難であった(図 1 上段)。

当研究室ではこれまでに、小型の ONBP(ニトロビフェニル)光増感剤を修飾した ONBP-dU(図 2)を開発し、DNA オリゴ二重鎖中のグアニン(G)の酸化特性を報告してきた。<sup>2</sup>そこで、プラスミド DNA に光で損傷を導入できる ONBP-dU を導入し、クロマチン形成後に DNA の局所に損傷を導入する方法を着想した(図 1 下段)。

まず ONBP-dU を 1 つ導入した 48 nt のオリゴ DNA を合成し、これをプラスミド DNA に組み込んだ。光照射により酸化損傷が導入されるかを検証するため、48 bp のオリゴ DNA 二重鎖を用いて光照射後に熱ピペリジン処理したところ、48 nt DNA よりも短いバンドが観察され、酸化が進行していることが示唆された。つづいて ONBP 修飾プラスミドをもちい、導入された

酸化損傷がツメガエル卵抽出液中で修復されるかを検証した。光照射により酸化損傷を導入後、修復を追跡するため、抽出液に蛍光ヌクレオチド (Cy5-dUTP) を添加しアガロースゲル電気泳動で観察した。その結果、光照射なしでは修復は生じず、光照射した際に、Cy5-dUTP の取り込みが確認された。この結果から、期待した通り ONBP 修飾プラスミドへの光照射による酸化損傷の導入とツメガエル卵抽出液中での修復が可能であることが分かった。本手法では主に G への損傷が想定されるが、T として認識される Cy5-dUTP が修復により取り込まれたことから、複数の G が酸化されヌクレオチド除去修復が進行したことが示唆された。本研究では、光照射によって外部から損傷を操作可能な解析系を構築することができた。今後、クロマチン形成下での DNA の損傷修復機構を調べていく予定である。

1. Kawasoe, Y.; Tsurimoto, T.; Nakagawa, T.; Masukata, H.; Takahashi, T. S. *eLife*. **2016**, 5, e15155.

2. Kanamori, T.; Kaneko, S.; Hamamoto, K.; Yuasa, H. *Sci. Rep.* **2023**, 13, 288.

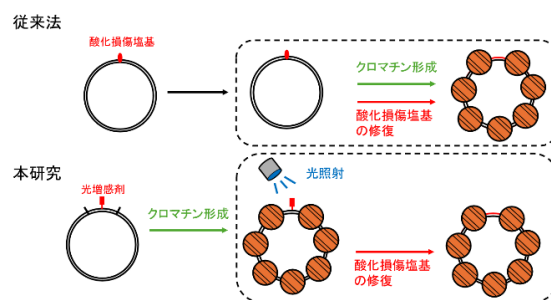


図 1 既存法と本研究の酸化損傷修復解析法

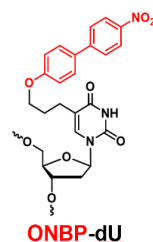


図 2 ONBP 修飾 DNA モノマー

## ゲノム操作に向けた人工核酸プローブを用いた長鎖 DNA 2 本鎖への 光化学的な侵入法の開発

○ZUMILA HAILILI<sup>1</sup>・藤本 健造<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北陸先端大バイオ機能)

### Photochemical invasion of long DNA duplex using artificial nucleic acid probes for genome manipulation

(Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology <sup>1</sup>)

HAILILI, ZUMILA<sup>1</sup>; KENZO, Fujimoto<sup>1</sup>

Genomic DNA stores genetic information and regulate functions of various biological processes. Mutations of DNA can affect human phenotypes, expressing abnormal or dysfunctional proteins, consequently leading to genetic diseases. Main treatments for genetic diseases are usually modifications of the disease phenotype or genotype. One of the approaches is to regulate expression of the abnormal gene. Manipulation of gene requires sequent-selective recognition and invasion of long-range double-strand DNA. Therefor a lot of studies has been focused on artificial moieties that can achieve double-duplex invasion, such as hybrid restriction enzymes, peptide nucleic acids (PNAs), locked nucleic acids (LNAs), etc. However, some of these approaches require large amount of time, or extreme conditions that might not be suitable for *in vivo* applications.

In our previous research, we developed a photo-induced double-duplex invasion (pDDI) method that uses a photo-cross-linkable artificial nucleotide, 3-cyanovinylcarbazole (<sup>CNV</sup>K). <sup>CNV</sup>K can form covalent bond with pyrimidine bases within one second under 366 nm ultraviolet irradiation. It is confirmed that <sup>CNV</sup>K-incorporated probes can achieve double-duplex invasion. And we used 5-cyanouridine (<sup>C</sup>U) to replace the cross-linking site pyrimidine, suppressing the inter-probe cross-linking of the <sup>CNV</sup>K-incorporated probes, and achieving a high pDDI efficiency.

In this study, we investigated the conditions for improving the overall efficiency of the pDDI method. A long-range double- strand DNA is used as the template, photo-cross-linkable ODNs with <sup>CNV</sup>K as the photo-cross-linker and <sup>C</sup>U as inter-probe cross-linking suppressor are used as invasion probes. We confirmed that our method can achieve pDDI over 70%. While comparing with other DDI methods, such as G+-PNA and NLS-pcPNA, pDDI had the advantages of achieving high efficiency within a short period of time span under temperature natural for human body --- 1 hour incubation and 1 min photo irradiation at 37°C. We aim for future applications of pDDI method *in vitro*, and *in vivo* environments.



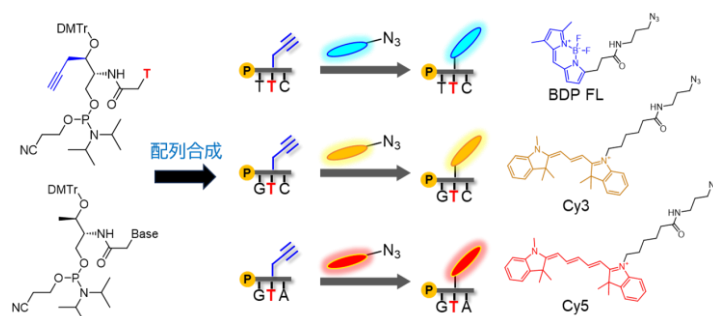
## 非酵素的な鎖伸長反応を基にした人工核酸の疑似翻訳反応の開発

○堀田有輝・沖田ひかり・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

**Development of Pseudo-Translation Reactions for Artificial Nucleic Acids Based on Non-Enzymatic Chain Elongation Reactions** (Graduate School of Engineering, Nagoya University) HOTTA, Yuki; OKITA, Hikari; MURAYAMA, Keiji; ASANUMA, Hiroyuki

当研究室で開発された人工核酸 L-*a*TNA は DNA よりも安定な二重鎖を形成することが可能であるだけでなく、DNA や RNA とヘテロな二重鎖を形成することができる。また酵素に分解されないという特徴も有しているため、新たな生物学的ツールとして応用が展開されている。当研究室での先行研究において、L-*a*TNA の自己複製を指向した非酵素的鎖伸長反応の開発を行ってきた。L-*a*TNA は酵素に認識されないためポリメラーゼによる伸長反応が不可能であったが、L-*a*TNA の 3-mer 断片のランダムプールを原料にし、テンプレート上で断片配列を逐次的にケミカルライゲーションさせることで、L-*a*TNA の非酵素的な鎖伸長反応を実現した<sup>1,2</sup>。

そこで本研究では、L-*a*TNA の配列情報を元に、機能を持つ分子の配列を合成する「L-*a*TNA の疑似翻訳反応」の開発を目指す。具体的には、鎖伸長の原料となる L-*a*TNA の 3-mer 断片に対し、配列ごとに異なる蛍光色素を導入しておくことで、鎖伸長反応に伴って鋳型配列に応じて色素分子が配列するシステムを設計した。L-*a*TNA に色素分子を導入する方法としては、末端アルキンで修飾した L-*a*TNA 骨格のヒュスゲン環化反応（クリック反応）を利用する。配列させる色素分子として、3 種類の異なる波長の蛍光色素（BDP-FL、Cy3、Cy5）を選択した。

図 1. L-*a*TNA 断片配列への蛍光色素分子導入

まず配列中央に末端アルキン修飾を持つ 3 種類の 3-mer L-*a*TNA 断片配列を合成し、それぞれ異なる蛍光色素のアジドと CuAAC 反応にて連結させた（図 1）。この断片配列が BDP-FL、Cy3、Cy5 の順で伸長する設計の L-*a*TNA Template、Primer 存在下、*N*-Cyanoimidazole/Mn<sup>2+</sup>で処理することで鎖伸長反応を行った（図 2 上）。

PAGE 解析の結果、FRET 消光により明瞭な確認が困難であったものの、設計通りの順序で鎖伸長が起きており、完全長産物には全ての色素が含まれていることが確認された（図 2 下）。すなわち、疑似翻訳反応の実証に成功した。本発表では異なる鋳型配列の結果についても報告する。

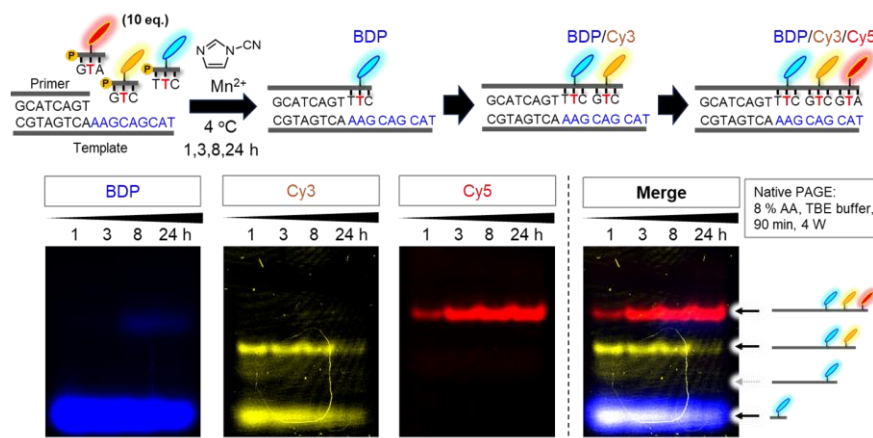


図 2. 疑似翻訳反応のスキーム(上図)及び PAGE 解析結果(下図)

1. K. Murayama *et al. Nat. Commun.*, **2021**, *12*, 804.
2. H. Okita *et al. J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, *145*, 17872-17880.

## ハンマーヘッドリボザイムの酵素反応に関する理論的研究

○松山綾夏<sup>1</sup>・田口真彦<sup>2</sup>・林重彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>京大院理、<sup>2</sup>東北大多元研)Theoretical study on an enzymatic reaction of the hammerhead ribozyme (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.<sup>1</sup>, IMRAM, Tohoku Univ.<sup>2</sup>) MATSUYAMA, Ayaka<sup>1</sup>; TAGUCHI, Masahiko<sup>2</sup>; HAYASHI, Shigehiko<sup>1</sup>

リボザイムとは酵素活性を持つ RNA である。本研究で扱っているハンマーヘッドリボザイム (図1) は、他の RNA 分子の配列に作用し特定特定の結合を切断する機能を持つ。その性質を活かせば、病気に関わる遺伝配列を切断できると考えられるため、ハンマーヘッドリボザイムは遺伝子治療への応用が期待されている。現在、ハンマーヘッドリボザイムの切断反応は、G12:N1 が一般塩基触媒、G8:O2' が一般酸触媒、C-site と G-site に存在する 2つの  $Mg^{2+}$  が触媒として機能し、① G12 の脱プロトン化、②プロトン移動、③求核攻撃の 3 段階の逐次反応によって進むと考えている (図2)。しかし、リボザイムは複雑な高次構造をとる高分子で実験から活性部位の状態を観察することが難しいため、切断反応機構の詳細は明らかになっていない。そこで、理論的な計算法を用いれば、リボザイムのような巨大で複雑な分子でもシミュレーションによって反応機構を解析することができる。

本研究では、その切断反応機構について、本研究で開発された QM/MM RWFE-SCF 法<sup>[1]</sup>を用いて構造最適化を行うことで解析する。この計算法では、MD シミュレーションによって作成した長時間スケールの MM サンプルングを QM 計算に読み込ませて行うが、MM サンプルングの幅広い自由エネルギーの面に沿って QM 計算が行えるように工夫されている。それにより、本研究室では、これまでタンパク質の系における計算で、精度の良い構造変化の記述を実現してきた。リボザイムの場合では、電気的に複雑なホスホジエステル結合の切断反応や、切断反応に伴う周囲の RNA 環境の長時間による立体構造変化を正確に記述することが可能となる。そして、最適化した 2つの構造をつないで FEP (自由エネルギー摂動) 法による自由エネルギー計算を行い、反応経路を明確にしていく。

シミュレーション系の溶媒の  $Mg^{2+}$  濃度は、ハンマーヘッドリボザイムの標準的な溶媒の  $Mg^{2+}$  濃度として定められている 10 mM<sup>[2]</sup> に調整した。RNA は負電荷が強いため、標準濃度にするために計算上必要な数の  $Mg^{2+}$  だけを入れても、それらの  $Mg^{2+}$  は全てリボザイムに結合してしまう。そこで、様々な数の  $Mg^{2+}$  を含む系をモデリングして、それぞれの系に対して 100 ns の MD シミュレーションを行い、溶媒中を自由に動き回っている  $Mg^{2+}$  の数を調べることで、溶媒に加える  $Mg^{2+}$  の数を決定した。そして、それから QM/MM RWFE-SCF 計算による構造最適化を始めた。

これまでの計算結果からは、C17:2'OH が脱プロトン化した状態は非常に不安定であることが分かっている。仮説では、反応 2 段階目のプロトン移動と、3 段階目の求核攻撃における求核剤 C17:O2' が P 原子を攻撃する反応は、逐次反応として進むと考えていた。しかし、この結果は、この 2つの反応は段階的な反応ではなく協奏反応として進む可能性が高いことを示している。現在は、さらに協奏反応であることを明確にしていくために、FEP 法による自由エネルギー計算を行っているところである。

[1] Hayashi S et al. *Annu Rev Phys Chem.* 2017, 68, 135-154.[2] Scott WG et al. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013, 120, 1-23.

図1：ハンマーヘッドリボザイムの三次構造

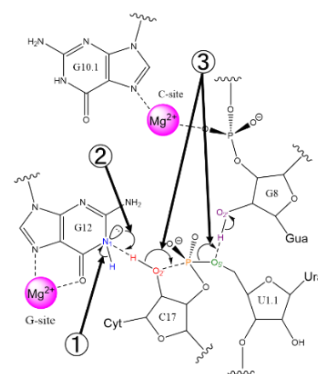


図2：現在推測されている切断反応機構

## 塩基修飾におけるリンカーアーム構造が DNA ポリメラーゼ反応の効率に及ぼす影響

○片岡由佳<sup>1</sup>・永谷恵梨佳<sup>1</sup>・星野秀和<sup>2</sup>・笠原勇矢<sup>2,3</sup>・小比賀聡<sup>3,4</sup>・榎原正靖<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 日大院総合基、<sup>2</sup> 医薬健康研、<sup>3</sup> 阪大院薬、<sup>4</sup> 阪大先端)

**Effects of linker arm structures on the efficiency of DNA polymerase reaction** (Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University<sup>1</sup>, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition<sup>2</sup>, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University<sup>3</sup>, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University<sup>4</sup>) KATAOKA, Yuka<sup>1</sup>; NAGATANI, Erika<sup>1</sup>; HOSHINO, Hidekazu<sup>2</sup>; KASAHARA, Yuuya<sup>2,3</sup>; OBIKA Satoshi<sup>3,4</sup>; KUWAHARA, Masayasu<sup>1</sup>

塩基修飾核酸は DNA のシーケンシングや高親和性アプタマーの開発など、バイオテクノロジーや医薬品への利用が期待されている。それらの化学修飾は一般的にピリミジン塩基の C5 位や 7-デアザプリン塩基の C7 位に施されており、三リン酸体は DNA ポリメラーゼに受容されることが明らかとなっている<sup>1</sup>。これまでに、Gold らはウラシルまたはシトシン塩基の C5 位にトリプトファンなどの芳香族アミノ酸の側鎖を修飾した SOMAmer を開発している<sup>2</sup>。また、我々はウラシル塩基の C5 位またはアデニン塩基の C7 位にアデニンまたはグアニン塩基を導入することで、標的に対して高親和性なアプタマーを取得している<sup>3,4</sup>。これらの結果は、窒素を含む二環式化合物の塩基部位への導入がアプタマーとターゲット間の結合を強めることを示唆している。一方、アルキンや *E*-アルケンなどの剛直な構造を有するリンカーを含む C5 位修飾ピリミジンが PCR により効率よく増幅されることは明らかになったが<sup>5</sup>、リンカーアーム構造が DNA ポリメラーゼ反応に及ぼす効果についてはほとんど検証されていない。従って、本研究では、リンカーアーム構造の異なる 3 種類の塩基修飾ヌクレオシド三リン酸 (dU<sup>amb</sup>TP, dU<sup>urb</sup>TP, dU<sup>tub</sup>TP) を合成し (Figure 1)、それらの基質特性を KOD DNA ポリメラーゼ改変体<sup>6</sup>を用いて検証した。

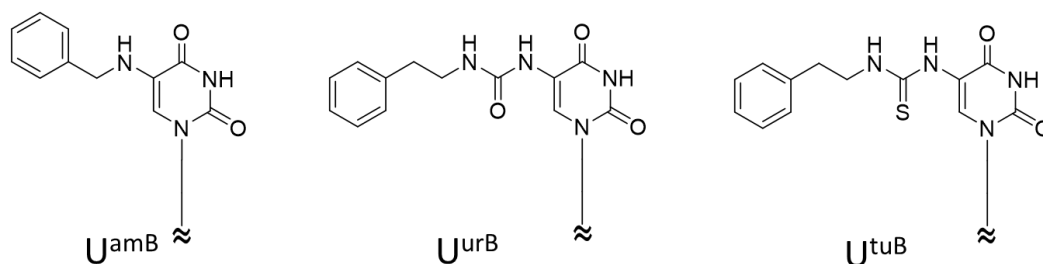


Figure 1. 合成した塩基修飾ヌクレオシド三リン酸 (dU<sup>amb</sup>TP, dU<sup>urb</sup>TP, dU<sup>tub</sup>TP) の化学構造

- 1) Hock M. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 9914–21.
- 2) Gold L, Ayers D, Bertino J, *et al.* *PLoS One.* **2010**, 5, e15004.
- 3) Imaizumi Y, Kasahara Y, Fujita H, Kitadume S, Ozaki H, Endoh T, Kuwahara M, Sugimoto N. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 9412–9.
- 4) Minagawa H, Shimizu A, Kataoka Y, Kuwahara M, Kato S, Horii K, Shiratori I, Waga I. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 1780–7.
- 5) Lee S E, Sidorov A, Gurlain T, Mignet N, Thorpe S J, Brazier J A, Dickman M J, Hornby D P, Grasby J A, Williams D M. *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 1565–73.
- 6) Hoshino H, Kasahara Y, Kuwahara M, Obika S. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 21530–7.

## 光架橋性ペプチド核酸による新規光駆動型ゲノム編集技術の開発

○中尾樹希<sup>1</sup>・三瓶悠<sup>1</sup>・松崎有修<sup>1</sup>・駒野淳<sup>2</sup>・柴田淳史<sup>3</sup>・山本剛史<sup>1</sup>・堂野主税<sup>4</sup>・和田健彦<sup>5</sup>・山吉麻子<sup>1,6</sup> (<sup>1</sup>長崎大院医歯薬、<sup>2</sup>大阪医科薬科大薬、<sup>3</sup>慶応義塾大学薬学部、<sup>4</sup>大阪大産研、<sup>5</sup>東北大多元研、<sup>6</sup>東工大生命理工)

**Development of Photo-Reactive Peptide Nucleic Acids for Novel Photo Genome Editing Tools** (<sup>1</sup>Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, <sup>2</sup> Faculty of Pharmacy, Osaka Medical and Pharmaceutical University, <sup>3</sup> Faculty of Pharmacy, Keio University, <sup>4</sup> SANKEN, Osaka University, <sup>5</sup> IMRAM, Tohoku University, <sup>6</sup> Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) Juki Nakao<sup>1</sup>, Yu Mikame<sup>1</sup>, Yusuke Matsuzaki<sup>1</sup>, Jun A. Komano<sup>2</sup>, Atsushi Shibata<sup>3</sup>, Tsuyoshi Yamamoto<sup>1</sup>, Chikara Dohno<sup>4</sup>, Takehiko Wada<sup>5</sup>, and Asako Yamayoshi<sup>1,6</sup>

CRISPR/Cas9 システムは従来のゲノム編集ツールと比較して、簡便かつ高いゲノム編集効率を有する画期的なツールとして知られており、現在も急速に開発が進められている<sup>[1]</sup>。その一方で、細菌性由来の DNA 切断酵素 (Cas9) を用いる必要があり、このことが CRISPR/Cas9 システムの実用化に際する課題の一つとなっている。そこで我々は、ゲノム DNA に直接作用可能な人工核酸であるペプチド核酸 (PNA) を用いたゲノム編集技術に着目した。PNA は主鎖に 2-アミノエチルグリシン骨格を有し、電荷をもたないため、相補鎖 DNA との高い熱力学的安定性を示す。また、核酸分解酵素に対する高い耐性を有することも特徴の一つである。2016 年に Bahal らは、長鎖 PNA と短鎖 PNA を、リンカーを介して結合させた tail-clamp PNA (tc-PNA) を用いることで、*in vivo* におけるゲノム編集を達成した<sup>[2]</sup>。しかし、CRISPR/Cas9 のゲノム編集効率が最大で 70%程度であるのに対し、tc-PNA は 6%程度であり PNA の高機能化が求められている。

そこで、当研究室では光架橋性分子である trioxsalen に着目した。Trioxsalen は皮膚疾患治療薬として知られる 8-methoxypsoralen の類縁体であり、DNA のピリミジン塩基間にインターカレート後、UV-A 光を照射することで、隣接するピリミジン塩基と[2+2]環化付加反応を介して架橋体を形成する。この架橋体形成によって DNA 複製が強く阻害されることから、trioxsalen は強力な DNA 損傷能を有する分子として知られている。しかしその一方で、trioxsalen 単体の DNA 架橋能は配列特異性をもたない。

本研究では、trioxsalen を導入した tc-PNA (Trioxsalen-tc-PNA) を合成することで、強力な DNA 損傷能を配列特異的に発揮する、新しい光ゲノム編集ツールの開発を目指した。tc-PNA への trioxsalen の導入は、独自に開発した Trioxsalen-NHS を用いて行った<sup>[3]</sup>。次に、細胞培養系でゲノム編集活性を評価するためのレポータープラスミドを構築した。本プラスミドは、tc-PNA のターゲット配列に加え、Firefly および Renilla ルシフェラーゼ遺伝子 (F.F. Luc および R. Luc) から構成され、通常時は F.F. Luc 活性のみ観察されるが、tc-PNA によってプラスミド遺伝子が編集されることで F.F. Luc 活性が減少し、R. Luc 活性が新たに現れるように構築されている。この評価系にてゲノム編集効率を評価した結果、Trioxsalen-tc-PNA 処理群に UV-A 照射を行った場合のみ、F.F. Luc 活性が約 70%減少し、R. Luc 活性が約 40 倍増加した。本結果は Trioxsalen-tc-PNA によって、生細胞中での光ゲノム編集を達成したことを示すものである。さらに、直鎖型 PNA (liner-PNA) に trioxsalen を導入した Trioxsalen-liner-PNA では、UV-A 照射を行った場合に F.F. Luc 活性が約 90%減少した一方で、有意な R. Luc 活性は認められなかった。これらの結果は、tail-clamp 構造がゲノム編集活性に対して優位に働いていることを示すものである。発表では詳細なゲノム編集メカニズムについても併せて報告する。

[1] M. Jinek, *et al.*, *Science*, 2012, 6096, 816-821.

[2] R. Bahal, *et al.*, *Nature Communications*, 2016, 7, 13304-13318.

[3] J. Nakao, *et al.*, *ChemBioChem*, 2023, 24, e202200789.

## 分子クラウディング環境に応答するグアニン四重鎖形成領域のゲノムワイドスクリーニング

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

**Screening of G-quadruplex forming sequences under molecular crowding environment** (FIRST, Konan University<sup>1</sup>, FIBER, Konan University<sup>2</sup>, School of Medicine, Niigata University<sup>3</sup>) ENDOH, Tamaki<sup>1,2</sup>; OKUDA, Shujiro<sup>3</sup>; LING, Yiwei<sup>3</sup>; TATEISHI, Hisae<sup>1,2</sup>; SUGIMOTO, Naoki<sup>2</sup>

核酸は、その配列に依存して様々な構造を形成する。その構造は、核酸分子が存在する溶液環境などに依存して多变的に変動する<sup>1</sup>。また、核酸構造が複製、転写、翻訳などの反応に影響を及ぼすことも明らかになっている<sup>2</sup>。これらのことから我々は、多变的に変動する核酸構造に基づいて遺伝子の発現が調節される機構が様々な生物種で存在していると想定している。このような遺伝子発現の調節機構を理解するためには、環境に応答して構造を変動させ得る DNA や RNA の領域を抽出し、核酸構造の物理化学的な解析を進めていくことが重要となる。

本研究では、核酸構造の中でもグアニン四重らせん (G4) 構造に着目し、特定の分子や環境に応答して G4 構造を形成する DNA 領域をゲノムワイドにスクリーニングする技術を構築した。具体的には、微生物ゲノムを断片化した DNA ライブラリを調整し、ライブラリに由来する 1 コピーの DNA 断片を増幅しつつ個別の微粒子上に固定化した。得られた数百万種類の微粒子群を、平均分子量 200 のポリエチレングリコール (PEG200) を高濃度で含む溶液中で G4 構造に対する蛍光プローブ分子と混合し、微粒子が示す蛍光シグナルを解析した。そして、プローブ分子が結合して強い蛍光を発している微粒子を、FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いて選別、回収し (図 1)、固定化されている DNA 断片の配列解析を行った。その結果、バイオフィーマティクス解析で抽出された 3 枚のカルテットを形成する G4 構造の形成可能領域のほとんどが、実際に G4 構造を形成する配列として回収された。また、2 枚のカルテットを形成する G4 構造の形成可能領域も多数回収された。さらに、グアニンの連続配列の間に長いループ配列が存在し、バイオフィーマティクス解析では G4 構造の形成可能領域としてリストされない配列であっても、PEG200 を高濃度で含む分子クラウディング環境中では G4 構造を形成できることが見出された。このことは、これまで考えられてきた以上にゲノム上の様々な領域で G4 構造が形成され、遺伝子の発現調節に関与し得ることを示している。特に、2 枚のカルテットを形成する適度に不安定な G4 構造は、細胞内のカリウム濃度などにも敏感に応答して遺伝子発現に影響する可能性があると考えられる。

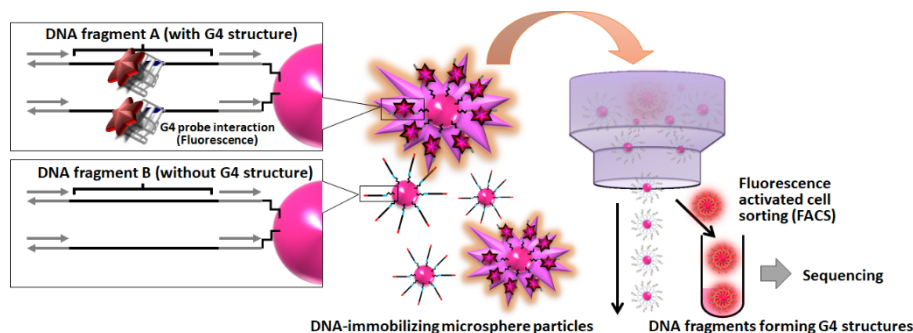


図 1 ゲノム DNA 断片を固定化した微粒子群および蛍光プローブ分子を利用した G4 構造形成領域のスクリーニング原理

### 【参考文献】

- 1) T. Endoh, H. Tateishi-Karimata, and N. Sugimoto, in *Handbook of Chemical Biology of Nucleic Acids*, ed. N. Sugimoto, Springer Nature Singapore, Singapore, (2022), DOI: 10.1007/978-981-16-1313-5\_40-1, pp. 1-45.
- 2) T. Endoh and N. Sugimoto, *Chem. Rec.*, **17**, 817 (2017).



## ニトロベンジル基修飾 DNA オリゴマーの低酸素細胞蓄積特性

○金山愛里<sup>1</sup>・前原大悟<sup>1</sup>・西原達哉<sup>1</sup>・田邊一仁<sup>1</sup>・(青山学院大院理工)

**Accumulation of nitrobenzyl group-tethered oligodeoxynucleotides in hypoxic cells** (Graduate school of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University<sup>1</sup>) KANAYAMA, Airi<sup>1</sup>; MAEHARA, Daigo<sup>1</sup>; NISHIHARA, Tatsuya<sup>1</sup>; TANABE, Kazuhito<sup>1</sup>

核酸医薬品は DNA や RNA, その誘導体を基本骨格として従来の小分子医薬品や抗体医薬品では標的にし得なかった mRNA や miRNA を標的とする次世代の医薬品として注目されている。しかし、負電荷を持つホスホジエステル結合と細胞膜の静電反発による細胞膜透過性の低さや病的組織への集積性の低さといった薬剤送達の困難性、血中ヌクレアーゼにより分解されるといった生体内不安定性、オフターゲット効果の懸念といった問題点が指摘されてきた。一方当研究グループは、固形がんが発生する低酸素細胞を標的とした人工核酸の開発を進める過程でアルキル鎖と *o*-ニトロベンジル基を備えた両親媒性人工核酸(ON-ODN)が同細胞に選択的に蓄積することを明らかにしてきた。ON-ODN は水溶液中で疎水性相互作用によって DNA 会合体を形成することでスカベンジャー受容体を経路したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。また、この会合体は低酸素細胞内で還元酵素ニトロレダクターゼ(NR)により活性化され、疎水性官能基が脱離し、会合体が崩壊する結果、低酸素細胞に蓄積する(Figure1)。

本研究ではニトロ基の位置をより反応性が高いパラ位に変更した人工核酸(PN-ODN)をホスホロアミダイト法を用いて合成し、反応性並びに低酸素細胞への蓄積特性を調べた<sup>1</sup>。PN-ODN と ON-ODN を NR と電子供与体 NADH 存在下で 37 °Cにてインキュベートした後、反応を HPLC を用いて解析した。その結果、いずれの場合も未修飾 DNA オリゴマーが生成したが、PN-ODN は ON-ODN と比較してより効率的な反応特性を示した。さらに蛍光色素で標識した人工核酸を用いて、低酸素と有酸素それぞれの条件で培養したヒト肺がん細胞 A549 への各 DNA の取込み効率を調べたところ、18 量体の PN-ODN、ON-ODN 共に低酸素細胞で強い発光が観察された。この結果は、PN-ODN は ON2-ODN と比較してより低酸素細胞に蓄積しやすいことを示している(Figure2)。また、現在、これら2種の人工核酸を活用して、低酸素細胞内の遺伝子発現制御実験を行っており、併せて報告する予定である。

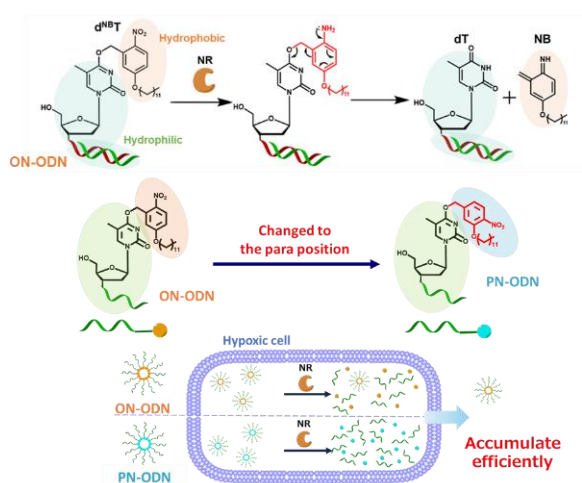


Figure1. Molecular design and mechanisms

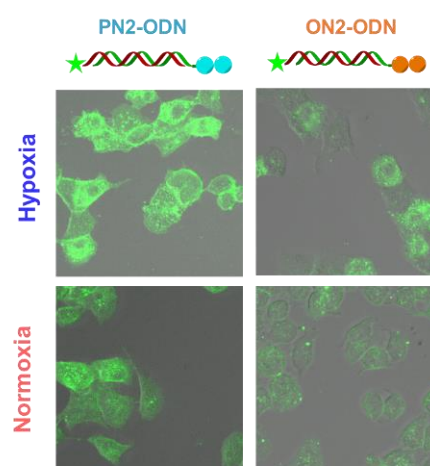


Figure2. Cellular uptake of PN-ODN and ON-ODN

1. S. M. Hecht et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 37, 12009–12012

## 液-液相分離における DNA トポロジーの効果

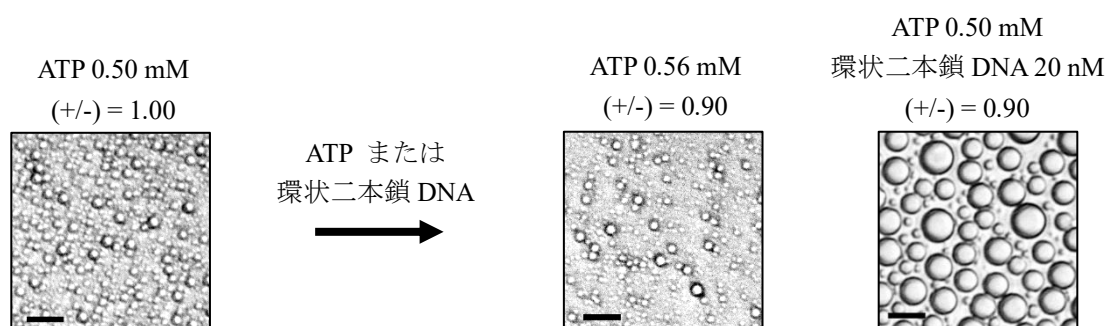
○千田隆誠<sup>1</sup>・田立ののか<sup>2</sup>・文屋諒太郎<sup>2</sup>・田代竜<sup>3</sup>・大吉崇文<sup>1,2,4,5</sup> ( <sup>1</sup> 静大院理、<sup>2</sup> 静大理工、<sup>3</sup> 鈴鹿医療科学大薬、<sup>4</sup> 静大院創造・<sup>5</sup> 静大グリーン研 )

**Effect of DNA topology on liquid-liquid phase separation** (Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ.<sup>1</sup>, Faculty of Science, Shizuoka Univ.<sup>2</sup>, Faculty of Pharmaceutical Sciences Suzuka Univ. of Medical Science<sup>3</sup>, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.<sup>4</sup>, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.<sup>5</sup>) SENDA Ryusei<sup>1</sup>, TADACHI Nonoka<sup>2</sup>, BUNYA Ryotaro<sup>2</sup>, TASHIRO Ryu<sup>3</sup>, OYOSHI Takanori<sup>1,2,4,5</sup>

転写活性が高いプロモーター中の二本鎖 DNA 領域では、液-液相分離によって転写因子が高濃度で集合して、転写活性が上昇する<sup>1)</sup>。一方で、転写の過程で変化する DNA のトポロジーも転写活性の制御に関与している<sup>2)</sup>。しかし、DNA トポロジーの違いと液-液相分離の関係は不明である。これまで二本鎖 DNA を用いた液-液相分離の研究はいくつか行われているが、二本鎖 DNA はポリ-L-リシン(PLL)存在下の試験管内で凝集体を形成しやすいことがわかっている<sup>3)</sup>。そのため、二本鎖 DNA 存在下における液滴を観察するには、短鎖 DNA を用いたり、生体内の平均値を上回る高塩濃度条件を用いたりする必要があり、生理的条件下とは大きく異なっている。そこで我々は、二本鎖 DNA を含む液滴条件を検討するため、生理的条件下に近い液-液相分離のモデルとしてよく用いられている ATP と PLL の存在下における環状二本鎖 DNA の液滴形成を試みた。

大腸菌から精製した環状二本鎖 DNA を ATP と PLL とともに混合して相分離させ、形成された液滴を顕微鏡で観察した。ATP と PLL 存在下において、電荷比が一定になるように ATP または環状二本鎖 DNA の濃度条件を変化させると、環状二本鎖 DNA が ATP に比べて大きな液滴を形成した(図)。また、相分離によって形成されたコアセルベートを定量化するために 500nm の吸光度を測定すると、環状二本鎖 DNA 存在下では非存在下に比べて吸光度が上昇した。これらの結果から、環状二本鎖 DNA は液滴やコアセルベートの形成を促進することが分かった。

環状二本鎖 DNA を用いて DNA トポロジーの違いと液-液相分離の関係も比較したので、その結果を含めて報告する予定である。



図：ATP または環状二本鎖 DNA 存在下における液滴形成の比較 (Scale bar: 10  $\mu$ m)

- 1) *Cell*, 2017, 169, 13-23.
- 2) *Cell*, 2016, 165, 357-371.
- 3) *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, 140, 1632-1638.

## Terminal Deoxynucleotidyl Transferase を用いた長鎖ポリヌクレオチドの作製とその生化学的応用

○川本明穂・中村光伸・高田忠雄（兵庫県立大院工）

**Preparation of Long-Chain Polynucleotides Using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Their Biochemical Applications** (Graduate School of Engineering, University of Hyogo) KAWAMOTO, Akiho; NAKAMURA, Mitsunobu; TAKADA, Tadao

DNA の合成は、固相合成または DNA ポリメラーゼを用いた酵素的方法によって行うことができる。固相合成法は大量の DNA を合成するのに適しているが、オリゴヌクレオチドの長さや化学的性質によって制限がある。ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) は、化学修飾された dNTP を受け入れることができるテンプレート非依存性ポリメラーゼであり、長さの揃った長鎖 DNA の合成を可能にする酵素である。本研究では、テンプレート非依存的伸長に対する TdT の酵素的特性を利用し (図 1a)、DNA ネットワーク構造体を構築するための長いオリゴヌクレオチドを合成した。分岐 DNA を元にし、伸長した一本鎖の末端を持つ DNA を作製し、相補的な分岐 DNA の自己組織化を通じたハイドロゲルネットワーク構造体を構築した。また、電極基板上での TdT の伸長による電気化学シグナル増幅を利用した、生体分子センサーとしての応用性について検討した。

15mer 配列の一本鎖 DNA を元にして TdT による伸長反応を行ったところ、均一な長さのポリヌクレオチドが合成された (図

1b)。Y 字型に分岐した DNA を dAn と dTn と組み合わせると、高分子の DNA の形成を示す顕著なバンドの変化が見られ、DNA ネットワーク構造体の構築が可能であることが分かった。次に、電極基板上に固定した DNA を元にした伸長反応を行った。伸長した DNA に光増感分子を吸着させた後に可視光を照射すると、強い光電流が検出された。光電流検出法とターゲット核酸の有無に依存した TdT 反応を利用することで、高感度な核酸検出バイオセンサーとして利用できることが分かった。

本研究では、鋳型に依存しないポリメラーゼである TdT を応用して、均一な長さの長いポリヌクレオチドを作製し、分岐した DNA を用いて DNA ネットワーク構造体を構築した。電極に固定した DNA 上で TdT を反応させると、電気化学シグナルと光電流シグナルの増幅が観測された。本研究のアプローチは、高効率な DNA ハイドロゲルの作製、高感度バイオセンサーなどの様々な応用が期待される。

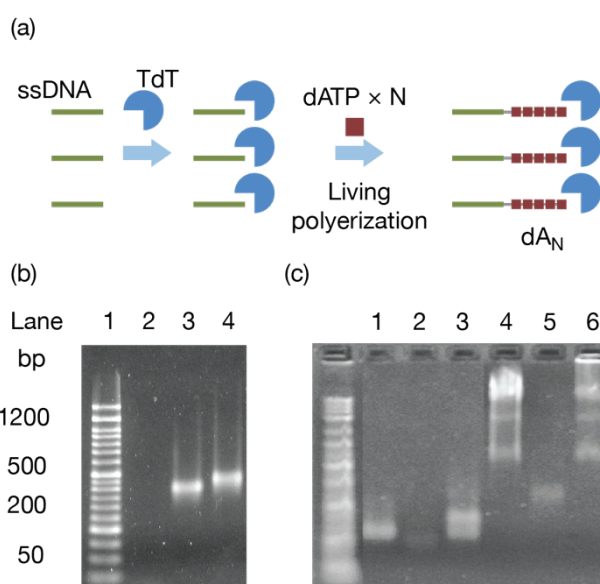


Figure 1. (a) Scheme of elongation reaction from single strand DNA using TdT. (b) Extension of ssDNA with dATP by TdT. Lane: 2-4 (dATP: 0, 500, 1000 eq). (c) ssDNA and branched DNA with polynucleotides (dAn and dTn). Lane: 1-3 (ssDNA: dAn, dTn, dAn/dTn); 4-6 (branched DNA: dAn, dTn, dAn/dTn).

## In droplet 実験進化による GFP 模倣型蛍光 RNA アプタマーの

## 機能構造相関の解析と性能向上変異体の創成

○油屋紫乃<sup>1</sup>・安部俊輔<sup>2</sup>・松村茂祥<sup>1,2</sup>・井川善也<sup>1,2</sup>( <sup>1</sup> 富山大院医薬理工学環、<sup>2</sup> 富山大院理工 )**In droplet evolution of an RNA aptamer lightning-up a GFP-type fluorophore for its structural analysis and functional improvement**(Graduate School of Pharma-Medical Science, University of Toyama<sup>1</sup>, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, University of Toyama<sup>2</sup>) ABURAYA, Shino<sup>1</sup>; ABE, Shunsuke<sup>2</sup>; MATSUMURA, Shigeyoshi<sup>1,2</sup>; IKAWA, Yoshiya<sup>1,2</sup>

緑色蛍光タンパク質 (GFP) は、タンパク質のイメージングを可能にし、現在様々な分野で応用されている。タンパク質と同様に生体内分子である RNA も細胞機能において複雑な役割を担っているが、天然に蛍光を発する RNA は未だ発見されていない。そこで単体では蛍光性が微弱な色素に特異的に結合し、その蛍光を増強する蛍光 RNA アプタマーが開発された。その中でも GFP の発色団 HBI を模倣した色素は細胞毒性がなく、その蛍光 RNA アプタマーは in vivo での応用が期待されている。

本研究では DMHBI (Fig.1) に結合し、蛍光誘起する RNA アプタマー “17-3” の機能構造相関の解明と性能向上変異体の創成を目指し、進化分子工学による実験進化を試みた。

まず小型化した 17-3 RNA 二次構造の予想モデルを変異体の活性評価で検証した。17-3 RNA の予想構造は、二種類の二次構造予測ソフト (mfold, MXfold2) を使用し、それぞれの利点を組み合わせることで予測した。予測に基づいて、作成した変異体の活性評価によって検証した結果、左右にループを持つ構造であることが示唆された (Fig.2)。

次に、3 つの異なる方法による変異配列ライブラリーからの実験進化を行った。実験進化では前段の結果を次の配列ライブラリーのデザインに取り入れつつ、3 回の実験進化を段階的に行った。最初の実験進化では、野生型の 17-3 RNA 配列に対し、変異誘発 PCR で塩基置換をランダムに導入した。得られたプールの配列解析を行った結果、蛍光増強に関与する変異が見られた。その一方で、ループ領域にはあまり変異が入らなかった。そこで第 2 の実験進化では、左右のループ領域を 5 つに分割し、各領域に transversion 変異との二種混合塩基となるサブライブラリーを設計し、それらの混合したライブラリーを用いて選別実験を行った。プールの配列解析を行った結果、1 配列あたりの変異数が多く、機能構造相関は発見できず、また、新たな性能向上に関わる変異も見られなかった。第 3 の実験進化では、左右のループ領域に対するドープ変異導入ライブラリーを設計・使用した。本発表では、それぞれの実験進化で得られた変異体の配列と機能の評価、その結果を踏まえた次の配列デザイン、最終的に濃縮された変異体プールの活性などについて報告する。

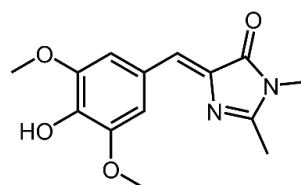


Fig.1 DMHBI の構造式

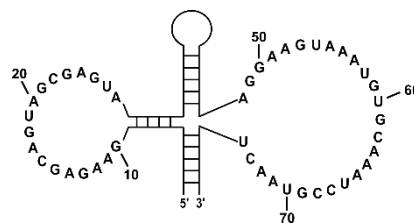


Fig.2 17-3 RNA 予測二次構造

1) J. S. Paige., K.Y. Wu., S. R. Jaffrey, *Science*, 333, 642-646 (2011)

## テロメラーゼ活性阻害を志向した光架橋性核酸の開発

○西川梨沙・小畑健太郎・松原一稀・松尾和哉・和久友則・小堀哲生（京工繊大院工芸）

**Development of photo-cross-linking oligonucleotides to inhibit telomerase activity** (Graduate School of Science and Technology, Kyoto Institute of Technology) NISHIKAWA Risa; KOBATA Kentaro; MATSUBARA Kazuki; MATSUO Kazuya; WAKU Tomonori; KOBORI Akio

がん細胞で高発現しているテロメラーゼは、細胞のがん化に関わるリボヌクレオタンパク質であるため、抗がん剤の標的として高い注目を集めている。テロメラーゼはテロメラーゼ RNA を鋳型として染色体末端のテロメア配列を伸長するため、テロメラーゼ RNA と相補的な配列をもつ DNA および 2'-*O*-methyl-RNA を配列選択的な競合阻害剤として用いることができる<sup>1</sup>。また、テロメラーゼの活性部位に作用する共有結合性低分子が、強力かつ持続的にテロメラーゼ活性を阻害することが報告されている<sup>2</sup>。そこで本研究では、オリゴ核酸阻害剤と共有結合性低分子阻害剤を組み合わせることで、配列選択的かつ持続的な阻害効果をもつテロメラーゼ活性阻害剤の開発を目指す。

光照射により活性化される共有結合形成部位（光応答性  $\alpha$ -クロロアルデヒド (PCA)）が 3'末端もしくは 5'末端に導入された光架橋性核酸を設計した（Table 1）。オリゴ核酸骨格には、テロメラーゼの基質である DNA もしくは 2'-*O*-methyl-RNA を用いた。HeLa 細胞抽出液に光架橋性核酸を添加し、UV 光（365 nm, 400 mW/cm<sup>2</sup>）を 1 分間照射した後、TRAP assay (Telomerase Repeat Amplification Protocol) を用いてテロメラーゼ活性を評価した。添加した ODN<sup>tl</sup>-PCA の濃度とテロメラーゼ活性の関係を Figure 1 に示す。UV 光照射を行った場合の 50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>）は 13 nM、UV 光照射を行わなかった場合は 443 nM であった。光応答性部位を DNA の 3'末端に導入した場合に、光照射により、テロメラーゼ活性阻害効果が 34 倍に上昇したことから、ODN<sup>tl</sup>-PCA がテロメラーゼ活性阻害剤として非常に有望であることが明らかとなった。

Table 1. Sequence of phot-cross-linking oligonucleotides.

|                        | Sequence                            |
|------------------------|-------------------------------------|
| hTR (template) 3'      | ... GUCAAUCCCAAUC ... 5'            |
| ODN <sup>tl</sup> -PCA | 5' c a g t t a g g g t t a g PCA 3' |
| PCA-ODN <sup>tl</sup>  | 5' PCA c a g t t a g g g t t a g 3' |
| ORN <sup>tl</sup> -PCA | 5' <u>CAGUUAGGGUUAG</u> PCA 3'      |
| PCA-ORN <sup>tl</sup>  | 5' PCA <u>CAGUUAGGGUUAG</u> 3'      |

a, t, g, c: DNA; A, U, G, C: 2'-OMe RNA

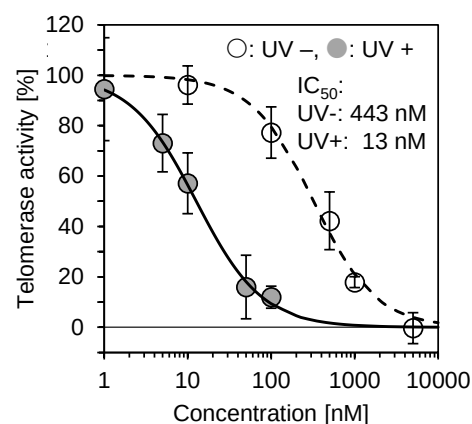
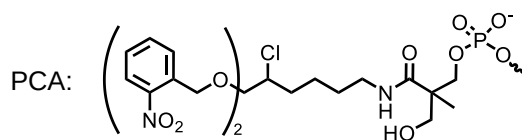


Figure 1. Dose-dependent inhibition of telomerase activity by ODN<sup>tl</sup>-PCA.

1. D. R. Corey, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1998**, *95*, 11549–11554.
2. K. Scheidt, *et al.*, *ACS Chem. Biol.*, **2020**, *15*, 706–715.



## 幅広い pH 変化とカテプシン活性を同時に検出可能な多元同時センサーの開発

○ Asif Mashal<sup>1</sup>・中田 栄<sup>1,2</sup>・Lin Peng<sup>1,2</sup>・森井 孝<sup>2,3</sup>

(<sup>1</sup> 京都大学大学院エネルギー科学研究科、<sup>2</sup> 京都大学エネルギー理工学研究所、

<sup>3</sup> 京都光華女子大学健康科学部)

### Synthesis and applications of DNA scaffolded sensor to detect wide-range pH and cathepsin activity

(<sup>1</sup>Graduate School of Energy Science, Kyoto University, <sup>2</sup>Institute of Advanced Energy, Kyoto University, <sup>3</sup>Faculty of Health Science, Kyoto Koka Women's University, Japan) ASIF, Mashal<sup>1</sup>; NAKATA, Eiji<sup>1,2</sup>; LIN, Peng<sup>1,2</sup>; MORII, Takashi<sup>2,3</sup>

Simultaneously tracking the concentration and location of critical biological molecules along with changes in the cellular environment, such as intracellular pH and enzymatic activity, helps to understand cellular dynamics. By incorporating various fluorescent probes onto the DNA origami scaffold, innovative analytical tools that can simultaneously detect and identify different parameters at a specific location, would be realized. Therefore, the assembly of multiple fluorescent sensors on a DNA scaffold offers distinct advantages over conventional single-reporter-based sensors. The DNA origami scaffold serves as an ideal framework to spatially organize molecules with nanometer precision, taking advantage of their sequence-driven programmability<sup>1)</sup>.

In this study, the DNA origami technique<sup>2)</sup> was utilized to meticulously assemble different fluorophores to gain insight into the process of macropinocytosis by measuring the associated pH and cathepsin activity, key lysosomal enzymes. Two types of pH-sensitive fluorophores, each characterized by different pK<sub>a</sub> values to allow detection over a wide pH range<sup>3)</sup>, were integrated onto a DNA scaffold along with a pH-insensitive fluorophore to facilitate ratiometric pH detection<sup>4)</sup>. In addition, substrates for cathepsin B and cathepsin D<sup>5)</sup> were incorporated for simultaneous detection of pH and cathepsin activity.

The synthesized sensor provides a sophisticated approach to study cellular processes with high spatial and temporal resolution. It was utilized to simultaneously measure the pH and cathepsin activity in a test tube and will be applicable for real-time measurements in the cells.

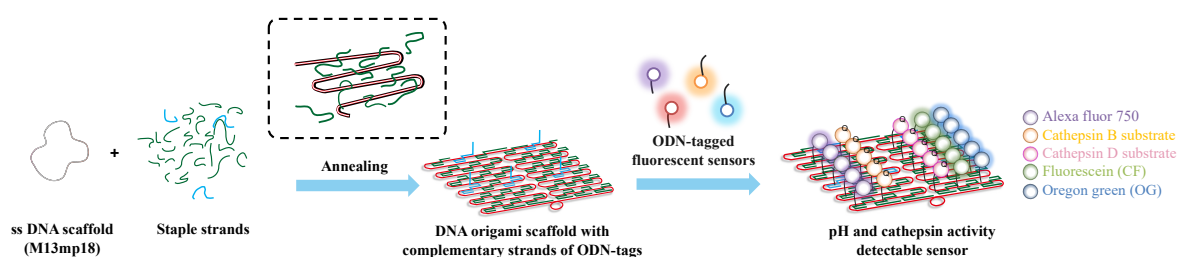


Fig. Synthesis scheme for wide-range pH and cathepsin activity sensor

- 1) As the review: T. A. Ngo, H. Dinh, T. M. Nguyen, F. F. Liew, E. Nakata, T. Morii, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 12428-12446.
- 2) P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, 440, 297-302.
- 3) E. Nakata, K. Gerelbaatar, M. Asif, H. Konishi, Y. Shibano, P. Lin, T. Morii, *Chem.* **2023**, 5, 1832-1842.
- 4) E. Nakata, H. Hirose, K. Gerelbaatar, J.V.V. Arafiles, Z. Zhang, S. Futaki, T. Morii, *Chem. Sci.* **2021**, 12, 8231-8240.
- 5) Z. Zhang, E. Nakata, Y. Shibano, T. Morii *ChemBioChem* **2022**, 23, e202200319.

## パラレル型グアニン四重鎖構造のループに CG 配列を導入した免疫活性化 CpG オリゴデオキシヌクレオチドの特性

○山崎智彦<sup>1,2</sup>・PATHAK, Soumitra<sup>1,2</sup>・百武篤也<sup>3</sup>・池袋一典<sup>4</sup> (<sup>1</sup>NIMS 高分子・バイオ材料研究センター、<sup>2</sup>北大院生命科学、<sup>3</sup>筑波大学、<sup>4</sup>東農工大院工)

**Immunostimulatory activity of CpG oligodeoxynucleotides forming parallel-type guanine quadruplex structure.** (Res. Ctr. Macromol. Biomat., NIMS,<sup>1</sup> Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.,<sup>2</sup> Dept. Chem., Univ. Tsukuba,<sup>3</sup> Grad. Sch. Technol., Tokyo Univ. Agric. Technol.) YAMAZAKI, Tomohiko<sup>1</sup>; PATHAK, Soumitra<sup>2</sup>; MOMOTAKE Atsuya<sup>3</sup>; IKEBUKURO Kazunori<sup>4</sup>

ワクチンには接種効果を増強させるために抗原分子に加えて免疫を賦活化する分子であるアジュバントが添加されている。トール様受容体 9 (以下 TLR9) のアゴニストとして機能する非メチル化 CG 配列を含む一本鎖核酸 (以下、CpG オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)) がアジュバント効果を示すことが報告されており、リン酸骨格を硫黄に置換したホスホロチオエート化修飾 CpG ODN が B 型肝炎ワクチン(Heplisav B)のアジュバントとして実用化されている。しかしながら、ホスホロチオエート化修飾核酸は、非特異的な蛋白質吸着に起因する長期的な副作用が未だ懸念されている。我々は、ホスホロチオエート化核酸の問題点を解決するために、核酸がテロメアで形成する構造であるグアニン四重鎖(G4)構造の安定性に着目し、未修飾核酸を用いたアジュバント開発を進めてきた<sup>1-4</sup>。G4 構造は、パラレル型、アンチパラレル型、ハイブリッド型の 3 つのトポロジーを形成することが知られている。トポロジーにより立体構造が異なることから、G4-CpG ODN の免疫活性化効果も変化すると考えられる。本研究では、3 種類のトポロジーを形成する G4-CpG ODN を構築し、ヌクレアーゼ耐性、細胞取込、また免疫活性化能を比較することで、CpG ODN のスキャホールドとしての G4 構造の最適化を目指した。

我々がすでに構築した G4-CpG ODN<sup>1</sup> の中で 2 番目のループ領域に 2 つの CG 配列を有する GD2 を元に、ループ領域の配列を改変することで GD2 のハイブリッド型のトポロジーをパラレル型もしくはアンチパラレル型に改変した G4-CpG ODN を構築した。円偏光二色性 (CD) による構造解析、電気泳動によるヌクレアーゼ耐性を解析した。また、マウスマクロファージ細胞株をもちいて、CpG ODN が TLR9 に結合することにより誘導されるインターロイキン(IL)-6 を ELISA により定量することで、免疫活性化効果を評価した。

3 種類のトポロジーの中で、パラレル型 G4-CpG ODN が TLR9 を発現しているマクロファージ細胞から IL-6 の高い発現を誘導することが示された。本発表では、パラレル型 G4-CpG ODN が他のトポロジーと比較して高い免疫活性化能を示すメカニズムについて、ヌクレアーゼ耐性、細胞への取込効果、また細胞外と細胞内で形成する G4 構造、さらに TLR9 への結合能を評価することで明らかにしたので報告する。

### 【参考文献】

<sup>1</sup>Tu, A. et.al. Biomacromolecules v21, p.3644, 2020, <sup>2</sup>Safitri, F. et.al. Biomolecules v11, p 11111617, 2021, <sup>3</sup>Tu, A. et.al. ACS Chem Biol v17, p.1703 2022, <sup>4</sup>Tu, A. et.al. Nanomedicine v40, p102508, 2022. <sup>5</sup>Le, N. et al. Biomolecules v13, p1639 2023

## 次世代型核酸医薬を用いた標的遺伝子発現量の調節

○松本愛優<sup>1</sup>・勝田陽介<sup>1,2</sup>・木田朋輝<sup>1</sup>・佐藤慎一<sup>1,2</sup>・北村裕介<sup>1</sup>・井原敏博<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>熊本大学大学院先端科学研究部、<sup>2</sup>株式会社 StapleBio)

**Regulation of target gene expression levels using next-generation nucleic acid medicine.** (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University<sup>1</sup>, StapleBio Inc.<sup>2</sup>) MATSUMOTO, Ayu<sup>1</sup>; KATSUDA, Yousuke<sup>1,2</sup>; KIDA, Tomoki<sup>1</sup>; SATO, Shin-ichi<sup>1,2</sup>; KITAMURA, Yusuke<sup>1</sup>; IHARA, Toshihiro<sup>1</sup>

近年、**siRNA** やアンチセンス核酸といった核酸医薬技術が注目を集めている。これら技術の医薬品化には生体内での分解耐性獲得のため、導入する核酸に化学修飾の導入や骨格改変等が施される。しかし、既存技術の作用機序をみると生体内酵素との協働に基づき薬効を発揮するため、導入できる化学修飾の種類や箇所には制限がでるという問題があった。従って生体内酵素に依存することなく作用する核酸医薬技術開発は、化学修飾選択の幅を広げることに繋がり、長期薬効実現のため大義がある。

我々は RNA hacking (RNAh) という新たな作用機序の核酸医薬技術を開発した。本技術は Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を用い、RNA G-quadruplex (RGq) という強固な高次構造を誘起する。RGq は非常に安定な構造のため Ribosome の進行を阻害し、タンパク質翻訳量の抑制が可能となる。本技術は酵素との協働を必要とせず薬効を発揮するため、Staple 核酸にはより分解耐性の高い化学修飾を選択できる (Fig. 1)。本研究では種々の化学修飾を導入した Staple 核酸を用い、心肥大モデルマウスの病態進行抑制を評価した。心肥大は TRPC6 というイオンチャネル増加と、それに伴う代謝応答が影響している。そこで、我々は TRPC6 遺伝子途上に RGq を誘起し翻訳阻害することで、TRPC6 発現量低下ひいては心肥大の進行抑制ができると考えた。

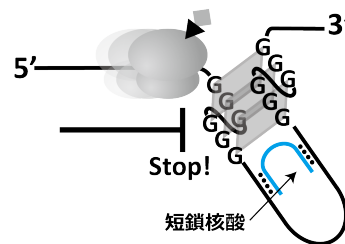


Fig.1 Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を標的 mRNA に導入することで RNA G-quadruplex (RGq) の形成を誘導する。RGq は Ribosome のアミノ酸伸長反応を阻害することから、タンパク質翻訳反応が抑制される。

まず我々は L-aTNA および 2'MOE 化学修飾を導入した Staple 核酸のヌクレアーゼ分解耐性を評価したところ、24 時間後においても分解耐性を確認した。次に L-aTNA Staple 核酸を心肥大モデルマウスに投与したところ、TRPC6 発現量低下と心肥大の抑制が認められ、優位な治療効果を確認できた。さらに mRNA-seq により mRNA 量を網羅的に解析し、心肥大関連遺伝子群の発現量低下を明らかにした。

また我々は mRNA 上に存在する G-tracts が少ない場合でも、Staple 核酸配列内に G-tracts を導入することで Staple 核酸と mRNA のハイブリッド RGq の形成を誘導する新しい形の Staple 核酸を開発している (Fig. 2)。RGq は G-tracts 間のループ塩基数により安定性が変化することが知られている。そこで本研究では Staple 核酸配列内の G-tract 間のループ塩基数を変えることで形成誘導する RGq の安定性を変化させ、標的遺伝子発現抑制量を制御する。

実際に我々は G-tract 間のループ塩基数を変えることで、形成誘導する RGq の安定性を変化させ逆転写や翻訳阻害量を制御できることを見出した。本発表においては上記内容に加え、生細胞における遺伝子発現量制御を試みたため、その結果に関しても報告する (Fig. 3)。

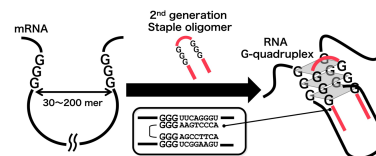


Fig. 2 第二世代型 Staple 核酸を用いた RNA  
hacking の概要図。

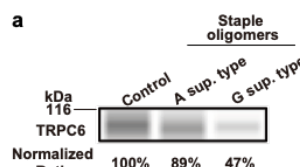


Fig. 3 第二世代 Staple 核酸投与マウスにおける TRPC6 発現抑制評価。

## シクロスポリン A の主鎖アミド *N*-メチル化様式が受動的膜透過性に与える影響の研究

○菅野紀希<sup>1</sup>・小野高広<sup>1</sup>・上田卓見<sup>2,3</sup>・竹内恒<sup>3</sup>・森本淳平<sup>1</sup>・山東信介<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 東大院工、<sup>2</sup> 阪大院薬、<sup>3</sup> 東大院薬)

**A study on how backbone *N*-methylation patterns of Cyclosporin A affect its passive membrane permeability** (Graduate School of Engineering, Univ. Tokyo<sup>1</sup>, Graduate School of Pharmaceutical, Osaka Univ.<sup>2</sup>, Graduate School of Pharmaceutical, Univ. Tokyo<sup>3</sup>) SUGANO, Motoki<sup>1</sup>; ONO, Takahiro<sup>1</sup>; UEDA, Takumi<sup>2,3</sup>; TAKEUCHI, Koh<sup>3</sup>; MORIMOTO, Jumpei<sup>1</sup>; SANDO, Shinsuke<sup>1</sup>

環状ペプチドは、タンパク質の広く浅い表面に対して選択的で高い結合親和性を実現できることから、タンパク質間相互作用を標的とした薬剤候補として期待されている。しかし、一般的に環状ペプチドは細胞膜に対する受動的透過性が低いことが課題である。このような環状ペプチドの課題を克服するために、これまでに、6-8 残基の環状ペプチドについては様々な研究が行われ、高い膜透過性を示す環状ペプチドの設計指針が確立されてきた。一方で、それより大きな環サイズ、特に分子量 1000 以上で高い膜透過性を示す環状ペプチドを設計することは未だに困難である<sup>1</sup>。天然に存在する環状ペプチドの中には、シクロスポリン A (CsA) のように、1000 以上の分子量を持つのに関わらず高い受動的膜透過性を示すものが存在する (図 1)。さらに、最近の研究では、CsA と同程度の環サイズで高い膜透過性を示す環状ペプチドが人工的に創出されるようになってきた<sup>2,3</sup>。これは、1000 以上の分子量でも高い膜透過性を示す環状ペプチドが数多く存在し得ることを示唆している。しかし、CsA が高い膜透過性を示す構造的基盤は未だ十分に理解されておらず<sup>4</sup>、CsA の構造と膜透過性の相関を調べることは、高い膜透過性を持つ環状ペプチドの設計指針を確立する上で重要であると考えられる。これまでに、我々は、CsA の側鎖構造が、高い膜透過性を示す上で必須ではないことを示してきた<sup>5</sup>。一方で、CsA の主鎖構造の受動的膜透過性における重要性については、理解が進んでいない。そこで本研究では、CsA の主鎖アミドの *N*-メチル化様式を改変した誘導体を合成し、その膜透過性および溶液中の 3 次元構造を調べることで、CsA が高い膜透過性を示す構造基盤を理解することを目指した。

まず、CsA とは主鎖アミドの *N*-メチル化様式が異なる誘導体群を設計し、合成した。合成したこれらの CsA 誘導体について、並列人工膜透過性試験 (PAMPA) と Caco-2 アッセイを用いた膜透過性の

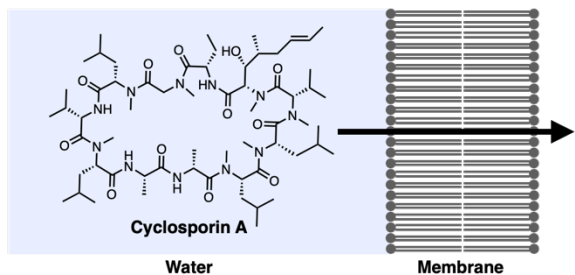


図 1 シクロスポリン A の構造式

評価を行った。この結果、CsA とは主鎖アミドの *N*-メチル化様式が異なるにも関わらず高い受動的膜透過性を示す誘導体が複数見られた。これらの誘導体が高い膜透過性を示す構造的基盤を理解するために、NMR と分子シミュレーションを用いた構造解析を行った。水中環境と膜中環境における安定構造を決定し CsA の 3 次元構造と膜透過性の相関について考察した。

1. C. R. Pye, *et al.*, J. Med. Chem., 60, 1665–1672 (2017).
2. M. Tanada, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 145, 16610–16620 (2023).
3. A. Ohta, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 145, 24035–24051 (2023).
4. K. M. Corbett, *et al.*, J. Med. Chem., 64, 13131–13151 (2021).
5. T. Ono, *et al.*, RSC. Adv., 13, 8394–8397 (2023)

## RGG 配列をベースとした環状ペプチドの構造と G4 結合性

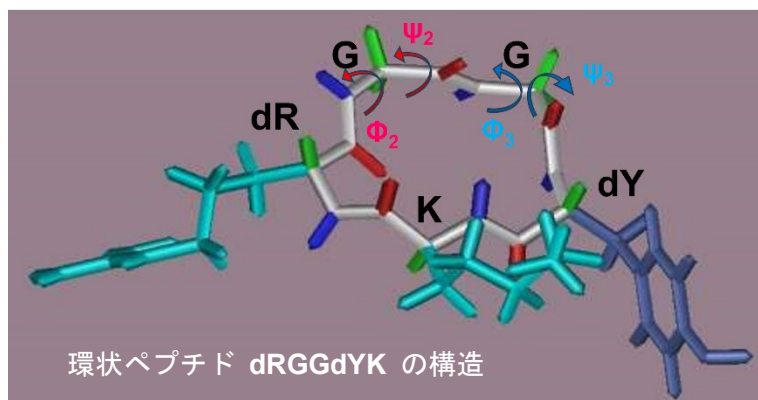
○山口朋也<sup>1</sup>・藤本和久<sup>1</sup>・長門石暁<sup>2</sup>・津本浩平<sup>2</sup>・阪本知樹<sup>3</sup>・山置佑大<sup>3</sup>・永田崇<sup>3</sup>・片平正人<sup>3</sup>・柴田奈津希<sup>4</sup>・大吉崇文<sup>4, 5, 6</sup> (<sup>1</sup>九産大生命、<sup>2</sup>東大院工・<sup>3</sup>京大エネ理工・<sup>4</sup>静大院理・<sup>5</sup>静大院創造・<sup>6</sup>静大グリーン研)

**Cyclic peptides based on RGG sequences and their structures and bindings to G4 DNA/RNA** (Faculty of Life Science, Kyushu Sangyo University<sup>1</sup>, School of Engineering, The University of Tokyo<sup>2</sup>, Institute of Advanced Energy, Kyoto University<sup>3</sup>, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University<sup>4</sup>, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University<sup>5</sup>, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University<sup>6</sup>) YAMAGUCHI, Tomoya<sup>1</sup>; FUJIMOTO, Kazuhisa<sup>1</sup>; NAGATOISHI, Akira<sup>2</sup>; TSUMOTO, Kouhei<sup>2</sup>; SAKAMOTO, Tomoki<sup>3</sup>; YAMAOKI, Yudai<sup>3</sup>; NAGATA, Takashi<sup>3</sup>; KATAHIRA, Masato<sup>3</sup>; Natsuki Shibata<sup>4</sup>; OYOSHI, Takanori<sup>4, 5, 6</sup>

グアニン四重鎖構造 (G4) 結合タンパク質の多くは結晶構造が取得されていないため、活性部位の構造が明らかになっていない。活性部位におけるモチーフの一つに RGG (アルギニン・グリシン・グリシン) 領域があり、この RGG 領域が  $\beta$  ターン構造を形成していることを示唆する CD スペクトルが報告されている。そこで五残基のアミノ酸から成る環状ペプチドは  $\beta$  ターン構造を形成しやすいという知見を基にし、我々は RGG 配列をベースとした環状ペプチドを合成し、その構造や G4 との結合を調べることにした。今回、合成した環状ペプチドの G4 との結合能、ならびに NMR で行った構造解析の結果を報告する。

今回固相合成法にて合成した環状ペプチドの配列は R・G・G・Y (F)・K の五残基から成る。過去の報告例を参考にし、一部 D 体のアミノ酸を組み込んでいる。例えば RGGYK という環状ペプチドであれば RGGYdK と dRGGdYK という二種類を用意し、前者は K が D 体、後者は R と Y が D 体である。これら二つの環状ペプチドは鏡像異性体の関係になる。環状ペプチドの構造を NMR によって解析したところ dRGGdYK における二つの G 残基の主鎖二面角は Type-II の  $\beta$  ターン構造に類似していたことから、dRGGdYK は Type-II の  $\beta$  ターン構造を形成している可能性が極めて高いことがわかった (下図)。現在、他の環状ペプチドの構造解析を行っている。

環状ペプチドと G4 との結合性評価は主に MicroScale Thermophoresis によって行った。F を含む環状ペプチドが G4 DNA、G4 RNA に強く結合することがわかった。dRGGdFK は G4 RNA に対して約 3  $\mu$ M という解離定数を示した。また鏡像体レベルでは dRGGdFK、dRGGdYK の方が RGGdFK、RGGYdK より強い結合性を示し、同じ配列から成る直鎖ペプチドはほとんど結合性を示さなかった。本ポスター発表において、環状ペプチドの構造と G4 結合性に関する詳細を報告する予定である。



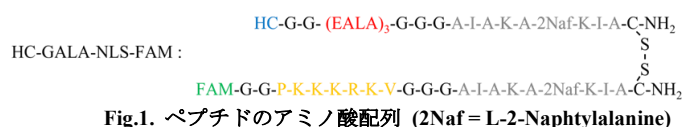


## FRET プローブで標識したペプチドヘテロダイマーの細胞内挙動の解析

○田中かれん<sup>1</sup>・山崎正幸<sup>2</sup>・富崎欣也<sup>1</sup>（龍谷大先端理工<sup>1</sup>・龍谷大農<sup>2</sup>）

**Analysis of intracellular behavior of peptide heterodimers labeled with FRET probes** (<sup>1</sup>Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University, <sup>2</sup>Faculty of Agriculture, Ryukoku University) TANAKA, Karen<sup>1</sup>; YMASAKI Masayuki<sup>2</sup>; TOMIZAKI, Kin-ya<sup>1</sup>

生体にとって異物である薬物は、体内で分解・排出されやすく、また様々な副作用を引き起こす。そこで近年では、薬物を理想的な体内動態に制御する技術であるドラッグデリバリーシステム (DDS) が注目されている。しかし、薬物がエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれる場合、エンドソームに内包されることで、薬物の分解や排出等の様々な問題が生じる。したがって、エンドソーム膜を乱すことで薬物の細胞質への放出を促進させ、効率的な薬物送達が可能になると期待される。先行研究においては、薬物キャリアペプチド (Cap-p: Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH<sub>2</sub>)<sup>[1]</sup> の N 末端に、pH 応答性膜融合ペプチドとして知られる GALA ペプチド<sup>[2]</sup> の部分配列およびカチオン性の細胞膜透過性の核移行シグナルペプチド (NLS) を有する二種類のキャリアペプチドを設計した。さらに、細胞内での薬物放出を指向し、それらをジスルフィド結合を介して二量化したヘテロダイマーキャリアペプチド (GALA-NLS) を設計・合成し、GALA-NLS がエンドソーム膜を乱し、小分子を細胞質へ放出させる能力があることが示された。本研究では、GALA-NLS を二種類の蛍光色素で標識したペプチド (HC-GALA-NLS-FAM) を合成し (Fig. 1.)、細胞内を模倣した還元環境下においてジスルフィド結合が解離することを、FRET を利用して確認した。



Cap-p をベースに、蛍光色素のカルボキシフルオレセイン (FAM) で標識した FAM-NLS-p-C 及び蛍光色素のヒドロキシクマリン (HC) で標識した HC-GALA-p-C (S-py) を固相合成法によって合成し、それらを二量化し HC-GALA-NLS-FAM を合成した (Fig. 1.)。このペプチド溶液に還元剤であるジチオトレイトール (DTT) を添加し、DTT との反応によるジスルフィド結合の解離評価を行った。またペプチド終濃度 10 μM となるようにペプチド溶液を調製し、蛍光スペクトル測定による FRET 発生の様子を観察した。

さらに、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞を用いてヘテロダイマーペプチドの解離評価を行った結果、インキュベーション時間 90 分で FRET が解消され、FAM と HC が解離したことが示唆された。(Fig. 2.) また、ペプチドとエンドソームとの局在評価を行ったところ、ペプチドとエンドソームとの共局在が示された。このことからペプチドは細胞内において色素間の距離が広がるものの、エンドソームにトラップされたままであると考えられる。

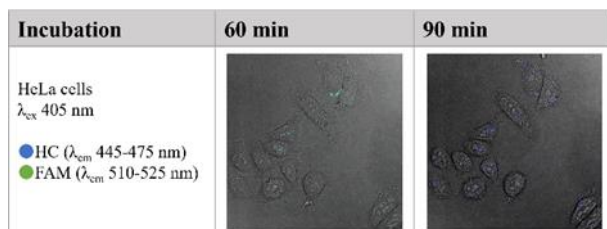


Fig.2. HeLa 細胞に HC-GALA-NLS を導入したときの CLSM 画像

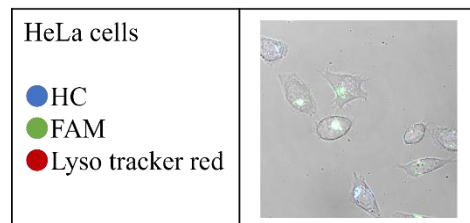


Fig.3. ペプチドとエンドソームとの局在評価

[1] Tomizaki, K.-Y. et al. *Molecules* **2017**, 22, 1916.

[2] Nanda K.Subbarao, et al. *Biochemistry* **1987**, 26, 2964-2972.

## 鉄イオン結合部位を有するペプチド三量体を架橋ユニットに用いた ハイドロゲルの開発

○阪本彩音・日高由梨・池田拓未・大洞光司・林 高史（阪大院工）

**Construction of a hydrogel containing an iron-binding trimeric peptide as a cross-linking unit** (Graduate School of Engineering, Osaka University) SAKAMOTO, Ayane; HIDAKA, Yuri; IKEDA, Takumi; OOHORA, Koji; HAYASHI, Takashi

ハイドロゲルは、化学的あるいは物理的な高分子の架橋により形成する三次元網目構造が内部に大量の水を含んだ物質であり、高い粘弾性と生体適合性などの特徴的な性質を有していることから、生体材料への応用に興味が持たれている。近年ではペプチドなどの生体分子を構成要素として導入し、これらの性質をゲルの物性に反映させた機能性ゲルを開発する試みが盛んに行われている。ペプチドは外部の刺激に応答して二次構造が柔軟に変化することが知られており、ペプチドをゲルに組み込んだゲルがユニークな物性を示すことが報告されている<sup>1</sup>。我々のグループでは、ゲルの架橋ユニットとして機能するペプチド三量体を設計・合成し、直鎖状の高分子と反応させることで、ペプチド三量体で架橋されたハイドロゲルを開発している。引張試験により、ペプチド三量体の熱安定性がゲルの粘弾性に大きく影響を与えることを確認している。この結果は、架橋点のペプチドの変性の際のエネルギーがゲルの変形時の散逸エネルギーとして利用されていることを示唆している。本研究では、ゲルに含まれるペプチド三量体の構造変化を時空間的に評価することを目的とし、鉄イオンの結合により蛍光挙動が変化するキノリン誘導体をペプチド三量体末端に修飾した(Figure 1)。この三量体を架橋点とするゲルは、力学刺激を加えた際に引き起こされる三量体ペプチドの構造変化とそれに伴う鉄イオンの解離による蛍光強度の変化を示し、局所的な応力集中を可視化できると考えた。

まず既報<sup>2</sup>を参考に、アジド基を側鎖に有するキノリン誘導体を合成した。次に、合成したキノリン誘導体を N 末端に含むペプチドの合成・三量化を行なった。更にペプチドの末端のアジド基と直鎖状高分子のアルキン部位をクリック反応により連結し、ペプチド三量体を架橋点とするハイドロゲルを得た。これまでにキノリン骨格とトリアゾール環を含むこの三量体分子は三価の鉄イオンが配位することで蛍光を示すことが知られている<sup>2</sup>。今回のハイドロゲルにおいても、鉄イオンが溶解した緩衝液に浸漬することで鉄イオンの配位によるゲルの蛍光を確認した。ゲルを引っ張った際の蛍光の変化をスペクトルカメラで撮影したところ、蛍光強度の減少が確認された。これは、応力を受けたゲルの内部でペプチド三量体構造が崩壊し、鉄イオンの脱離が起こったことを示唆している。またこのハイドロゲルにおける引張試験では、鉄を含んでいる状態は含んでいない状態に比べて、約 3 倍のヤング率を示した。これはキノリン誘導体に鉄イオンが配位し、熱力学的な安定性が上昇したためと考えられる。

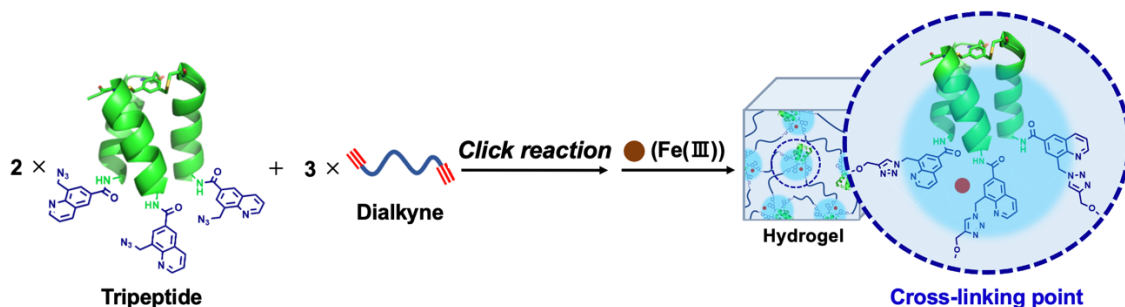


Figure 1. 鉄イオン結合部位を有する三量体ペプチドを架橋点とするハイドロゲルの調製

1. H. J. Oh, *et al.*, *Macromolecules*, 41, 8204-8209 (2008).
2. T. Yamamoto, *et al.*, *Sens. Actuators B*, 254, 52-58 (2018).

## N 末端に His タグを組み込んだコラーゲンモデルペプチドの合成と性質

○神田ららほ・富崎欣也（龍谷大先端理工）

**Synthesis and properties of collagen model peptides incorporating N-terminal His-tag** (Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University) TSUKUBA, Taro<sup>1</sup>; TSUKUBA, Hanako<sup>2</sup>

病気や外部からの強い刺激によって骨が欠損した場合の主な治療法としてインプラントや人工骨の利用がある。チタンは耐腐食性および生体適合性が高いことから、インプラントの材料として注目され、すでに実用化されている。しかし、チタン表面への初期細胞接着量が少ないことによる細菌感染のリスクが課題として挙げられる。対応策として、チタンに対しては表面の化学エッチングや高分子・骨形成タンパク質などによる表面修飾により、初期細胞接着量を増大させるなど種々取り組まれているが、完全な問題解決には至っていない。例えば天然コラーゲンを用いる場合、陸生生物由来の人獣共通感染症のリスクや水生生物由来の変性温度の低さといった課題がある。そこで、それらを改善するために感染症のリスクが少なく変性温度にすぐれ機能制御が容易な化学合成されたコラーゲンモデルペプチド (CMP) の利用が効果的と考える。本研究では、細胞表面のインテグリンと特異的に結合する細胞接着配列であるグリシン、フェニルアラニン、ヒドロキシプロリン、グリシン、グルタミン酸、アルギニン (GFOGER) [1]および銅イオンと CMP の錯形成による抗菌効果の付与を期待し His タグ[2]の二種の配列を典型的なコラーゲン配列に組み込んだ CMP-9 を設計・合成し、銅イオン存在下における二次構造評価により His タグの性質を調査した (Fig.1)。

CMP-9 : Ac-His-His-His-Ape(5)-(Gly-Pro-Hyp)<sub>4</sub>-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Gly-Pro-Hyp)<sub>4</sub>-Gly-NH<sub>2</sub>  
 Ape(5) = 5-aminopentanoic acid    O = hydroxyproline

Fig. 1. CMP-9 のアミノ酸配列

まず、液相法と固相法を組み合わせた化学合成法により CMP を合成し、逆相 HPLC により精製、MALDI-TOF-MS で同定した。次に精製ペプチドをリン酸ナトリウム水溶液中 100 μM の濃度で 4 °C、24 h 自己集合化を行い、銅イオンを加えて [CMP] = 100 μM、[Cu<sup>2+</sup>] = 0、33 および 66 μM の条件で CD スペクトルによる二次構造評価を行った。

CMP-9 のみ溶解した水溶液の CD スペクトル測定の結果から、4 °C ではトリプルヘリックス構造を形成し、80 °C ではランダム構造へと転移することが分かった (Fig.2)。また、再度冷却するとトリプルヘリックス構造へと可逆的に構造転移した。これらから、熱変性温度を 52 °C と決定した (Fig.3)。また、銅イオン添加により、若干トリプルヘリックス構造が不安定化した (Fig.3)。また、ランダム構造からトリプルヘリックスへの巻き戻り速度が若干速くなった (Fig.3)。これらは、銅イオンとの錯形成によって His が内側を向くことでトリプルヘリックスの N 末端構造が緩むの、トリプルヘリックスへの緩和が促進されたためと考えられる (Fig.3)。さらに、XPS により CMP-9 のチタン表面修飾を確認した。今後は銅錯体形成におけるトリプルヘリックスのマルチマーの評価および抗菌活性を行う予定である。

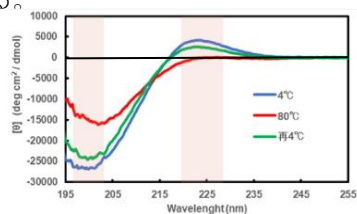


Fig 2. CMP-9 の二次構造

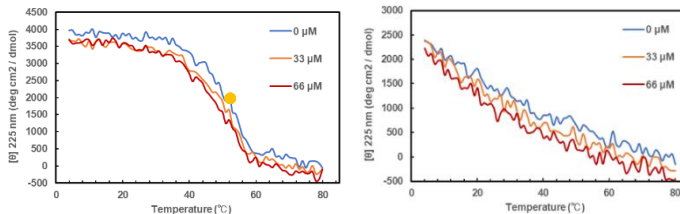


Fig 3. CMP-9 の熱変性温度

[1] Khew S. T. and Tong Y. W. *Biomacromolecules* **2007**, 8, 3153-3161

[2] Watly J and Simonovsky E and Wieczorek R and Barbosa N and Miller Y and Kozlowski H *Inorganic Chemistry* **2014**, 7, 6675-6683

## 触媒三残基を擁する環状ペプチド型人工加水分解酵素の開発

○秋山脩斗・笠原彰友・山次健三（千葉大院薬）

**Development of artificial hydrolases with cyclic peptide structure containing catalytic triad** (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba Univ.) AKIYAMA, Shuto; KASAHARA, Akitomo; YAMATSUGU, Kenzo

生体における種々の化学反応は触媒作用を有するタンパク質である酵素によって実現している。なかでもプロテアーゼやエステラーゼなどの加水分解酵素は、水中・中性・37度の生体内条件においてアミド結合やエステル結合を容易に加水分解可能であり、有機合成化学的にも魅力的な触媒活性を有している。加水分解酵素の触媒作用は、活性中心に存在する触媒三残基(酸性アミノ酸-塩基性アミノ酸-求核性アミノ酸)間の相互作用によってもたらされる。これまでに酵素活性中心を模倣した種々のペプチド性触媒がデザインされてきたが、活性には改善の余地があり、柔軟な三次元構造をもつペプチドによって、高度に構造規定された酵素内で生じる触媒三残基間の相互作用をいかに実現するかが大きな課題となっている。

そこで本研究では、環状ペプチド構造によって三次元構造を制御した環状ペプチド型の人工加水分解酵素の開発を目指した。構成アミノ酸として、触媒三残基のほかに、構造の規定されたターン構造を誘起するプロリンやグリシンをもつ種々の配列の環状ペプチドをデザインし、*p*-NPAcの加水分解反応によってそれらの触媒活性を評価した(図1)。その結果、触媒三残基の酸性アミノ酸としてグルタミン酸を利用し、求核性アミノ酸としてシステインを利用することで高いエステル加水分解活性を実現した。さらに、触媒三残基の間隔や順序の異なる配列では、触媒活性が大きく変化することが明らかになった。以上の結果より、触媒三残基を単に近接させるだけではなく、それらの三次元的位置関係を緻密に制御することが触媒活性の向上に重要であることが示唆された。

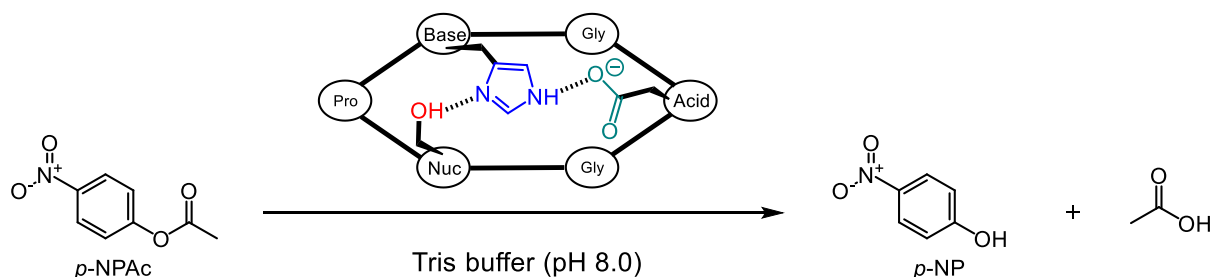


図1 人工加水分解酵素による *p*-NPAc の加水分解反応



## アゾベンゼン導入環状 Tau 由来ペプチドによる微小管構造制御

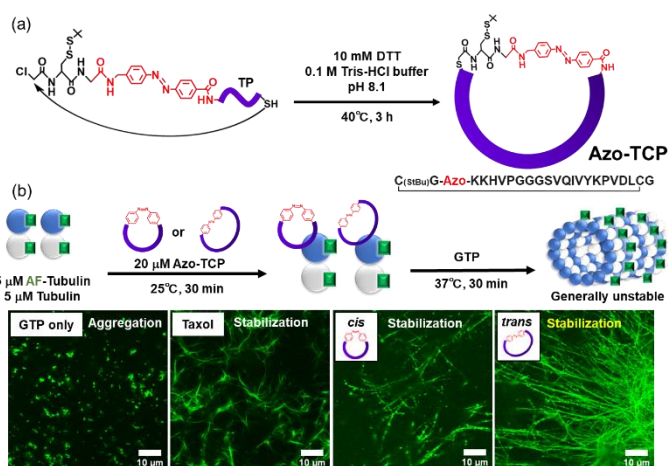
○立石万保子<sup>1</sup>・稲葉央<sup>1</sup>・角五彰<sup>2</sup>・松浦和則<sup>1</sup> (<sup>1</sup>鳥取大院工、<sup>2</sup>京大院理)

**Control of microtubule structures by azobenzene-incorporated cyclic Tau-derived peptides** (Graduate School of Engineering, Tottori University<sup>1</sup>, Graduate School of Science, Kyoto University<sup>2</sup>) TATEISHI, Mahoko<sup>1</sup>; INABA, Hiroshi<sup>1</sup>; KAKUGO, Akira<sup>2</sup>; MATSUURA, Kazunori<sup>1</sup>

微小管は細胞骨格の一つであり様々な細胞機能に参与している。抗がん剤の一種である Taxol は、微小管内部の疎水性ポケットに結合することで微小管を安定化し、がん細胞の分裂を抑制するが、副作用が大きいという課題がある。これまでに、UV 光・可視光照射により可逆的に光異性化するアゾベンゼン(Azo)を Taxol に導入することで、微小管構造の光制御が報告されている<sup>1)</sup>。このように、光刺激による微小管の構造や安定性の制御が注目されている。当研究室では、微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド TP を開発している<sup>2)</sup>。これまでに、TP の側鎖に光異性化分子であるスピロピランを修飾することで、可逆的な微小管安定性の光制御に成功している<sup>3)</sup>。また、TP を環化することで微小管により強く結合し、微小管を安定化することが明らかとなっている<sup>4)</sup>。そこで、Azo を主鎖に有する環状 TP を開発することで、*cis* 体と *trans* 体の環状ペプチド構造が大きく変化し、光刺激による微小管の大きな構造変化を誘起できると考えた。

本研究では、アゾベンゼン導入環状 TP (Azo-TCP)を合成し、光刺激による微小管構造制御を目指した。主鎖に Azo を有し、N 末端にクロロアセチル基を縮合反応により導入したペプチド (C(StBu)G-Azo-KKHVPGGGSVQIVYKPVLDLCG)を Fmoc 固相法により合成した(Fig. 1a)。N 末端のクロロアセチル基と C 末端側の Cys の SH 基との分子内環化反応により Azo-TCP を合成し、逆相 HPLC で精製後、MALDI-TOF-MS で同定した。UV 光、可視光照射によるこれらペプチドの *cis* 体または *trans* 体への異性化を UV-vis 測定により確認した。赤色蛍光色素 tetramethylrhodamine (TMR)を修飾した TMR-TP との競合実験により、Azo-TCP の *cis* 体および *trans* 体が TMR-TP よりも強く微小管内部に結合することが明らかとなった。一般的に不安定な微小管を形成する GTP を用いて微小管の安定性評価を行ったところ、共焦点レーザー走査型顕微鏡(CLSM)観察により Azo-TCP の *cis* 体および *trans* 体が微小管構造を安定化させることが明らかとなった(Fig. 1b)。特に、*cis* 体よりも *trans* 体を用いた際により長く安定な微小管を形成することが見出された。現在、より詳細な結合解析を行うとともに、微小管構造の光制御を試みている。

1) A. Müller-Deku, J. C. M. Meiring, K. Loy, Y. Kraus, C. Heise, R. Bingham, K. I. Jansen, X. Qu, F. Bartolini, L. C. Kapitein, A. Akhmanova, J. Ahlfeld, D. Trauner, O. Thorn-Seshold, *Nat. Commun.*, **11**, 4640 (2020). 2) H. Inaba, T. Yamamoto, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Chem. Eur. J.*, **24**, 14958 (2018). 3) H. Inaba, M. Sakaguchi, S. Watari, S. Ogawa, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *ChemBioChem*, **24**, e202200782 (2023). 4) H. Inaba, M. Nagata, K. J. Miyake, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Polym. J.*, **52**, 1143 (2020).



**Fig. 1.** (a) Synthesis of azobenzene-incorporated tau-derived cyclic peptide (Azo-TCP). (b) Construction of Azo-TCP-incorporated microtubules and the CLSM images.



## Tau 由来ペプチド二量体による微小管安定化

○早川優衣<sup>1</sup>・稲葉央<sup>1</sup>・角五彰<sup>2</sup>・松浦和則<sup>1</sup> (<sup>1</sup>鳥取大院工、<sup>2</sup>京大院理)

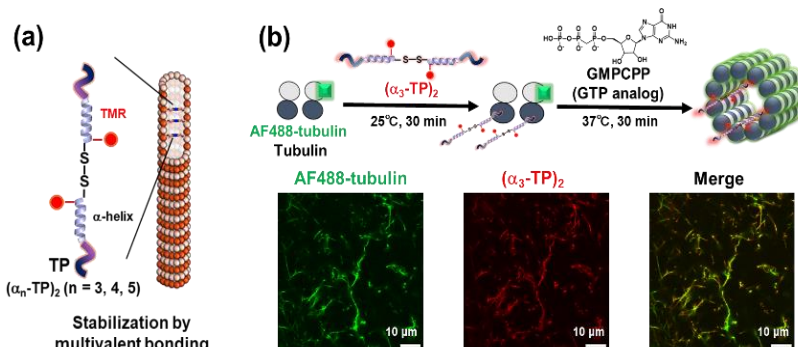
**Stabilization of microtubule by Tau-derived peptide dimers** (Graduate School of Engineering, Tottori University<sup>1</sup>, Graduate School of Science, Kyoto University<sup>2</sup>) HAYAKAWA, Yui<sup>1</sup>; INABA, Hiroshi<sup>1</sup>; KAKUGO, Akira<sup>2</sup>; MATSUURA, Kazunori<sup>1</sup>

細胞骨格の一つである微小管はチューブリンタンパク質からなる中空の構造体であり、様々な細胞機能に重要な役割を果たしている。近年、微小管内部に結合するタンパク質が多数発見され、微小管機能を調節していると考えられている。その一つである Rib43a-S は微小管内部ポケットに結合するドメインと  $\alpha$ -helix ドメインからなり、微小管

内部に裏打ちする形で結合して微小管を安定化すると推定されている<sup>[1]</sup>。当研究室では、微小管内部に結合する Tau 由来ペプチド TP (CGGGKKHVPGGGSVQIVYKPVDL)を開発している<sup>[2]</sup>。TP 自体はチューブリンへの結合がそれほど強くなく、微小管の安定化能は弱いことが明らかとなっている。これまでに、TP を四量体緑色蛍光タンパク質 Azami-Green に融合することで、微小管内部への多点結合により微小管を極めて安定化することに成功している<sup>[3]</sup>。そこで本研究では、異なる長さの  $\alpha$ -helix 形成ペプチドを介した TP の二量体を開発し、微小管内部での二つの TP の多点結合と  $\alpha$ -helix による裏打ちを利用した微小管構造の安定化を目指した(Fig. 1a)。

$\alpha$ -helix を形成することが知られているペプチド EAAAK の  $n$  回繰り返し配列を TP に連結し、N末端にシステインを有するペプチド (C(EAAAK) <sub>$n$</sub> GGGKKHVPGGGSVQIVYKPVDL) ( $n = 3, 4, 5$ )を Fmoc 固相合成法により合成し、樹脂上で N 末端に赤色蛍光色素 tetramethylrhodamine (TMR)を縮合反応により導入した。得られたペプチドのシステイン間のジスルフィド結合形成により二量体 ( $\alpha_n$ -TP)<sub>2</sub> ( $n = 3, 4, 5$ )を合成し、逆相 HPLC により精製後、MALDI-TOF-MS で同定した。比較として N 末端にシステインを持たない単量体ペプチド  $\alpha_n$ -TP ( $n = 3, 4, 5$ )を同様に合成した。これらのペプチドを緑色蛍光色素 AF488 修飾チューブリンと ( $\alpha_n$ -TP)<sub>2</sub> に複合化し、GTP アナログである GMPCPP を加えることにより微小管を構築したところ、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)により ( $\alpha_n$ -TP)<sub>2</sub> の微小管への結合が確認された(Fig. 1b)。蛍光強度解析により、( $\alpha_n$ -TP)<sub>2</sub> が  $\alpha_n$ -TP よりも微小管への結合量が多く、また  $\alpha$ -helix 配列の長さが結合量に影響を与えることが明らかとなった。TP と同じ微小管内部に結合する Taxol を用いた競合阻害実験により、( $\alpha_n$ -TP)<sub>2</sub> が微小管内部に結合していることが示された。一般的に不安定な GTP 結合型微小管の安定性評価により、( $\alpha_n$ -TP)<sub>2</sub> が  $\alpha_n$ -TP に比べ微小管を安定化することが明らかとなった。また、微小管形成に伴う濁度上昇の評価を行ったところ、( $\alpha_n$ -TP)<sub>2</sub> が微小管形成を促進し、 $\alpha$ -helix 配列の長さがその効果に影響を与えることが示唆された。以上より、 $\alpha$ -helix を介した TP 二量体を開発することで微小管構造の安定化に成功した。

[1] M. Ichikawa, A. A. Z. Khalifa, S. Kubo, D. Dai, K. Basu, M. A. F. Maghrebi, J. Vargas, K. H. Bui, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 19930 (2019). [2] H. Inaba, T. Yamamoto, A. M. R. Kabir, A. Kakugo, K. Sada, K. Matsuura, *Chem. Eur. J.*, **24**, 14958 (2018). [3] H. Inaba<sup>1</sup>, Y. Sueki<sup>1</sup>, M. Ichikawa<sup>1</sup>, A. M. R. Kabir, T. Iwasaki, H. Shigematsu, A. Kakugo, K. Sada, T. Tsukazaki, K. Matsuura, *Sci. Adv.*, **8**, eabq3817 (2022) (<sup>1</sup>Equal contribution).



**Fig. 1.** (a) Design of ( $\alpha_n$ -TP)<sub>2</sub> binding to the inside of microtubules. (b) Incorporation of ( $\alpha_n$ -TP)<sub>2</sub> to microtubules and the CLSM images.

## 浮揚液滴を活用した SARS-CoV-2 外殻タンパク質結合性ペプチドのセレクション

○川井麻那歌・鈴木寧々・佐藤智典・松原輝彦（慶大理工）

**Selection of SARS-CoV-2 spike protein-binding peptides in a levitated droplets** (Faculty of Science and Technology, Keio University) KAWAI, Manaka; SUZUKI, Nene; SATO, Toshinori; MATSUBARA, Teruhiko

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) は COVID-19 を引き起こすウイルスであり、現在も変異株による流行が続いている。SARS-CoV-2 の外殻タンパク質はスパイク (S) タンパク質と呼ばれ、宿主細胞表面のアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) と結合し、感染に関与することから、感染阻害剤やウイルス検出の標的分子として注目されている。本研究は、ファージ提示法を利用して S タンパク質に結合するペプチドを獲得することを目的とする。しかし、ファージ粒子の非特異的な吸着により選択効率が低下することが知られていることから、この課題の解決手段として、浮揚ファージ提示法を利用することで、既存の方法と比べて効率良く S タンパク質結合性ペプチドを獲得することを目指した (Fig. 1)。

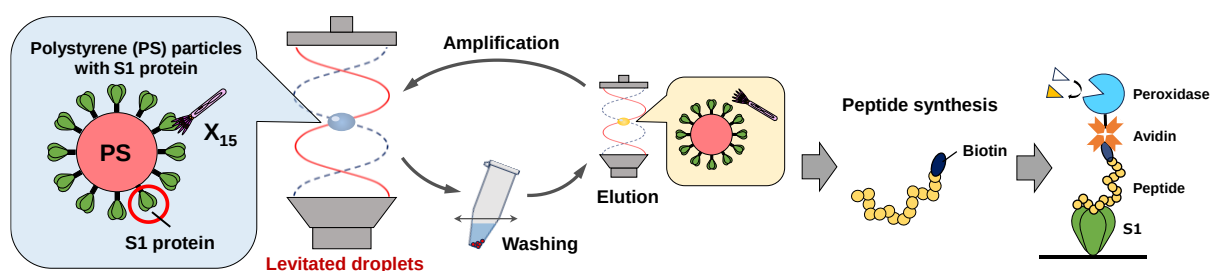


Fig. 1 本実験の概要。音響浮揚させた液滴を用いたセレクションの後、ペプチドを合成し、S1 結合活性を行う。

15 残基のランダムなアミノ酸配列を提示するファージライブラリーを S1 タンパク質と相互作用させ、従来法と浮揚法を含む 3 種類の条件でセレクションを行った。S1 に結合したファージの溶出には、酸性バッファーとヘパラン硫酸を利用した。セレクションの結果、ファージの回収率が浮揚法で従来法よりも向上し、S1 結合性ファージの濃縮が進行していることを確認した。

次に、濃縮が確認されたラウンドのファージをクローニングし、166 個のクローンが提示しているペプチドの配列解析および結合活性を評価した。配列解析から、計 12 種類の配列への濃縮が確認され、配列 AC4 が浮揚法の酸溶出で高頻度に出現していた。また、ファージ ELISA の結果から、全てのクローンで S1 結合性が示唆された。

最後に、獲得した配列のうち、特に高い S1 結合性を示した 6 種類のペプチド配列を化学合成し、S1 との結合活性を avidin-biotin peroxidase complex 法 (ABC 法) により評価した。その結果、先行研究で得られていた S1 結合性ペプチドよりも結合量の多いペプチドを複数確認した。特に、AC4 は解離定数  $K_d = 21.5 \mu\text{M}$  で S1 へ結合した。本研究で獲得したペプチドは S1 への結合活性を有するだけでなく、SARS-CoV-2 感染阻害剤として応用できる可能性が期待される。

## 除去可能ステープリングによるペプチドの構造・機能制御

○土岐優介<sup>1</sup>・小澤英知<sup>1</sup>・林剛介<sup>1</sup>・村上裕<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>名大院工、<sup>2</sup>名大ナノライフ研)

**Regulation of peptide structure and functions by removable peptide stapling** (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.<sup>1</sup>, Inst. Nano-Life-Systems, Nagoya Univ.<sup>2</sup>) TOKI, Yusuke<sup>1</sup>; OZAWA Eichi<sup>1</sup>, HAYASHI Gosuke<sup>1</sup>, MURAKAMI Hiroshi<sup>1,2</sup>

ペプチドステープリングはペプチド分子内で化学架橋を導入することで、その2次構造を安定化、または不安定化させる手法である。2次構造が安定化されたペプチドは、標的タンパク質に対する結合親和性やプロテアーゼ耐性の向上といった機能増強が見られることから、特定のタンパク質-タンパク質間相互作用を阻害する次世代医薬品として注目されている。しかし、これまでに報告された共有結合性ステープリング反応のほとんどは不可逆であるため、ステープリングしたペプチドの構造・機能をさらに制御することは困難であった。ステープリング反応の後、ステープリング部位を除去して天然ペプチド配列に戻すことができれば、構造・機能制御の幅が広がるが、このような方法論はいまだに数例しか存在しない。アンカー部位のアミノ酸として、20種類のアミノ酸の中では出現率が低いシステインおよびメチオニン残基を利用した過去の報告では<sup>1,2,3</sup>、ステープリング部位の除去に生理学的条件下で直交性を持たないチオールを使用する必要がある。またリシン残基を利用した例では<sup>4</sup>、ステープリング部位の除去が酸化条件であることから、利用可能なペプチド配列は限られている。

本発表では、新たな除去可能ステープリング法として、閉環メタセシス反応を用いたステープリング反応と有機金属錯体を用いたステープリング部位の除去反応について報告する。アンカー部位としてリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸を導入した複数のステーブルペプチドを合成し、ステープリング反応及びステープリング部位の除去反応の検討を行った。またステープリング部位の除去前後におけるペプチドの $\alpha$ -ヘリシティ、標的タンパク質に対する結合親和性、プロテアーゼに対する分解耐性を評価した。



1. C. M. Grison, *et al.*, *J. A., Chem. Sci.*, 8, 5166-5171 (2017)
2. C. Wan, *et al.*, *J. Am. Chem Soc.*, 146, 4, 2624-2633 (2024)
3. X. Shi, *et al.*, *Chem. Sci.*, 9, 3227-3232 (2018)
4. Z. Zeng, *et al.*, *J. Am. Chem Soc.*, 144, 51, 23614-23621 (2022)

## 植物を光酸化ストレスから保護する葉緑体標的型抗酸化ペプチドの設計

○宮本昂明<sup>1</sup>・沼田圭司<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>理研バイオ高分子、<sup>2</sup>京大院工、<sup>3</sup>慶応大先端生命)

**Chloroplast-Targeting Antioxidant Peptides for Shielding Plants from Photooxidative Stress**  
(Biomacromolecules Res. Team, RIKEN<sup>1</sup>, Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.<sup>2</sup>, Inst. Adv. Biosci., Keio Univ.<sup>3</sup>)  
MIYAMOTO, Takaaki<sup>1</sup>; NUMATA, Keiji<sup>1,2,3</sup>

植物の生育に不可欠な光合成では、光エネルギーが利用される。一方、強光下で植物に過剰な光エネルギーが供給されると、葉緑体内で過剰に生成した活性酸素種 (ROS) が光化学系を不活性化することで、光合成機能が低下する。この現象は光阻害として知られ、作物の生育阻害の原因となる。昨今、遺伝子組換えによって光阻害から植物を保護する試みがなされてきたが、依然として遺伝子組換えが困難な植物種・品種は数多く存在する。さらに、ストレス耐性の向上を狙った組換え植物において、しばしば生育阻害が生じることから、遺伝子組換えを利用することなく植物を光阻害から保護する光防護技術が切望されている。本研究で我々は、非組換え型の光防護技術を実現するべく、植物の葉緑体に移行して ROS を消去する抗酸化ペプチドの開発を試みた (図 1)。

具体的には、植物に有効な細胞膜透過ペプチド (CPP) の中から ROS 消去能が高いものを選び、選抜した抗酸化 CPP を葉緑体移行ペプチドと融合することでキメラ型ペプチド (Chl-KAibA-EED4, MASSMLSSATMVGK-CKXAKXAKXA-GWWG-NH<sub>2</sub>, X=Aib ( $\alpha$ -アミノイソ酪酸)) を設計・合成した。Chl-KAibA-EED4 は高反応性の ROS であるヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) と一重項酸素 ( $^1\text{O}_2$ ) に対する高い消去能を示した。タンデム質量分析およびアミノ酸分析から、ペプチドに含まれる Trp 側鎖の酸化が  $\cdot\text{OH}$ 、Cys と Met 側鎖の酸化が  $^1\text{O}_2$  に対する抗酸化活性にそれぞれ寄与することが明らかになった (図 1)。Chl-KAibA-EED4 を植物の葉に処理すると、葉緑体内で  $\cdot\text{OH}$  と  $^1\text{O}_2$  の生成量が減少するとともに、強光条件下で誘起される葉緑体内の色素 (クロロフィル) 分解が有意に抑制された。また、Chl-KAibA-EED4 を処理した植物の葉では、未処理のコントロールと比較して、強光下での光合成活性が有意に高く、光阻害が緩和されていることが示された。以上から、Chl-KAibA-EED4 が遺伝子組換えに頼らない植物の光防護に応用可能であることが示された。

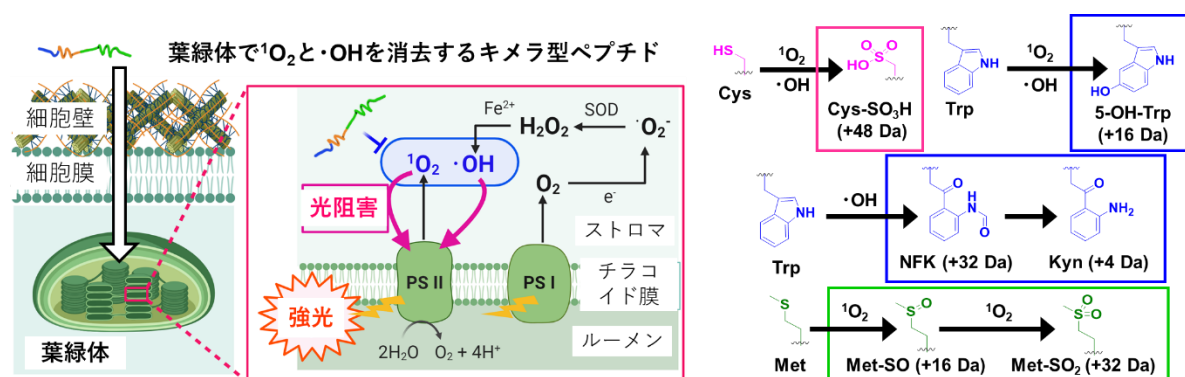


図 1 葉緑体で ROS を消去するキメラ型ペプチドを利用した植物の光防護と  $\cdot\text{OH}$  と  $^1\text{O}_2$  の消去に寄与するアミノ酸残基と側鎖の酸化。PSI: 光化学系 I。PSII: 光化学系 II。SOD: スーパーオキシドジスムターゼ。Cys-SO<sub>3</sub>H: システイン酸。5-OH-Trp: 5-ヒドロキシトリプトファン。NFK: N-ホルミルキヌレニン。Kyn: キヌレニン。Met-SO: メチオニンスルホキシド。Met-SO<sub>2</sub>: メチオニンスルホン。

## ポリフェノール化合物 Clovamide のアミロイドポリペプチド凝集制御および神経細胞保護効果

○繁森英幸<sup>1,2</sup>・角田達彦<sup>3</sup>・野本悌吾<sup>3</sup>・藤井七彩<sup>3</sup>・池本光志<sup>4</sup>・宮前友策<sup>1</sup>

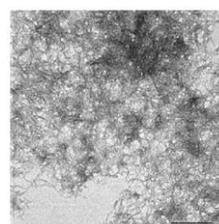
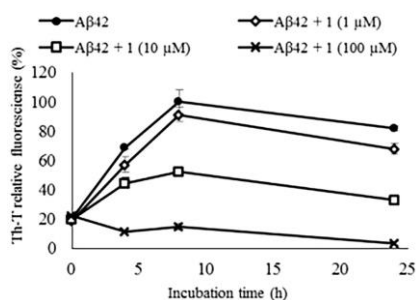
(<sup>1</sup>筑波大生命環境系、<sup>2</sup>筑波大 MiCS、<sup>3</sup>筑波大院理工情報生命、<sup>4</sup>筑波大体育系)

**Amyloid polypeptide aggregation-regulating activity and neuronal protection of the polyphenolic compound Clovamide** (Inst. of Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba<sup>1</sup>, MiCS, Univ. of Tsukuba<sup>2</sup>, Grad. Sch. Sci. Technol., Univ. of Tsukuba<sup>3</sup>, Inst. of Health Sport Sci., Univ. of Tsukuba<sup>4</sup>) SHIGEMORI, Hideyuki<sup>1,2</sup>, TSUNODA, Tatsuhiko<sup>3</sup>; NOMOTO, Daigo<sup>3</sup>; FUJII, Nanao<sup>3</sup>; IKEMOTO, Mitsushi J.<sup>4</sup>; MIYAMAE, Yusaku<sup>1</sup>

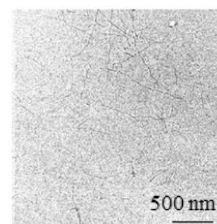
アルツハイマー型認知症 (AD) は世界的に最も多い神経変性疾患であり、最近、アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) を除去する抗体医薬が認可された。しかしながら、AD 発症の 20 年以上前から  $A\beta$  が蓄積されていることも報告されている。一方で、2 型糖尿病 (T2D) に関わるヒト膵島アミロイドポリペプチド (hIAPP) は、 $A\beta$  と cross-seeding することで AD 発症に関与することが知られている。したがって、これらのアミロイドポリペプチド凝集を阻害する化合物は AD および T2D の予防に有望であると考えられる。当研究室ではこれまでに、カテコール構造を有するポリフェノール化合物に両アミロイドポリペプチド凝集阻害活性を見出している。そこで本研究ではカカオ豆由来ポリフェノール化合物 Clovamide に着目し、その関連化合物を用いて構造活性相関を行うとともに神経細胞保護効果を調べることを目的とした。

まず、フェノール性水酸基の数が異なる 15 種の Clovamide 関連化合物を合成した。次に、 $A\beta_{42}$  および hIAPP 凝集阻害・脱凝集活性について、Thioflavin T (Th-T) assay と透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた凝集形態の観察により評価した。その結果、カテコール構造を 2 つ有する化合物に顕著な  $A\beta_{42}$  および hIAPP 凝集阻害・脱凝集活性が認められたが、カテコール構造を持たない化合物にはほとんど活性が見られなかった。また TEM 観察においても、Th-T assay と同様に  $A\beta_{42}$  および hIAPP 凝集阻害・脱凝集活性が確認された。この結果、少なくとも 1 つのカテコール構造の存在が  $A\beta_{42}$  および hIAPP 凝集阻害・脱凝集活性に不可欠であり、カテコール構造の数に比例して活性が強くなることが示唆された。さらに、神経芽腫細胞 SH-SY5Y を用いた Clovamide 関連化合物の神経細胞保護効果を調べた結果、カテコール構造が多いほど  $H_2O_2$  や  $A\beta_{42}$  毒性に対する神経細胞保護効果が認められた<sup>1,2</sup>。

本研究により Clovamide 関連化合物に顕著なアミロイドポリペプチド凝集阻害・脱凝集活性を有することを見出した。また Clovamide 関連化合物に神経細胞保護効果も認められた。Clovamide はカカオ豆等の食素材に含まれることから、AD および T2D の予防を目的とした機能性食品開発への応用が期待される。また、本研究の構造活性相関解析により得られた知見は、今後アミロイドポリペプチド関連病理の基礎研究の一助となると考えられる。



Aβ42 のみ



Aβ42 + Clovamide

図 1. Clovamide の  $A\beta_{42}$  凝集阻害活性 (左: Th-T アッセイ、右: TEM 観察)

1. T. Tsunoda, et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 26, 3202-3209 (2018), 2. D. Nomoto, et al., *J. Nat. Med.*, 75, 299-307 (2021)



## 架橋位置をスイッチング可能な新規 DNA 光クロスリンク法の開発

○武貞龍、小田井柊也、莫竣凌、藤本健造（北陸先端科学技術大学院大、バイオ機能医工学研究領域）

### Development of a novel DNA photo-crosslinking method capable of switching the crosslink position

(Biofunctional Medical Engineering Research Area, Japan Advanced Institute of Science and Technology)

TAKESADA, Ryu; ODAI, Yuya; MO, Junling; FUJIMOTO, Kenzo

遺伝子編集技術の進展に伴い、より精密かつ効率的な DNA 操作技術が求められている。近年、光を利用した DNA 操作は、その特異性と時空間的な制御能力から注目されている。そういうこともあり、我々はこれまで光応答性人工核酸を用いた核酸類光操作法について報告している。この操作法は鋳型となる配列に依存して鋳型上で光を用いて核酸同士を繋げる「光ライゲーション法」と、鋳型に対して直接架橋する「光クロスリンク法」<sup>1</sup>の2つに大別される。最近、後者の光クロスリンク法に関して、チミンにのみ選択的な光架橋を示す 4-methylpyranocarbazole nucleoside (<sup>MEP</sup>K)の開発に成功し、その結果について当研究室より報告しており、<sup>MEP</sup>K が光毒性の弱い可視光の 400 nm で光架橋していることを明らかにしている<sup>2</sup>。一方、光毒性の弱い可視光で DNA 同士を繋げる光ライゲーションについては報告例がほとんどなかった。今回、<sup>MEP</sup>K のチミン選択的光クロスリンクに注目し、鋳型上に架橋しないシトシンを配置するなどして光ライゲーションに関する周辺配列の探索および反応解析をおこなったところ、シトシンへの光ライゲーションが可能であることを見出した。このことは結果的に架橋位置をスイッチング可能であることを示している。そこで本発表においてライゲーションとクロスリンクを可視光で制御可能な新規 DNA 光反応を開発したので報告する。今後、今回開発した配列情報に従い大きく反応をスイッチング可能な <sup>MEP</sup>K を含む核酸プローブを用いることにより、生細胞内の核酸情報を正しく光で読み取ることが可能となるため、細胞内核酸解析や細胞内核酸操作への発展が期待される。

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

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

# ペプチド超分子の水素結合ユニットの改変による細胞内取り込みの効率化

○藤原裕大<sup>1</sup>・若林里衣<sup>1</sup>・神谷典穂<sup>1</sup>・後藤雅宏<sup>1</sup> (<sup>1</sup> 九大院工)

## Modification of hydrogen bond unit of peptide supramolecules for highly efficient intracellular uptake

FUJIWARA, Yudai<sup>1</sup>; WAKABAYASHI, Rie<sup>1</sup>; KAMIYA, Noriho<sup>1</sup>; GOTO, Masahiro<sup>1</sup>

(Graduate School of Engineering, Kyushu University<sup>1</sup>)

**【緒言】** 細胞内をターゲットとする薬物送達において、大きな障壁の一つが細胞内取り込み過程である。これまでに、この過程を高効率化すべく薬物送達キャリアの物性に着目した研究が行われ、金属ナノ粒子のサイズや形状が取り込み効率に影響することが報告されている<sup>1,2)</sup>。近年、生体に類似した構造的特徴を有し、非共有結合由来の柔軟で動的な性質 (= ダイナミクス) を示す超分子キャリアが注目されている。しかしながら、超分子特有の非共有結合に由来するダイナミクスが細胞内取り込みに与える影響は未解明である。そこで本研究では、超分子キャリアとして両親媒性ペプチド (PA) からなる集合体に着目し、PA 集合体コア部の水素結合ユニットを変化させることでダイナミクスの制御および細胞内取り込みに与える影響の解明を目指した。これらの水素結合ユニットの異なる PA 集合体を用いて、ダイナミクスの評価および細胞内取り込み評価を行ったので報告する (Fig. 1)。



Fig. 1 本研究の概念図

**【実験方法】** 炭素数 12, 14, 16, 18 のアルキル基を持つ PA に 3 種類の水素結合ユニットとしてアミド結合を一つあるいは二つ、ウレア結合一つを導入した CnA、CnAA、CnU (n = 12, 14, 16, 18) を合成した。また、各 PA において Fluorescein を修飾した PA を合成した。これらの蛍光修飾 PA を 2 mol% 含む PA 集合体を用いて、光退色後蛍光回復法 (FRAP) によりダイナミクスの評価を行った。さらに、HeLa 細胞に作用させた際の細胞内取り込みの評価を行った。

**【結果および考察】** FRAP において、蛍光回復の速さからダイナミクスの評価を行った。その結果、C16U < C16A < C16AA の順にダイナミクスが増大することが確認された (Fig. 2a)。次に、HeLa 細胞に作用させ、細胞内取り込み評価を行った。その結果、ダイナミクスが抑制されるほど、つまり C16AA < C16A < C16U の順に細胞内移行量が増大することが確認された (Fig. 2b)。これらの結果より、水素結合ユニットの改変が PA 集合体の運動性および細胞内取り込みを変化させることが示唆された。

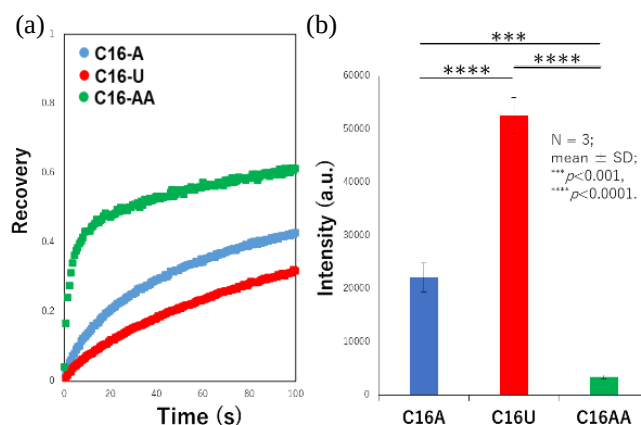


Fig. 2 a) FRAP によるダイナミクスの評価  
b) 細胞内取り込みの定量評価

### 【参考文献】

- 1) B. D. Chithrani *et al.*, *Nano Lett.*, **6**, 662 (2006)
- 2) X. Xie *et al.*, *Sci. Rep.*, **7**, 3827 (2017)

## ペプチド内包巨大リポソームを用いたリン酸カルシウム生成の 顕微鏡観察

○松本翔太・越山友美（立命館大院生命科）

**Microscopic observation of calcium phosphate formation using peptide-encapsulated giant liposomes**  
(Graduate School of Life Sciences, Ritsumeikan University) MATSUMOTO, Shota; KOSHIYAMA, Tomomi

バイオミネラルとは生物が作り出す鉱物であり、骨のリン酸カルシウムや貝殻の炭酸カルシウムなどがよく知られている。骨形成では、骨芽細胞から分泌される脂質二分子膜と蛋白質からなる基質小胞内で、リン酸カルシウムの一種であるヒドロキシアパタイト結晶核が生成され则认为られている。一般的な溶液反応では、リン酸カルシウムの結晶組成は、生成プロセスの  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと  $\text{PO}_4^{3-}$  イオンの濃度や pH など、溶液中の化学種によって制御される。例えば、ヒドロキシアパタイトは pH8.0 以上で形成しやすい。しかし、生体内の pH は 7.0-7.4 の中性付近にも関わらず、骨形成では選択的にヒドロキシアパタイトが形成する。これは、基質小胞内や周囲の蛋白質によって制御されていると考えられている。本研究では、基質小胞内でのリン酸カルシウム生成に着想を得て、人工の球状脂質二分子膜であるマイクロサイズの巨大リポソーム (GUV: Giant unilamellar vesicle) を小胞として用い、リン酸カルシウムの生成制御能を有するペプチドを内包した GUVs を作製し、リン酸カルシウムの生成過程の顕微鏡観察に取り組んだ (Figs. 1 and 2)。

GUVs に内包するペプチドは、これまでにリン酸カルシウムの生成を抑制する機能を持つことが報告されているオステオポンチン由来のペプチドを選択し、Fmoc 固相合成法により手動合成し、HPLC を用いて単離精製した。さらに、GUVs 内でのペプチドの分布が観察できるように、ペプチドの N 末端に導入した Cys 残基とマレイミド基の反応を利用して蛍光分子を化学修飾した。GUVs は界面通過法を用いて作製し、まずはペプチド非存在下でのリン酸カルシウムの生成を観察した。内水相をリン酸バッファーで満たした GUVs に、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンを添加し静置した後、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンを選択的に輸送するイオノフォアを添加してリン酸カルシウムの生成反応を開始させた。位相差顕微鏡観察では、イオノフォア添加後、GUVs 内で固体が徐々に生成していく様子が観察された (Fig. 2)。現在、種々の光学的手法を用いた固体の解析、および ペプチド存在下でのリン酸カルシウムの生成過程の顕微鏡観察を進めている。

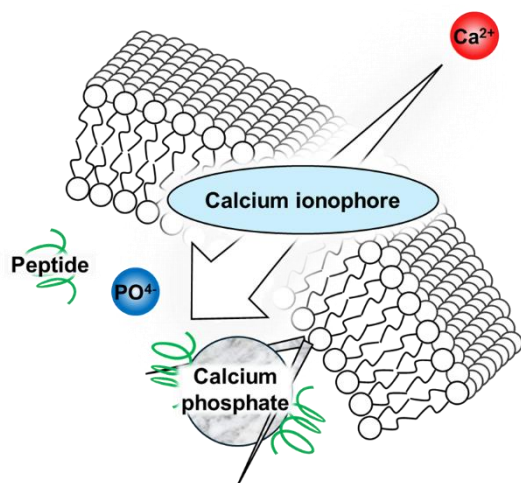


Fig. 1. Schematic representation of calcium phosphate formation within GUV.

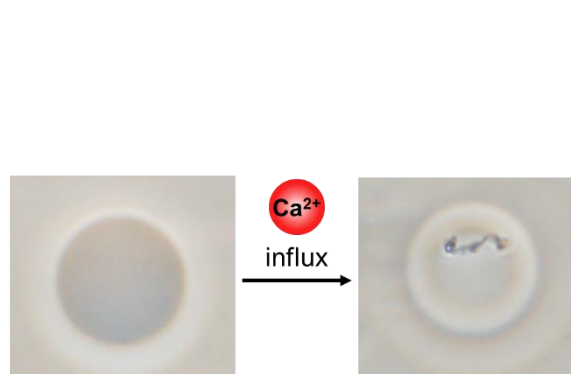


Fig. 2. Phase contrast microscopic images of GUV before and after the addition of  $\text{Ca}^{2+}$  ion and ionophore.

## トリペプチドの抗酸化活性に関わる量子化学的分子記述子

○宮地輝光（東工大物質理工学院）

**Quantum chemical descriptors of tripeptides for their antioxidant activities** (Sch. Mater. Chem. Technol, Tokyo Tech) MIYAJI, Akimitsu

さまざまな食品・飲料に含まれるトリペプチドには、健康維持に役立つ機能性トリペプチドが見出されている。たとえば、発酵乳に含まれるトリペプチドは、血管内皮機能の改善や前頭前野の活性化が報告されている<sup>1</sup>。また、トリペプチドには抗酸化活性を示すものもあり、酸化ストレスに関わる疾患の予防への有効性が期待されている。トリペプチドの抗酸化活性にはアミノ酸配列の違いが影響し、アミノ酸配列と抗酸化活性との配列活性相関が報告されている<sup>2</sup>。そこで本研究では、量子化学計算によって得られるトリペプチドの電子状態情報と抗酸化活性との間の相関性を検証し、トリペプチドの抗酸化活性に対して有効な量子化学的分子記述子を明らかにすることを目的とした。

種々トリペプチドについて密度汎関数法 (DFT) 計算により電子状態情報、抗酸化反応測定により抗酸化活性を得、抗酸化活性と相関性を示す電子状態情報を探索した。量子化学計算には Gaussian 16 プログラムを用い、密度汎関数法 (DFT) により各トリペプチド分子モデルの構造最適化計算を行った。汎関数には  $\omega$ B97X-D、基底関数には 6-311G(d,p) を用いた。また水溶媒の寄与を計算するため CPCM 法を用いた。トリペプチドの抗酸化活性は、2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate] (ABTS) カチオンラジカルの消去活性の測定により評価した。ABTS カチオンラジカルを含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) にトリペプチドを加えることで抗酸化反応を開始した。ABTS カチオンラジカルに起因する 734 nm の吸光度の減少を測定することで反応速度を決定した。

量子化学計算結果から得られる分子軌道のエネルギーや電荷分布、式(1)で計算されるイオン化ポテンシャル (IP) といった種々分子物性と、抗酸化活性との相関性を調べた。

$$IP = H(\text{tripeptide}^{\bullet+}) + H(e^-) - H(\text{tripeptide}) \quad \text{式(1)}$$

$H(\text{tripeptide})$  : トリペプチドモデルの総エンタルピー

$H(\text{tripeptide}^{\bullet+})$  : 一電子を除いたカチオンラジカルモデルの総エンタルピー

その結果、HOMO のエネルギー準位とトリペプチドの抗酸化活性との間に非線形の相関性があることがわかった (図1)。この HOMO エネルギー準位との相関性は、抗酸化活性を示す芳香族やカルボニル化合物でも見出されている<sup>3</sup>。また、IP とトリペプチドの抗酸化活性との間にも非線形な相関性を示すことがわかった。そこで、抗酸化活性が未知のトリペプチドについて HOMO エネルギー準位および IP を計算し、抗酸化活性を予測した。これを抗酸化活性の実測値と比較した結果、よい一致を示した。これら結果は、量子化学計算で得られた電子状態情報に基づいて、酸化ストレスに関わる疾患予防に有効なトリペプチドを探索あるいは設計できる可能性を示唆している。

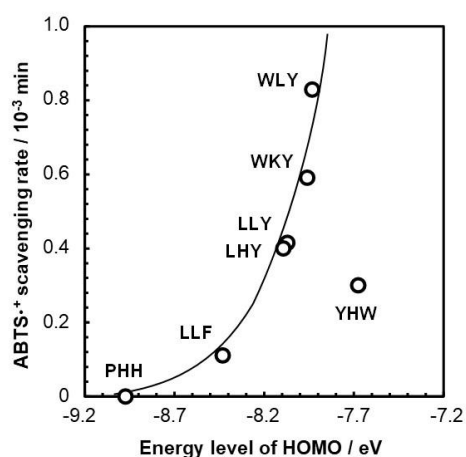


図1 トリペプチドの HOMO エネルギー準位と抗酸化活性との

1. A. Hamasaki, *et al.*, Am. J. Clin. Nutr. 109, 353-360 (2019)

2. N. Chen, *et al.*, Molecules. 23, 1407 (2018)

3. T. M. Nolte, *et al.*, Free Rad. Res. 52, 1118-1131 (2018)

## アジド修飾ゼラチン/アジド修飾ヒアルロン酸と水溶性歪みジイン からなる複合ヒドロゲルへの生細胞封入ゲルの作製

○細川紀代香<sup>1</sup>・佐藤史也<sup>1</sup>・Hernandez Paniagua Liliana Alejandra<sup>1</sup>・稲垣奈都子<sup>2</sup>・伊藤大知<sup>2</sup>・吉野大輔<sup>1</sup>・寺正行<sup>1</sup>(<sup>1</sup>東農工大院工、<sup>2</sup>東大院工)

**Formation of cell-encapsulated hydrogels based on azide-modified hyaluronic acid and gelatine with water-soluble strain diyne** (Graduate School of Engineering, Tokyo Univ. Agric. Technol.<sup>1</sup>, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo<sup>2</sup>) HOSOKAWA, Kiyoka<sup>1</sup>, SATO, Fumiya<sup>1</sup>; Hernandez Paniagua Liliana Alejandra<sup>1</sup>; INAGAKI, Natsuko<sup>2</sup>; ITO, Taichi<sup>2</sup>; YOSHINO, Daisuke<sup>1</sup>; TERA, Masayuki<sup>1</sup>

〔目的〕細胞の三次元培養に適した足場材料や細胞封入可能なバイオマテリアルの開発は、細胞と細胞外マトリックス間の相互作用を高度に再現できることから、疾患の進行を再現するモデルの作製や、それに対する薬剤スクリーニングなどの再生医療の分野で関心を集めている。特に生体直交反応を利用した足場材の架橋による細胞封入ゲルの作製は、生理条件下で反応が進行し、化学選択性が高いため細胞毒性が低く、近年注目されている<sup>[1]</sup>。当研究室では、2 価の歪みアルキンと側鎖に水溶性置換基を有した水溶性歪みジイン(WS-CODY)類の開発を行っており<sup>[2]</sup>、WS-CODY とアジド修飾ヒアルロン酸(HA-N<sub>3</sub>)を用いた細胞封入ゲルの作製に成功している。WS-CODY はヒドロゲルをアジドアルキン環化付加反応にて架橋することから、アジド修飾した任意の高分子材料を同時に架橋できるという特徴がある。そこで、本研究では

RGD モチーフをゲル内部に加えることで、ゲルに対して細胞接着を誘導することを目的とし、ゼラチンに対して、N<sub>3</sub>-PEG-カルボン酸をアミド縮合したアジド修飾ゼラチン(gelatin-N<sub>3</sub>)を合成し、WS-CODY と HA-N<sub>3</sub>、生細胞に加えて gelatin-N<sub>3</sub> を加えた細胞封入ゲルの作製を行った(Figure 1)。

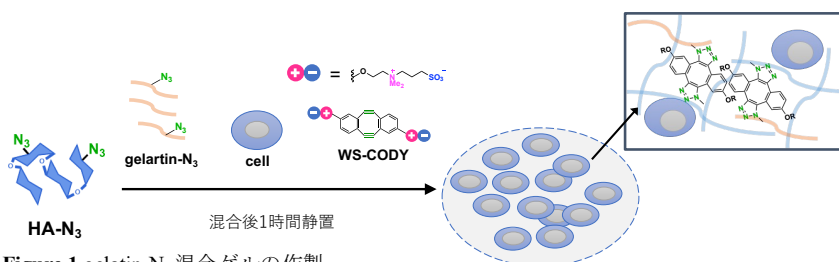


Figure 1 gelatin-N<sub>3</sub> 混合ゲルの作製

Figure 1 gelatin-N<sub>3</sub> 混合ゲルの作製

〔結果〕まずゼラチンのリシン残基に対し、N<sub>3</sub>-PEG-カルボン酸をアミド縮合させ、gelatin-N<sub>3</sub> の合成を行った。アジド修飾率を算出するために、2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid (TNBSA)を用いて、リシンの未反応の一級アミンの割合をアミンとの反応生成物であるトリニトロフェニル(TNP)誘導体の吸光度から算出した<sup>[3]</sup>。その結果、合成した修飾ゼラチンのアジド修飾率は 57%と算出された。難接着性肺がん由来細胞の PC-9 細胞株とヒト子宮頸がん由来細胞の Hela の 2 種類の細胞を用いて、WS-CODY(1 mM)と 0.75 w/v %の HA-N<sub>3</sub>(アジド修飾：28 %)、gelatin-N<sub>3</sub> とそれぞれ混合し、半球型のテフロンプレートに対して 5 μlずつ導入したところ、1 時間で球形の細胞封入ゲルを作製することができた(Figure 2)。また、0-48 時間では WS-CODY と HA-N<sub>3</sub> のみの細胞封入ゲルと同程度の細胞生存率を確認できた。この結果から、複数のアジド修飾高分子と WS-CODY による複合材料が作製可能であることが示された。

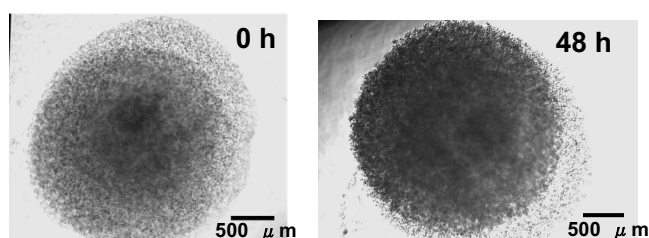


Figure 2 gelatin-N<sub>3</sub> 混合細胞封入ゲル

Figure 2 gelatin-N<sub>3</sub> 混合細胞封入ゲル

[1]Yoon, H. Y. *et al.*, *Advanced materials.*, **34**(10)(2022); [2] Kitagawa, K *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, **34**, 638–644 (2023); [3] Habeeb A. F., *Analytical biochemistry*, **14**(3), 328–336 (1966)



## グルコース修飾 turn-on 型蛍光プローブを用いた細胞イメージング

○定井佑樹・金森功吏・飛田健司・能城地洋・小倉俊一郎・湯浅英哉（東工大生命）

**Cellular imaging using glucose-modified turn-on type fluorescent probes** (School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) SADAI Yuki; KANAMORI Takashi; HIDA Kenji; NOGI Chihiro; OGURA Shun-ichiro; YUASA Hideya

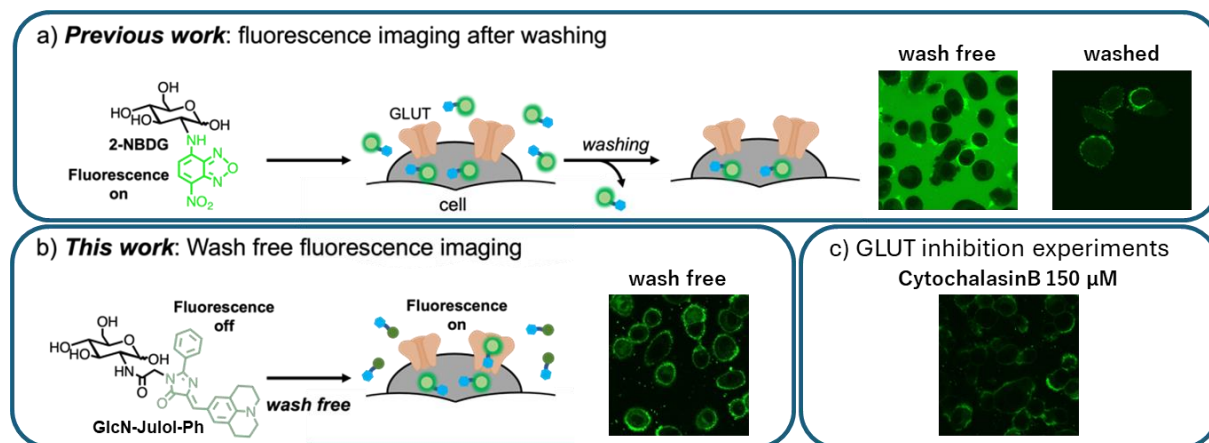
がんの診断法の一つとして、糖代謝の亢進に着目し GLUT を介した取り込みに基づくグルコース修飾蛍光プローブが多数開発されている。代表例としては、2-アミノグルコサミンに蛍光剤 NBD を導入した 2-NBDG が挙げられる。しかしこちらは、明瞭な蛍光イメージ像を得るには比較的高濃度(> 100  $\mu\text{M}$ )の投与が必要である。また、常時蛍光性の蛍光色素を使用しているため、細胞レベルの実験では余剰分の蛍光プローブを洗浄する必要がある(図 a)、また *in vivo* では標的外に分布した蛍光剤の排出を待つ必要がある。

そこで本研究では、GLUT への結合時や GLUT を介した取り込みにより細胞内で蛍光を示す turn-on 型蛍光プローブの開発を行った。これにより、無洗浄で迅速な細胞イメージングが可能になり、*in vivo* ではクリアランスを待たずに高いコントラストの蛍光イメージングが期待できる。

このような性質を示す蛍光性分子として、周囲の粘度環境に応答して蛍光の on/off が変化する蛍光性分子ローター (FMR) に着目した。FMR は低粘度環境では励起状態でのねじれを伴う無輻射失活により蛍光をほとんど発しないが、高粘度環境やタンパク質等に結合してねじれが制限されると強い蛍光を発する。本研究では、当研究室で見出した粘度応答性の高い FMR である GFP 色素誘導体<sup>1</sup>を用いて蛍光プローブを設計した。

蛍光プローブ GlcN-Julol-Ph を 20  $\mu\text{M}$  に希釈し、ヒト前立腺がん細胞 PC-3 に投与した。60 分後、倒立共焦点顕微鏡を用いて洗浄を行わずに観察したところ、期待した通り培地から蛍光はほとんど見られず、細胞の輪郭および細胞内部から蛍光が確認された(図 b)。この特異性を検証するため GLUT 阻害剤であるサイトカラシン B 存在下で同様の実験を行ったところ、細胞内の蛍光が減少した(図 c)。この結果から、GlcN-Julol-Ph が GLUT を経由して細胞内部に取り込まれて蛍光を発している可能性が示唆された。

以上、本研究では周囲の粘度環境に応答する蛍光色素 FMR を利用してグルコース修飾 turn-on 型蛍光プローブの開発に成功した。がん細胞の蛍光イメージングにおいては、既存法の 2-NBDG では高濃度(300  $\mu\text{M}$ )かつ洗浄が必要であったが、本研究では、無洗浄かつ低濃度(20  $\mu\text{M}$ )での蛍光イメージングを達成した。



1. 飛田 健司, 湯浅 英哉, 金森 功吏. 日本化学会 第 102 春季年会(2022), Mar. 2022.

## Oil-in-Water (O/W) エマルション界面を安定化する酵素反応性ペプチド集合体の探索とワクチンへの応用

○樋口亜也斗<sup>1</sup>・若林里衣<sup>1</sup>・後藤雅宏<sup>1,2</sup>・神谷典穂<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>九大院工、<sup>2</sup>未来化学創造センター)

**Investigation of enzyme-reactive peptide assemblies for stabilizing Oil-in-Water (O/W) emulsions and vaccine applications** (Graduate School of Engineering, Kyushu University<sup>1</sup>, Center for Future Chemistry, Kyushu University<sup>2</sup>) HIGUCHI, Ayato<sup>1</sup>; WAKABAYASHI, Rie<sup>1</sup>; GOTO, Masahiro<sup>1,2</sup>; KAMIYA, Noriho<sup>1,2</sup>

ワクチンによる高い免疫効果を得るためには、抗原と免疫増強効果を有する物質であるアジュバントの同時投与が重要である。本研究では一部のワクチン製剤のアジュバントとして用いられている Oil-in-Water (O/W) エマルションに注目し、高いワクチン効果を示す O/W エマルションワクチンの創製を目的とした。そのために、抗原タンパク質を直接修飾可能な両親媒性ペプチド (PA) 集合体を O/W エマルションの安定化剤として用いることを考案した<sup>[1]</sup>。これまでに我々は、グルタミン (Q) 残基とリジン (K) 残基もしくは 1 級アミンを架橋する酵素である微生物由来トランスグルタミナーゼ (MTG) による部位特異的反応を用いて、PA である Fmoc-L<sub>n</sub>QG (n=2,3) が形成する集合体上へのタンパク質の集積化に成功しており<sup>[2]</sup>、この技術を用いることで O/W エマルション界面の PA 集合体上に抗原タンパク質を特異的かつ安定に担持し、高い免疫効果が得られることを期待した (Fig. 1)。本発表では、X 部位に異なる性質を持つアミノ酸を導入した Fmoc-XL<sub>2</sub>QG (X=E, R, N, Y, L) を設計し、各 PA の自己組織化挙動、酵素反応性、エマルション界面安定化能の評価を行い、O/W エマルションの界面を安定化する MTG 反応性 PA 分子の探索を行った結果について報告する。また、PA 集合体への抗原タンパク質の集積と免疫細胞への導入評価を行うことで、本 O/W エマルションのワクチンへの適応可能性を検証した。

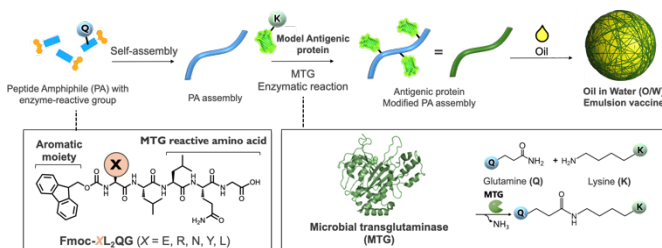


Fig. 1 Design of Oil in Water (O/W) emulsion vaccine.

透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により、X=E, N, Y を導入した PA はファイバー状、X=R は不定形、X=L はテープ状の集合体を形成することが確認された。また、水相に PA 集合体と共界面活性剤、油相にスクアレンを用いて調製した O/W エマルションの界面に PA 集合体が吸着していることが TEM 観察により明らかとなった。エマルションの安定性は経時的な濁度測定により評価し、R < L < E = N = Y であることが明らかとなった。ファイバー状の集合体を用いた際に安定性が高いことから、O/W エマルションの安定性に PA 集合体の形態が影響を与えることが示唆された。モデル抗原タンパク質として EGFP を使い、PA 集合体への抗原タンパク質の集積を評価した。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察により、全ての PA 集合体への EGFP の集積が確認された。O/W エマルションを用いた際の樹状細胞 (DC2.4 細胞) への EGFP 取り込みを CLSM 観察、フローサイトメトリーにより評価した。その結果、EGFP を単独で作用させた場合と比較して、酵素反応により共有結合的に EGFP を修飾した O/W エマルションを作用させた場合に DC2.4 細胞への EGFP の高い取り込みが確認された。特に、エマルションの安定性が高い X=N, Y にて高い取り込みが確認された。以上の結果より、抗原タンパク質の高い細胞取り込みには、PA 集合体に共有結合的に抗原タンパク質が修飾されていること、O/W エマルションが安定であることが重要だと考えられる。

[1] S. Bai *et al.*, *ACS Nano*, **8**, 7005-7013 (2014) [2] R. Wakabayashi *et al.*, *Chem. Commun.*, **55**, 640 (2019)

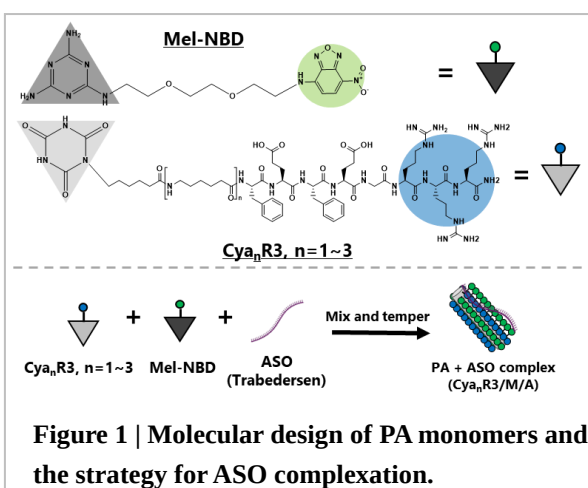
【謝辞】本研究は JSPS 科研費 JP22H01884, JP22KJ2482 の助成を受けたものです。

## 両親媒性ペプチドによる核酸医薬のがん細胞スフェロイドへの深部送達

○Tan Ingram<sup>1</sup>・若林里衣<sup>1</sup>・神谷典穂<sup>1,2</sup>・後藤雅宏<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> 九大工学府, <sup>2</sup> 未来化学創造センター)

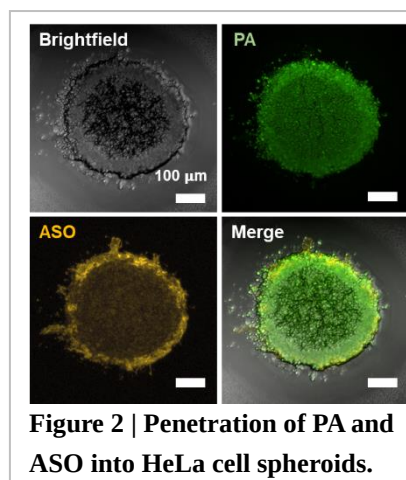
**Deep Cancer Cell Spheroids Delivery of Antisense Oligonucleotide by Peptide Amphiphiles** (Graduate School of Engineering, Kyushu University<sup>1</sup>, Center for Future Chemistry, Kyushu University<sup>2</sup>) INGRAM, Tan<sup>1</sup>; WAKABAYASHI, Rie<sup>1</sup>; KAMIYA, Noriho<sup>1,2</sup>; GOTO, Masahiro<sup>1,2</sup>

**[Abstract]** Nucleic acid drugs such as antisense oligonucleotides (ASO) are a powerful class of drug, enabled by their ability to alter genetic functions in targeted cells for therapy. However, their intrinsic physiochemical properties, such as poor serum stability and anionic charge, pose a challenge for effective delivery in the human body. Further challenge arises in application for cancer treatment which requires penetration of the therapeutics deep within the tumor structure. Here, a co-assembly of peptide amphiphiles (PAs) consisting of cyanuric acid-modified PA (Cya-PA) and melamine-nitrobenzofurazan (Mel-NBD)<sup>1</sup> is used as the platform to develop a deep tumor delivery system for ASOs (**Fig. 1**). To model and study *in vivo* tumor penetration, 3D cancer cell spheroids were constructed and experimented on.



**[Methods]** Cya-PA monomers with different numbers ( $n = 1-3$ ) of alkyl linkers were first modified to have triple-arginine moiety (Cya<sub>n</sub>R3) for electrostatic complexation with ASO. Cya<sub>n</sub>R3 and Mel-NBD could co-assemble in D-PBS to form nanofibers of tunable size. To achieve complexation, Cya-PA, Mel-NBD and ASO were mixed and tempered together to form complex nanostructures. Transfection efficiency experiments were conducted on HeLa cells and analyzed with CLSM and ELISA. HeLa cell homospheroids were constructed to test for tumor penetration.

**[Results]** By lengthening the alkyl linker in the Cya-PA monomer, increasing length of PA nanofibers was formed. Similarly, complex nanostructures formed also demonstrated size-tunability by the length of Cya<sub>n</sub>R3. By tuning the complex nanostructure size, transfection and gene knockdown properties can be improved in 2D monolayer cultures. In 3D cancer cell spheroids, the co-assembly of PA demonstrated deep penetration into the cell spheroids. Similar to monolayer cell culture, the rate of penetration correlates to the rate of cellular internalization. When HeLa cell spheroids were treated with complex nanostructures, penetration of both PA and ASO was observed (**Fig. 2**). To conclude, the co-assembly of PA acts as a promising platform for deep tumor ASO delivery.



1. R. Wakabayashi *et al.*, Chem. Commun., 55, 49, 6997-7000 (2019)

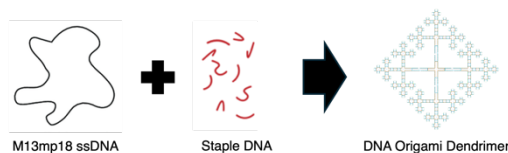
**[Acknowledgement]** This work was supported by JSPS KAKENHI Grant Number JP22H01884

## DNA Origami 法の DDS への応用を指向した薬剤内包 DNA Origami デンドリマーの抗がん活性評価

○谷本晃一・南出悠貴・橋本穂亜・田中喜基・真野祐樹・葛谷明紀（関西大 化学生命工）

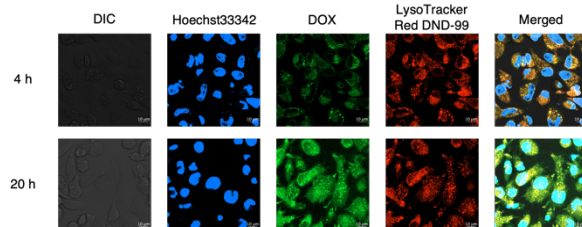
**Evaluation of anticancer activity of drug-encapsulated DNA Origami dendrimer for application of DNA Origami method to DDS** (Department of Chemistry and Materials Engineering, Kansai University,) TANIMOTO, Koichi; MINAMIDE, Yuki; HASHIMOTO, Maria; TANAKA, Haruki; MANO, Yuki; KUZUYA, Akinori

疾患部位に薬剤を効率的に届ける技術であるドラッグデリバリーシステム (DDS) では、標的細胞への薬剤の効率的かつ安全に送達するためにナノキャリアが用いられている。ナノキャリアの一つに、長い一本鎖環状 DNA を多数の短い一本鎖 DNA で折り畳むことで任意のナノ構造体を作製することができる DNA Origami<sup>1)</sup> がある。当研究室ではこれまでに、中心から規則的に分岐した構造を持つ樹状高分子のデンドリマーを参考に四分岐、第四世代まで続く「デンドリマー型 DNA Origami 構造体」を開発してきた (Fig. 1)。この構造体は抗がん剤の一つであるドキソルビシン (DOX) を内包可能である。本研究ではヒト子宮頸がん細胞 (HeLa 細胞) に DOX 内包デンドリマー型 DNA Origami 構造体を取り込ませ、抗がん活性評価と細胞取り込み機構の調査を行った。



**Fig. 1** Design of DNA Origami Dendrimer.

作製した DOX 内包デンドリマー型 DNA Origami 構造体を HeLa 細胞に取り込ませ、Live/Dead Assay を行った結果、4 時間の培養後では死細胞を染色する Ethidium Homodimer-1 由来の赤色蛍光が観察されなかったが、20 時間後には多くのがん細胞が死滅していた。これは時間経過とともに DOX がデンドリマー型 DNA Origami 構造体から徐々に放出され、抗がん活性を示したためと考えられる。また細胞取り込み機構の調査において、デンドリマー型 DNA Origami 構造体に修飾した FAM 由来の緑色蛍光はリソソームを染色する LysoTracker Red DND-99 由来の赤色蛍光と細胞核の周りに顆粒状に共局在していることが確認された。このことから、エンドサイトーシス経路を通じて細胞内に取り込まれたと考えられる。DOX 内包デンドリマー型 DNA Origami 構造体は、4 時間後では DOX 由来の緑色蛍光が LysoTracker Red DND-99 由来の赤色蛍光と細胞核の周りに顆粒状に共局在し、20 時間後には細胞全体に広がっていることが確認された (Fig. 2)。このことから、DOX 内包デンドリマー型 DNA Origami 構造体はエンドサイトーシス経路を通じて細胞内に取り込まれた後、DOX のみがリソソームから放出され、核輸送されたと考えられる。



**Fig. 2** CLSM images of HeLa cells with DOX-encapsulated DNA Origami dendrimer after 4- and 20-hour incubation.

1. P. W. K. Rothmund, *et al.*, *Nature*, **2006**, *440*, 297-302.



## ホルムアルデヒド耐性を有する *Pseudomonas* sp. の単離とホルムアルデヒドジスムターゼ活性評価

○渡久地格生・小林茉穂・関篤也・小寺南渡・加藤紀弘・奈須野恵理

(宇都宮大院)

**Isolation of a formaldehyde-resistant *Pseudomonas* sp. and evaluation of its formaldehyde dismutase activity** (Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya Univ.) TOGUCHI, Koki; KOBAYASHI Maho; SEKI, Atsuya; KODERA Minato; KATO Norihiro; NASUNO Eri

工業分野及び医療分野で幅広く利用されるホルムアルデヒド (FA) は、生物毒性を有することから排水からの除去が必要とされる。活性汚泥処理施設を有するプラントでは細菌による生物処理が低コストで有用であるものの、FA が殺菌効果を有することから従来の微生物処理による FA 分解には長時間を要する課題があった。本研究では、高濃度 FA 排水を処理する活性汚泥槽から FA 耐性を有する細菌をスクリーニングし、ホルムアルデヒドジスムターゼ (FDM) 活性を有する *Pseudomonas* sp. No. 44 を単離し、生菌体および乾燥菌体による FA 分解特性を解析した。

*Pseudomonas* sp. No. 44 を 1 g/L FA を含有する LB 培地で培養すると、培養時間の経過と共に FA 濃度の低下が観測され、FA 濃度が 0.1 g/L 付近まで低下した後に増殖が優位となり培養液の濁度 (OD<sub>600</sub>) の上昇が起こった (Figure)。control として FA 耐性の無い *Escherichia coli* で試験すると FA 分解と増殖は共に観測されない。NADH を補酵素として FA を酸化することでギ酸を、FA を還元することでメタノールを生成する FDM 遺伝子を No. 44 株は保有しており、FA の分解が進行すると推察された。FA の定量にはアセチルアセトンを経験とする Nash 法を、ギ酸の定量には Formate Colorimetric Assay Kit (BioVision, USA) を用いた。FA 濃度の低下に伴いギ酸が検出され培養 2 h 付近で極大を示したことから、FA から誘導されたギ酸は、更にギ酸デヒドロゲナーゼ等の作用により CO<sub>2</sub> ガスへと変換された可能性が示唆された。培地からの FA 除去を試験すると、試験した 5~30 °C で良好な FA 除去活性を示した。

先行研究により FA 分解活性を有する *Pseudomonas putida* が FA を分解するにはリン酸イオンが必須となることが示されている。そこで、No. 44 株の菌体をリン源としてリン酸イオンを、窒素源としてアンモニウムイオンを含有する FA 水溶液で試験すると、No. 44 が FA を単一炭素源とする FA 分解には 約 4 mM 以上のリン酸イオンの共存が必要であった。

大量培養した No. 44 菌体を遠心分離した後に減圧乾燥した乾燥菌体は、FDM 活性を保持しており、リン酸イオンの共存下で生菌体と同等の FA 除去活性を示した。No. 44 は 5 g/L FA 溶液に対しても耐性を有し、FA 分解が進行することから、FA の生物学的処理に No. 44 は高い処理能力を有する。

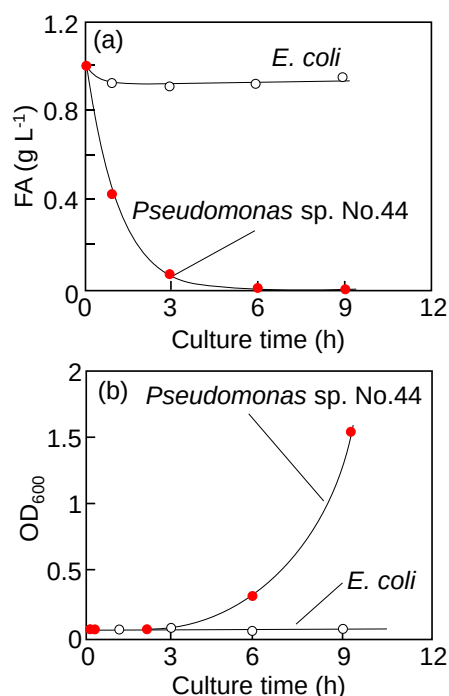


Figure Time dependence of (a) FA concentration and (b) cell density (OD<sub>600</sub>) during the batch culture of *Pseudomonas* sp. No.44 and *E. coli* DH5α at 30 °C (LB medium containing 1 g/L FA).



## 上皮成長因子受容体を標的とした局在性ゲフィチニブの合成と阻害活性評価

○三田村 啓史・筒井 啓太・吉川 優・築地 真也（名工大院・工）

**Synthesis and evaluation of membrane-localizable gefitinib ligands targeting the epidermal growth factor receptor** (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology) MITAMURA, Keishi; TSUTSUI, Keita; YOSHIKAWA, Masaru; TSUKIJI, Shinya

タンパク質の活性を阻害できる低分子阻害剤は、疾患治療やシグナル伝達研究において重要なツールとなっている。一方、有効な低分子阻害剤の創製は今なお難しい。特に、阻害剤の開発においては、少ない投与量で効果の高い化合物が求められており、標的タンパク質に対していかに高い親和性で結合する化合物構造を見出せるかが大きな焦点となっている。ここで重要な点を指摘したい。現在の低分子阻害剤開発（創薬）では、阻害剤は細胞内を拡散させて使用することを前提としている。一方、阻害剤が標的とするタンパク質（特にがんや疾患の原因となるタンパク質）は細胞内の特定の膜やオルガネラに局在している場合が多い。そこで我々は、阻害剤開発のための新たな概念として、「標的タンパク質と共局在する阻害剤（局在性ドラッグ）」というアプローチを提案する。阻害剤を標的タンパク質と同じ領域に共局在させることができれば、標的タンパク質周辺の阻害剤濃度を局所的に高くすることができ、高い阻害効果を実現できるかも知れない。特にこのアプローチは、拡散状態では親和性が足りずに効かなかった阻害剤を、標的タンパク質と共局在させることで、強力な阻害剤へと変換できる可能性がある。また、局在性ドラッグは、原理上、少ない投与量でも十分な阻害効果や部位特異的阻害効果を発揮しうするため、オフターゲット活性の低減などにつながる可能性も期待される。

本研究では、上記「局在性ドラッグ」の概念実証を目指し、上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor; EGFR）を標的とする局在性ゲフィチニブの開発に着手した。本発表では、膜に局在するゲフィチニブ誘導体群の設計と合成、およびそれらの阻害活性評価の結果について報告する。

## ゼラチン/アルギン酸カルシウム混合ゲルの物性測定と細胞接着性の評価

○西航輝・森英樹・原正之（大阪公立大学大学院理学研究科生物化学専攻）

**Measurement of physical properties of gelatin/calcium alginate mixed gel and evaluation of cell adhesion**  
(Department of Biological Chemistry, Graduate School of Science, Osaka Metropolitan University) NISHI, Koki;  
MORI, Hideki, HARA, Masayuki

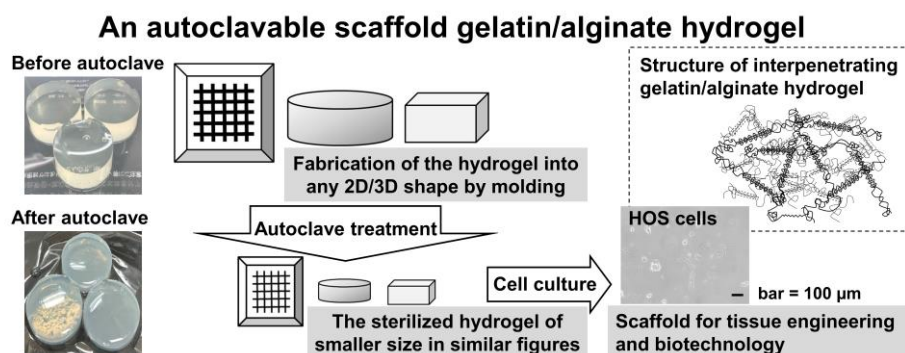
コラーゲン蛋白質の変性物であるゼラチンは高温で溶解し、低温で分子鎖間が物理的に架橋しゲル化する熱可塑性を持つ。一方、多糖類のアルギン酸は、カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の配位によって分子鎖間が架橋してゲル化する性質を持つ。架橋原理の異なる2つのゲル素材を組み合わせで作製した、ゼラチン/アルギン酸カルシウム混合ゲル (GAC 混合ゲル) は、鋳型成形により任意の形状に容易に加工でき、オートクレーブ滅菌も可能な細胞培養基材としての利用が期待される。本実験は、GAC 混合ゲルの物性、細胞接着性などのデータ収集を目的として、ゼラチンの濃度を変えた GAC 混合ゲルを作製し、膨潤試験、動的粘弾性測定による物性評価を行った。また、ヒトグリオーマ株化細胞 T98G 及びヒト骨肉腫 (HOS) 細胞をゲル上で培養し、これら2種類の腫瘍細胞のゲルへの接着性を調べた。

GAC 混合ゲルの作製方法として、2% (w/v) アルギン酸ナトリウム水溶液と 2%、4%、8%、16%、20%、32% (w/v) の Type A ゼラチン水溶液をそれぞれ別容器に等量混合し、溶解後にアルミ製の鋳型に入れ、徐々に冷却して混合液中のゼラチンをゲル化させた。次に、鋳型から取り出した試料を 0.5 M  $\text{CaCl}_2$  水溶液に浸漬して  $\text{Ca}^{2+}$  をゲルに含浸させ、アルギン酸のゲル化を進行させた。

作製した GAC 混合ゲルの半数は 120℃、15 分間のオートクレーブ滅菌処理を行い、滅菌処理前と処理後の GAC 混合ゲルを 37℃で蒸留水中に浸漬し、時間経過ごとにゲルの重量変化を記録して膨潤性を評価した。膨潤試験では全てのゲルの重量が減少したが、減少割合は滅菌処理前で大きく、またゼラチン濃度が高い試料ほど大きくなった。膨潤試験後、レオメーターで動的粘弾性測定を行い、全ての試料で貯蔵弾性率 ( $G'$ ) が損失弾性率 ( $G''$ ) を上回り、ゲル化していたことを確認した。また、細胞接着性を調べるために、T98G 細胞と HOS 細胞を GAC 混合ゲル上に播種し、経時的に顕微鏡観察を行い、接着の有無を確認した。播種した細胞は全てのゼラチン濃度のゲルに接着し、日数の経過に伴ってやや伸展した形態を示した。

蒸留水中での重量変化の記録から、オートクレーブ滅菌処理によってゼラチンが溶出したゲルであっても、ゼラチン濃度を高く設定したサンプルでは、ゼラチンの溶出がみられた。また、動的粘弾性測定の結果から、ゼラチン濃度の違いによって各 GAC 混合ゲルの粘弾性には極端に大きな違いは見られなかった。培養実験結果からは、各ゼラチン濃度のゲル全てで細胞の培養が可能であることが判った。

H. Mori *et al.*, (2024) *J. Biosci. Bioeng.*, 137(6), 463-470, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2024.01.015>



## 老化細胞選択性を付与した遺伝子指向性

### ケージドアニソマイシンの設計と合成

○朝倉麟太郎・古田寿昭（東邦大院理）

**Design and Synthesis of Gene-Directed Caged Anisomycin with Senescent Cell Selectivity** (Graduate School of Science, Toho University) ASAKURA, Rintaro; FURUTA, Toshiaki

加齢に伴う老化細胞の蓄積は、癌やアルツハイマー病のような老化関連疾患の原因となることが知られている<sup>1)</sup>。老化細胞の選択的除去技術があれば（セノリシス）、細胞老化を遅延し、老化関連疾患を予防することが期待できる。哺乳動物の老化細胞は、老化関連 $\beta$ -ガラクトシダーゼ（SA- $\beta$ -Gal）活性が上昇することが知られている。光作動性のケージド化合物に $\beta$ -Gal 作動性を付与できれば、老化細胞に光照射したときにだけはたらく、光と酵素で二重に鍵をかけたケージド化合物とすることができる。本研究では、タンパク質合成阻害能を持つアニソマイシンを、老化細胞選択的に、かつ、任意のタイミングで機能発現させられる、遺伝子指向性ケージド化合物<sup>2)</sup>に変換した Gal-Bn-Bhcmoc-aniso (1) の開発を目的にした。

化合物 1 は、酵素作動性の光反応性ロックとして $\beta$ -ガラクトシル（Gal）基を、また、光作動性の生理活性ロックとして、光分解性保護基の Bhc 基を利用して、アニソマイシンを修飾している（図 1a）。例えば、老化モデル生物に化合物 1 を投与すると、老化細胞内で Gal 基が選択的に除去され、ケージドアニソマイシンである Bhcmoc-aniso が生成する。ここに紫色光照射を行うと、Bhc 基の脱保護で活性を取り戻したアニソマイシンは、老化細胞選択的にアポトーシスを誘導することが期待される。

4-ヒドロキシベンズアルデヒドの $\beta$ -選択的ガラクトシル化を経て、5段階の反応で鍵合成中間体を合成し、さらに2段階の反応で目的の Gal-Bn-Bhcmoc-aniso (1) の合成を完了した。合成した化合物 1 に 405 nm の光照射を行い、HPLC 測定により光照射時間に伴う反応を追跡した。結果、405 nm の光照射に感受性を示さないことが確認できた。 $\beta$ -Gal によって Gal-Bn 部位を除去した Bhcmoc-aniso は、405 nm 照射によって量子収率 0.14 でアニソマイシンを放出することも確認した。化合物 1 は、 $\beta$ -Gal 基の存在により、老化細胞選択性を付与した酵素作動性プロドラッグとして働くことが期待される。化合物 1 を哺乳動物培養細胞に適用し、鍵酵素及び光照射の有無による細胞への影響について調べた結果も議論する。（図 1b）

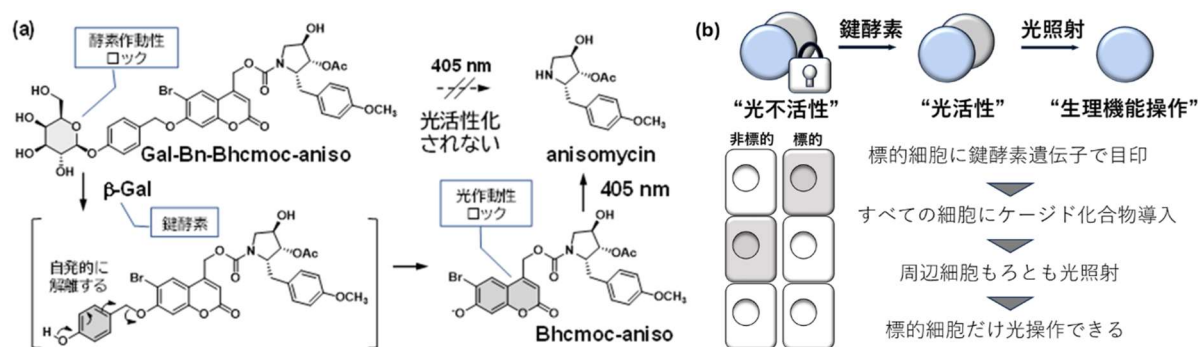


図 1  $\beta$ -Gal 作動性遺伝子指向性ケージドアニソマイシンの設計と細胞への応用

1) (a) Paez-Ribes, M. *et al.*, *Embo Mol. Med.*, **2019**, *11*, e10234, (b) Childs, B. G., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2017**, *16*, 718.

2) (a) Suzuki, A. Z. *et al.* *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 5630., (b) Sakamoto, K. *et al.* *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 10484. (c) Yokoyama, A. *et al.* *ChemPhotoChem*, **2024**, *accepted*.

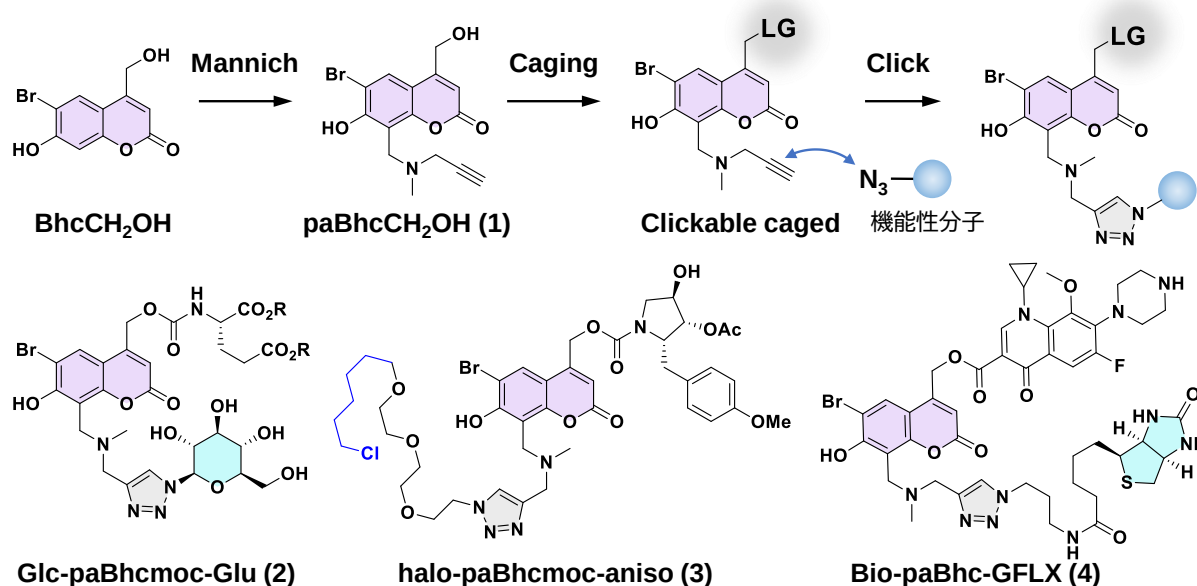
## 機能性部位を導入できる Clickable ケージド化合物の設計と合成

○中居猛秀・佐藤 創・古田寿昭（東邦大理）

**Design and synthesis of clickable caged compounds for cell-type selective targeting** (Department of Biomolecular Science, Faculty of Science, Toho University) NAKAI, Takehide; Sato, Tsukuru; FURUTA, Toshiaki

ケージド化合物とは、生理活性分子の活性に不可欠な官能基を光分解性保護基で保護し、一時的にその活性を失わせた化合物である。紫外または可視光照射によって脱保護されるため、生理活性分子の生理機能を光制御することが可能である。光制御は高い時空間分解能をもつため低侵襲な方法で細胞の生理機能を操作する有用なツールとして期待される。しかし、生細胞に適用すると予期せぬ挙動を示すことが往々にしてあり、様々な性質改変が求められる。そこで、本研究では、クリック反応を利用して、用途に応じて必要な機能性分子を容易に追加できる Clickable ケージド化合物を設計・合成して、その光反応性を明らかにすることを目的にした。

本研究室で開発された (6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl) methyl 基 (Bhc 基) を光分解性保護基に選び、Bhc 基の 8 位の炭素にプロパルギルアミンユニットを導入することで、多機能性を付与するためにプラットフォームとなる Clickable ケージ前駆体 paBhcCH<sub>2</sub>OH (**1**) を合成した。次に、**1** の 4 位の炭素に、生理活性分子として神経伝達物質や種々の薬剤を選択して導入することで、Clickable ケージド化合物を合成した。クリック反応で導入する機能性分子として、水溶性向上とトランスポーターを介した取り込みが期待されるグルコースやビオチン、ターゲッティング能を有するハロタグリガンドを選択し、反応条件と生成物の精製条件を検討した。その結果、水溶性の向上が期待できるケージドグルタミン酸誘導体 glc-paBhcmoc-Glu (**2**)、目的細胞に集積することが期待される Halo-paBhcmoc-aniso (**3**) や Bio-Bhc-GFLX (**4**) に変換できることを明らかにした。**2** と **3** は、405 nm 光照射で光分解することを確認し、**2** の光反応効率 ( $\epsilon\phi$ ) は 200 以上で、優れた光反応性を示すことも明らかにした。



1) a) A. Z. Suzuki *et al.*, *Chem. Commun.*, **55**, 451-454 (2019); b) A. Z. Suzuki *et al.*, *Jove-Journal of Visualized Experiments*, e60021 (2019); c) 古田寿昭, *薬学雑誌*, **142**, 495-502 (2022)

## 凝集/解離によるプテリン型蛍光 off/on プロブの開発

○中井咲輝・河合靖（長浜バイオ大学大学院）

Development of pterin-type fluorescent off/on probes by aggregation/dissociation (Graduate School of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology) NAKAI, Saki; KAWAI, Yasushi

off/on 型の蛍光プロブは様々な生命現象の検出に貢献している。これまで報告されている off/on 型プロブの多くは PET を利用しているが、タンパク質や核酸など生体高分子の構造変化のような可逆的な現象の検出には利用しにくいという課題がある。これらの検出が可能な蛍光プロブとしてローター型のものが報告されているが、異なるメカニズムの蛍光プロブの開発が望まれている。そこで、今回我々は新しいメカニズムの可逆的な off/on 型蛍光プロブを開発し、その off/on メカニズムを明らかにした。

葉酸関連分子として知られているプテリンは蛍光性を有しているが、蛍光波長が短波長であることや蛍光強度が低いという問題点があり、蛍光プロブとしては応用されていない。我々はプテリンの蛍光プロブとしての応用を目的とし、これらの問題点を改善するために、ジアミノプテリジン(図 1)とハロゲン置換基を有するベンゼン環を共役系リンカーで繋ぎ、プテリン誘導体を合成した。置換基にはハロゲンを導入し、3 種類のハロゲン置換基と 3 つの共役系の長さ(二重結合 1, 2, 3 個)を変えて化合物を網羅的に合成した(図 2)。これらの化合物の蛍光特性を調べるため様々な溶媒中で蛍光測定を行った結果、ほとんどの化合物が水中で消光、有機溶媒中で蛍光を示した。加えて、これらの化合物は有機溶媒の極性が高くなると蛍光の長波長シフトと蛍光強度の減少を示し、極性変化に敏感に応答する蛍光分子であることを見出した。また、共役系の長さや置換基の種類が蛍光強度や蛍光波長に大きく影響を及ぼすことがわかり、とくにリンカーの二重結合が 2 つ、置換基 Cl を導入した化合物で蛍光強度が高くなる傾向が見られた。さらに、共役系を長くすると蛍光強度の減少と長波長シフトを引き起こした。

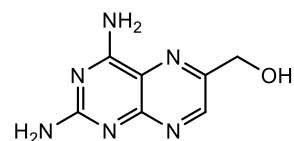


図 1 ジアミノプテリジン

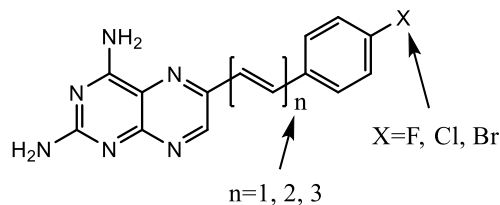


図 2 共役拡張プテリン型プロブの構造

このような共役拡張プテリン型プロブの蛍光 off/on は、プロブの凝集/解離によって起こると考えている。これらのプロブは、リンカーに二重結合を含むことからローター型プロブのような回転による消光は起こりにくいと推測される。そして、プロブは溶媒に溶けにくく平面構造の分子であることから、分子同士が凝集することによって蛍光が off になり、解離して溶液中に単独で存在するときに蛍光が on になると考えた。しかし、共役拡張型プロブが消光時に凝集しているという証拠は得られていなかったため、今回、溶液中の化合物が凝集体を形成しているかを調べることにした。蛍光が消光する水中と、対照に強い蛍光を発するジオキサン中にプロブを溶解し、レーザー回折法によって粒子径を解析した結果、ジオキサン中では粒子径が小さいのに対し、水中では化合物の粒子径が数百 nm 以上で大きな凝集体を形成していることが示された。これらから、プロブは水中で消光する際に凝集体を形成していることが証明され、開発した共役拡張プテリン型プロブは凝集/解離メカニズムを有する蛍光 off/on の蛍光分子であることが明らかになった。よって、プロブの凝集と解離のエネルギーバランスを調整することで、より off/on 効率の良い蛍光プロブの開発が期待できる。



## 膜酵素 $\alpha$ グルコシダーゼの活性を調節する 1-デオキシノジリマイシン集積ポリロタキサンの開発

○天満裕太<sup>1</sup>, 幡野明彦<sup>1</sup>, 加藤敦<sup>2</sup> (芝浦工大<sup>1</sup>, 富山大<sup>2</sup>)

### Development of the polyrotaxane accumulated 1-deoxynojirimycin to control the activity of $\alpha$ -glucosidase such as membrane enzyme

Yuta Tenma<sup>1</sup>, Akihiko Hatano, Atsushi Kato

(Shibaura Institute of Technology, University of Toyama)

糖尿病は、慢性的に血中糖濃度が高くなる病気であり、血管障害が発生して様々な合併症を引き起こす。糖尿病の治療薬として、グルコースと構造的に類似している 1-デオキシノジリマイシン

(DNJ) が知られていて、小腸上皮細胞上に存在する  $\alpha$ -グルコシダーゼと特異的に結合して阻害するが、グルコーストランスポーターを通るため、体中のライゾゾーム由来のグルコシダーゼの働きも阻害してしまう。近年、DNJ の特性を利用したクラスター型 DNJ の研究が積極的に行われている<sup>1,2</sup>。多官能性分子を足場として多数の DNJ を結合することで、局所的な DNJ 濃度が増加し、 $\alpha$ -グルコシダーゼとの親和性が向上することが報告された。しかし、これらのクラスター型 DNJ では、 $\alpha$  グルコシダーゼ一分子とクラスター型 DNJ 一分子が 1 : 1 で結合するため、クラスター型 DNJ に結合している残りの DNJ 分子は無駄になっていた。DNJ の位置を自動的に調節して複数の  $\alpha$ -グルコシダーゼを阻害する調節型阻害剤が必要である。

本研究では、ポリロタキサンを足場として DNJ を集積化させたポリロタキサンを開発する(図 1)。本分子は、軸分子にプロピレングリコール (PPG), 貫通している輪の部分は DNJ を共有結合した  $\beta$  CD を複数分子貫通させる。PPG と  $\beta$  CD は共有結合していないため、CD は自由に回転し、かつ PPG 分子上をスライドすることが可能であり、 $\alpha$ -グルコシダーゼを自動的に探索し、その働きを阻害することが可能となる。

本研究では、ポリロタキサンを足場として DNJ を集積化させたポリロタキサンを開発する(図 1)。本分子は、軸分子にプロピレングリコール (PPG), 貫通している輪の部分は DNJ を共有結合した  $\beta$  CD を複数分子貫通させる。PPG と  $\beta$  CD は共有結合していないため、CD は自由に回転し、かつ PPG 分子上をスライドすることが可能であり、 $\alpha$ -グルコシダーゼを自動的に探索し、その働きを阻害することが可能となる。

現在、DNJ 結合  $\beta$  CD を合成し、PPG と混合することでポリロタキサンを得た。核磁気共鳴装置により、平均分子量 2000 の PPG に対して DNJ 結合  $\beta$  CD は 20 分子貫通していることが分かった。また、DNJ 結合  $\beta$  CD をラット小腸由来  $\alpha$  グルコシダーゼに対する阻害実験を行ったところ、 $\beta$  CD が結合していても膜酵素を十分に阻害することがわかった。

#### References

- 1) C.-Deroocq et.al., *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 13825.
- 2) P.-Compain et.al., *Angew. Chem, Int, Ed.* **2010**, 49, 5753.

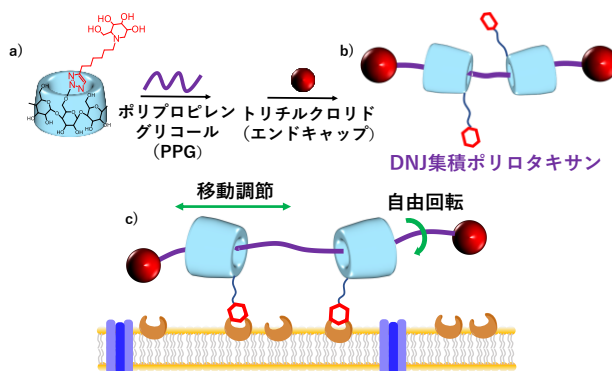


図 1  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を最大化する  
DNJ 集積ポリロタキサンの概念図

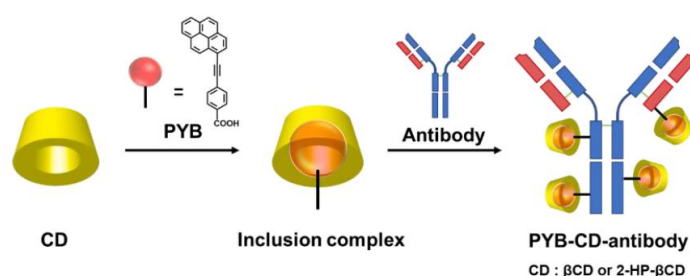
## シクロデキストリンの特異的な色素取り込みを利用した蛍光標識抗体の効率的な作製法

○山口浩靖<sup>1,2</sup>・岩井悠馬<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大院理、<sup>2</sup>阪大 FRC)

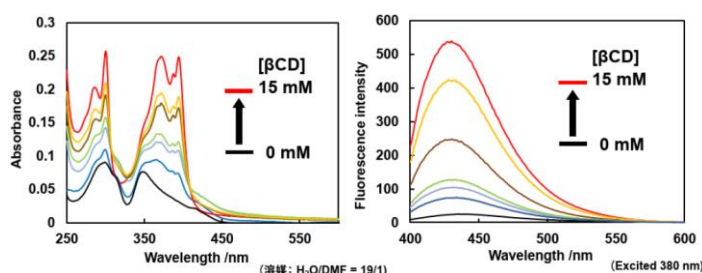
**Efficient Preparation of Fluorescence-Labeled Antibodies Using Specific Dye Uptake of Cyclodextrins**  
(Graduate School of Science, Osaka Univ.<sup>1</sup>, Forefront Research Center, Graduate School of Science, Osaka Univ.<sup>2</sup>)  
**YAMAGUCHI, Hiroyasu<sup>1,2</sup>; IWAI, Yuma<sup>1</sup>**

蛍光分子を修飾した蛍光標識抗体は標的物質のセンシングやイメージングに広く用いられている。生体高分子である抗体への化学修飾は水系で行われるため、ピレンやペリレンといった拡張アリアル系を代表とする疎水性蛍光色素は水への溶解度が低いために適応が限られてきた。従来の手法では疎水性蛍光色素に対して PEG 化、スルホン化といった親水性部位の導入を行ってきた。しかし、親水性部位の導入は量子収率の低下といった蛍光色素の望まない性質改変を引き起こすことがあり、これを解決する手法の開発は重要である。本研究では、シクロデキストリン(CD)を用いて疎水性蛍光分子を水中に溶解させてから抗体に反応させることで、抗体の凝集を抑制しつつ、疎水性蛍光分子を効率良く抗体に修飾する方法論を構築した (Scheme 1)。

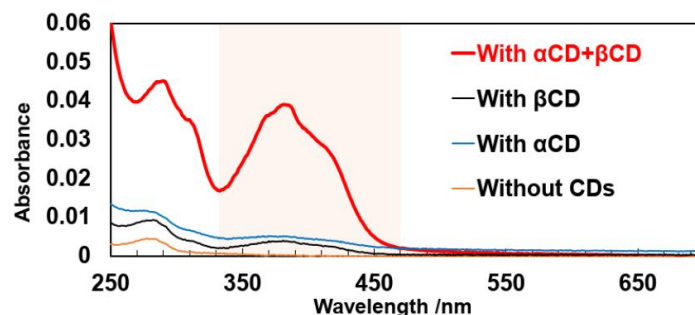
疎水性蛍光分子であるピレン誘導体 (PYB) はリン酸緩衝液 (PBS) 95%条件下で効率良く  $\beta$ CD と包接錯体を形成し、可溶化できることがわかった。また、その溶液の蛍光強度は大幅に増大した (Figure 1)。抗体へ PYB を修飾する際、 $\beta$ CD のみならず、環サイズの異なる  $\alpha$ CD と共存させることで飛躍的に抗体への化学修飾率が向上することを見出した (Figure 2)。PYB を修飾した抗体に対して、2-ヒドロキシプロピル- $\beta$ CD (2-HP- $\beta$ CD) を添加したときも、蛍光強度が強くなった。2-HP- $\beta$ CD 添加により PYB 修飾抗体における PYB の分子間会合が抑制されたことによりモノマー発光強度が増大したと考えられる。



**Scheme 1.** Modification of hydrophobic fluorescent molecules (alkynyl pyrene derivative, PYB) to antibodies via supramolecular complex formation with cyclodextrins (CDs).



**Figure 1.** PYB solubilized by addition of  $\beta$ CD and its increase in fluorescence intensity.



| Reaction condition           | Number of PYB molecules immobilized on a single antibody molecule |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Without CDs                  | 0                                                                 |
| With $\alpha$ CD             | 2.6                                                               |
| With $\beta$ CD              | 1.9                                                               |
| With $\alpha$ CD+ $\beta$ CD | 20                                                                |

**Figure 2.** Effective immobilization of PYB on antibodies by adding  $\alpha$  and  $\beta$  CDs.

## 細胞間情報伝達分子の捕捉による *Bacillus subtilis* のクオラムセンシング阻害効果

○赤塚夏芽<sup>1</sup>・牛島成実<sup>2</sup>・奈須野恵理<sup>2</sup>・加藤紀弘<sup>2</sup> (宇都宮大工<sup>1</sup>・宇都宮大院<sup>2</sup>)

**Inhibitory effect of quorum sensing by trapping intercellular signal in *Bacillus subtilis*** (School of Engineering, Utsunomiya Univ.,<sup>1</sup> Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya Univ.,<sup>2</sup>) AKATSUKA Natsume<sup>1</sup>; USHIJIMA Narumi<sup>1</sup>; NASUNO Eri<sup>1</sup>; KATO Norihiro<sup>1</sup>

*Bacillus subtilis* はグルコースの枯渇に伴い芽胞を形成する飢餓耐性に加え、環境ストレスにすみやかに応答する遺伝子発現調節機構を有する。細胞間情報伝達機構である Quorum Sensing (QS) は芽胞形成、プロテアーゼ生産、バイオサーファクタントである Surfactin の生産など多様な制御系に参与している。本研究では、ComA レギュレーターを介した ComQXPA 系 QS 機構 (Fig. 1) の人為的な抑制が QS 依存性の Surfactin 生産に及ぼす効果を試験した。*B. subtilis* NBRC 13719 株の ComQXPA 系 QS 機構は、10 アミノ酸残基の ComX ペプチド [ADPITRQW\*GD: \*farnesylation] が Autoinducer として細胞外に放出され、これが膜レセプター ComP に結合することで活性化される。ComP から ComA レギュレーターにリン酸基が転移し活性化されると、surfactin 合成酵素をコードする *srfA* オペロンの promoter と相互作用し、誘導された Surfactin 分子は菌体外へと輸送される。

本研究では細胞外で細胞間情報伝達分子である ComX を高分子担体に捕捉することで ComQXPA 系 QS の不活性状態を維持可能となるか調査した。ComX ペプチドの Trp 残基はファルネシル化されており疎水性が高いことから、ComX 捕捉担体として主に疎水性相互作用によりタンパク質、ペプチドに対し高い吸着能を有することが知られるニトロセルロース (NC) 膜を選択し、NC 膜の共存条件で振とう培養した NBRC 13719 株の Surfactin 生産を追跡した。

所定時間培養後の菌体から RNA を抽出し PrimeScript RT Reagent Kit を用いて cDNA を合成した。参照遺伝子を 16S rDNA とする STBR Green I を用いたリアルタイム PCR により、*comX* 及び *srfA* 発現量を追跡すると (Fig. 2)、培養 3 h、5 h において *comX* 発現量は NC 膜の添加の影響を受けていない。*B. subtilis* の *comQXPA* 系 QS は ComA レギュレーターにより活性化される feedback loop が存在しないため、*comX* の発現は環境因子により制御されている。*srfA* 発現量はどちらも共に 64~65%まで低下した。これらの結果は、細胞外に NC 膜を配置するだけで ComQXPA 系 QS が抑制されたことを示しており、ComX ペプチドの NC 膜への捕捉が示唆される。

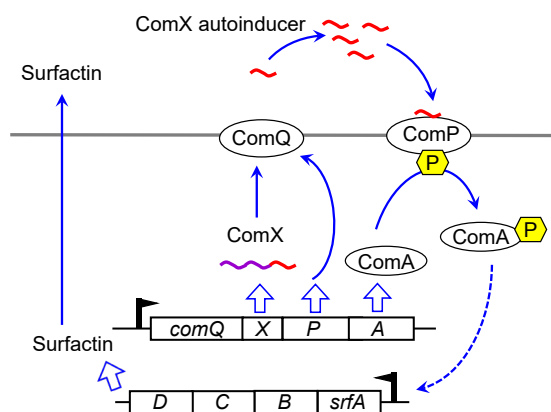


Fig. 1. The ComX quorum sensing in *B. subtilis*.

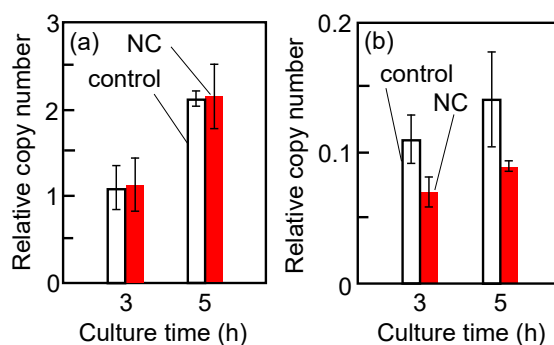


Fig. 2. Culture time dependence of relative copy number with or without the NC membrane during the culture. Three NC membranes (10 × 10 mm) were immersed at the start of culture (4 mL). (a) *comX*, (b) *srfA*.

## 臨床薬を用いたセロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 受容体の細胞種直交的な化学遺伝学的制御法の開発

○井上始・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

**Development of a chemogenetic method for orthogonal activation of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in a cell-type specific manner using clinical drugs** (Graduate School of Engineering, Nagoya University)

INOUE, Hajime; DOURA, Tomohiro; KIYONAKA, Shigeki

我々の脳は多種多様な神経細胞、グリア細胞が複雑に連関して神経回路を形成しており、精神疾患や神経変性疾患の新規治療法を開発するためには神経機能の詳細な解析が必要不可欠である。神経伝達物質を受け取る主要な受容体ファミリーとして G タンパク質共役型受容体 (GPCR) が存在する。神経機能を詳細に解析するためには特定神経細胞に発現している特定 GPCR を活性制御する手法が求められている。しかし、GPCR の多くは広範な脳領域に発現しており、投与された薬物はこれら全ての GPCR に作用してしまう。この課題を解決するために我々は extracellular-Loop Engineered Chemogenetics (eLEC) を提唱している。eLEC は、GPCR の活性化に重要だと考えられる 7 回膜貫通領域から離れた細胞外ループ (ECL) に変異を導入することにより、GPCR の神経伝達物質への応答性を損なうことなく合成リガンドへの応答性を制御する化学遺伝学的手法である。このような変異型受容体を特定神経細胞に発現させることにより、特定神経細胞に発現している GPCR を活性制御することが可能となるため、神経回路の詳細な解析に繋がると考えている。

今回我々は、eLEC を適用する GPCR として、統合失調症やうつ病をはじめとする多くの精神疾患の治療薬の標的となっているセロトニン 5-HT<sub>2A</sub> 受容体 (5-HT<sub>2A</sub>R) に着目した。5-HT<sub>2A</sub>R に対して eLEC を適用することで、セロトニンへの応答性を保持した変異型 5-HT<sub>2A</sub>R に対する臨床薬の作用を低下させることができると考えた。具体的には、5-HT<sub>2A</sub>R に対する臨床薬のサブタイプ選択性に着目し、5-HT<sub>2A</sub>R の ECL の一部を他のセロトニン受容体サブタイプのもので入れ替えた変異体を数種類作製した。この変異導入によりセロトニン応答を維持したまま 5-HT<sub>2A</sub>R に対する臨床薬の 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) を 10~100 倍高濃度シフトさせることに成功した。さらに、臨床薬及び変異型受容体を最適化することで、ある変異体に対しては阻害効果を示す一方で、別の変異体に対しては阻害効果が減弱するような変異体と臨床薬の直交的なペアを取得することに成功した。また、臨床薬の結合様式の違いに着目することにより、変異体間での直交性を高めることに成功した。このような臨床薬と変異体の直交的なペアを用いることにより、特定神経細胞に発現している 5-HT<sub>2A</sub>R を自在に活性制御できる手法になると考えている。本発表では異なる変異体を発現させた様々な細胞に対する臨床薬の投与による細胞間での直交的な 5-HT<sub>2A</sub>R の活性制御について報告する。

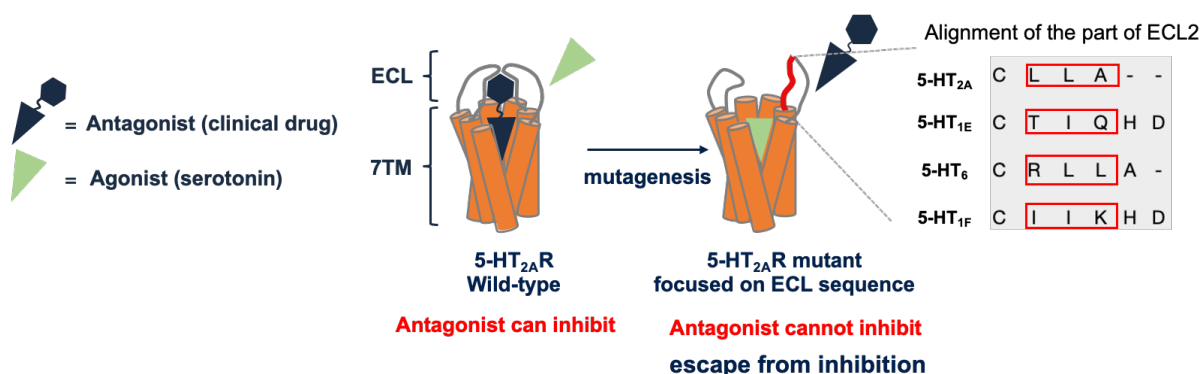


Fig1. Concept of escape from inhibition of clinical drugs to 5-HT<sub>2A</sub>Rs



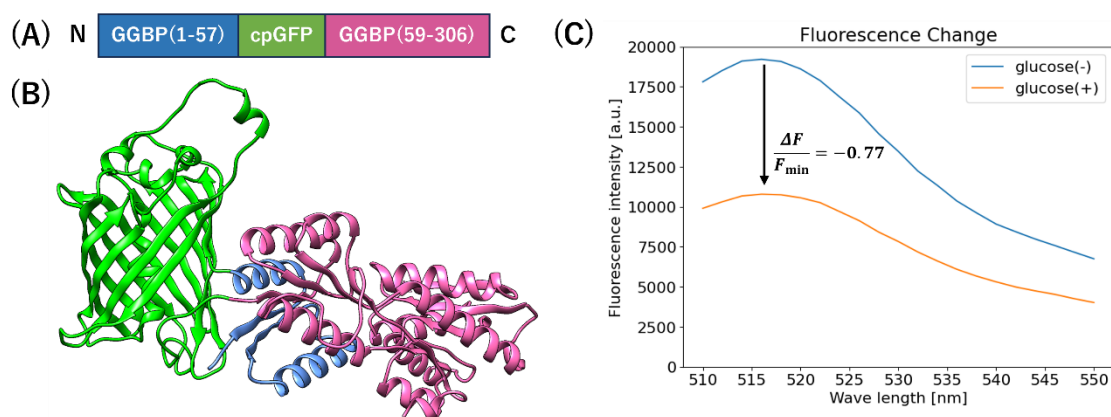
## 単一蛍光タンパク質を用いた新規グルコースセンサーの開発

○玉川建和・針尾紗彩・寺井琢也・Robert E. Campbell（東大院理）

**Development of a novel single fluorescent protein-based glucose biosensor.** (Graduate School of Science, Univ. Tokyo) TAMAGAWA, Kenwa; HARIO, Saaya; TERA, Takuya; CAMPBELL, Robert E.

グルコースは生体内におけるエネルギー源として最も重要な代謝物であり、生体内のグルコース濃度異常は種々の疾病の原因となる。<sup>1</sup>特に血中グルコース濃度は、糖尿病のマーカーとして利用可能であることから、血中グルコース濃度の測定装置が盛んに開発されてきた。<sup>2</sup>その一方で、細胞内でのグルコース濃度の経時的変化を測定するためのバイオセンサーは未だ例が少ないうえ、既存のセンサーは蛍光強度の変化が十分とは言えず、性能面で改善の余地が残されている。<sup>3</sup>

そこで本研究では、大腸菌由来のグルコース結合タンパク質(GGBP: glucose-galactose binding protein)に円順列変異を施した緑色蛍光タンパク質(cpGFP: circular permuted green fluorescent protein)を挿入することで、高性能なグルコースセンサーの開発を目指した。このタイプのセンサーは既に報告があるが、挿入部位の探索やタンパク質の最適化は十分には行われていない。<sup>4</sup>挿入位置については、GGBPのグルコース結合状態と非結合状態の結晶構造及び、分子動力学シミュレーション(MD)によって再現されたそれらの溶液中での構造をもとに、グルコース結合状態と非結合状態で最も二面角の変化の大きい部位を試した。その結果、GGBPのA58の部位にcpGFPを挿入したときに、グルコース存在下と非存在下における蛍光強度の変化が最も大きいことが見出された(Figure)。この挿入部位は、グルコース結合部位からは離れた位置にあり、先行研究では報告されていない部位である。しかしながら、グルコースに対する解離定数が3.5  $\mu\text{M}$ と、生体内グルコース濃度(0.1mM から数 mM)<sup>5</sup>に比べて低いため、親和性調節の必要性が示唆された。現在、この変異体を雛型としてcpGFPとGGBPを繋ぐリンカー部分を最適化した後、全体にランダムな変異を導入する指向性進化実験を繰り返すことで、より高性能なセンサーの開発を行っている。当日の発表ではその結果について報告するとともに、MDによって計算された溶液中での振る舞いをもとにセンサーの動作原理についても議論する。



**Figure.** (A): The insertion site of cpGFP for the most promising variant. (B): Predicted structure of the most promising variant by AlphaFold2. (C): The Fluorescence intensity change between presence and absence of 100 mM of glucose. Excitation wavelength is 470 nm.

**References** [1] Jahreis, K. *et al.* *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 891–907 (2008) [2] Rodbard, D., *Diabetes Technol. Ther.*, **18**(2), 3-13 (2016) [3] Keller, J. P. *et al.*, *Cell Rep.*, **35**, 109284 (2021) [4] Hu, H. *et al.*, *RSC Adv.*, **8**, 2485 (2017); Mita, M. *et al.*, *Anal. Chem.*, **91**, 4821-4830 (2019); Mita, M. *et al.*, *Cell Chem. Biol.*, **29**, 98-108 (2022) [5] Fehr, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **278**(21), 19127-19133 (2003)



## ヒドロキシ化合物による励起状態分子間プロトン移動反応の制御

○黄 楽耘<sup>1</sup>・西村 賢宣<sup>1</sup> (<sup>1</sup>筑波大院)

**The control of hydroxy compounds on the excited-state intermolecular proton transfer reaction** (Graduate School of Pure and Applied Science, University of Tsukuba<sup>1</sup>), Leyun HUANG<sup>1</sup>; Yoshinobu NISHIMURA<sup>1</sup>

我々はピレンーウレア誘導体と酢酸アニオンを用いて励起状態分子間プロトン移動 (ESPT) 反応を調べた。基底状態においてウレア化合物とアセテートアニオンが水素結合を形成し、会合体を生成する。その平衡システムにウレア基より酸性度が強いヒドロキシ基を持つ化合物を添加すると、ヒドロキシ基はウレア基より優先的にアセテートアニオンと結合し、会合体が解離して、フリー体に戻ることが予想される。このように、会合体の生成に対する抑制効果があるため、ESPT 反応が起こる反応系にヒドロキシ化合物を添加することによって、会合体及び互変異性体の生成が抑制されると考えられる。その結果、会合体の生成を阻害する能力が異なるヒドロキシ化合物を ESPT 反応が起こる反応系に添加すると、蛍光色の変化が期待される。本研究では、シクロデキストリン、糖類とエタノールを用いて、ESPT 反応に対するヒドロキシ基の影響を検討した。

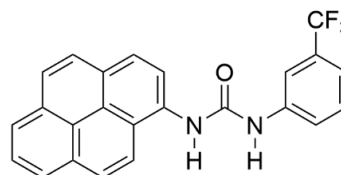


Fig. 1. The structure of *m*-CF<sub>3</sub>-1PUP.

DMSO と DMF 中において、*m*-CF<sub>3</sub>-1PUP—酢酸アニオン系 (Fig. 1) にヒドロキシ化合物を添加したところ、蛍光スペクトルと蛍光減衰曲線に溶媒依存性があることを見出した。この現象は、DMSO と DMF 中でのヒドロキシ化合物と会合体(N)との相互作用の違いを反映している。DMSO、ウレア化合物、酢酸アニオン間の相互作用は比較的強いいため、ヒドロキシ化合物の効果を調べる時に、ヒドロキシ基の効果が弱まる可能性があるため、本研究では溶媒として DMF を選択した<sup>1</sup>。DMF 中で *m*-CF<sub>3</sub>-1PUP—酢酸アニオン系にヒドロキシ化合物を添加したところ、蛍光スペクトルと蛍光減衰曲線に違いが見られた。この現象は、DMF 中でのヒドロキシ化合物と会合体の相互作用が異なることを示している。

蛍光スペクトルでは、 $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、フルクトース、グルコース、エタノールを添加した場合、これらのヒドロキシ化合物の濃度に応じて、400 nm 付近の蛍光強度が増加し、500 nm 付近の蛍光強度が減少した。これは、これらのヒドロキシ化合物が会合体の生成を抑制したためであると考えられる。しかし、リキソースとアラビノースの添加後の蛍光スペクトルには、400 nm と 500 nm 付近の蛍光強度の変化はほとんど見られなかった。また、これらのヒドロキシ化合物の中でも、エタノールは最も酸性度が高いにもかかわらず、 $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、フルクトース、グルコース添加後に比べて顕著な蛍光変化が観測されなかった。このことから、ヒドロキシ化合物の酸性度以外の要因も ESPT 反応の抑制効果に影響を与えている可能性を示している。

蛍光スペクトルと蛍光寿命の結果は、同じ濃度のヒドロキシ基にもかかわらず、 $\alpha$ -CD と  $\beta$ -CD の添加後に最も顕著な抑制効果が現れることを示している。さらに、エタノール、フルクトース、グルコースの添加は中程度の抑制効果をもたらすが、リキソースとアラビノースは ESPT 反応に対する抑制効果をほとんど示さなかった。本研究では、酢酸アニオンとの相互作用におけるシクロデキストリンと糖類の違いに着目し、シクロデキストリンによる抑制のスキームを提案した。

1. Huang, L. *et al.*, J. Mol. Liq. 2024, 398, 124268.

## An efficient affinity maturation method for antibody-like proteins by using CRISPR/dCas9 system

Yan MingYao<sup>1</sup>; Matsuo Ryusei<sup>2</sup>; FUJINO, Tomoshige<sup>1</sup>; HAYASHI, Gosuke<sup>1</sup>; MURAKAMI, Hiroshi<sup>1,2</sup>  
(Graduate School of Engineering, Nagoya University<sup>1</sup>, Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University<sup>2</sup>)

Affinity maturation technique is used to optimize antibody-like proteins or peptide molecules against the target proteins. In our previous studies, we performed affinity maturation of SARS-CoV-2-neutralizing monobodies developed by TRAP display [1,2]. Through the affinity maturation, the  $K_D$  value of our monobody C4 against SARS-CoV-2 RBD (Wuhan) was improved from 0.96 nM to less than 0.01 nM, and the IC50 value was also improved from 6.6 nM to less than 0.046 nM.

Generally, in the affinity maturation, we usually need to prepare four multiple-site saturation mutagenesis libraries for each candidate because of the library diversity maximum limitation (the number of random residues needed to be limited to seven for covering all possible sequences). Then, we need to perform the selection one-by-one for each library. Although affinity maturation had allowed us to obtain high-affinity monobodies in the end, this is a time-consuming step. For example, if we have 9 candidates, we prepare  $9 \times 4 = 36$  libraries. Since one selection takes six rounds and we have to perform the selection separately, we need to do  $36 \times 6 = 216$  rounds of selections in total.

A simple solution to this inconvenience is to mix all the libraries. However, once one of the mixed library sequences dominates during selection, the sequence information of other libraries is wiped out. In this study, we developed a method to selectively pull down one library from mixed libraries through the CRISPR/dCas9 system. By adding different DNA barcodes to each library, one specific library is pulled down using CRISPR/dCas9 containing the gRNA corresponding to the 72 kinds of DNA barcodes. For demonstration, we added two of them to the target and non-target DNA fragments, respectively. We successfully concentrated the target DNA from the ratio (target DNA: non-target DNA = 1:100) to the ratio (target DNA: non-target DNA = 2:1). Additionally, we confirmed the orthogonality between 72 DNA barcodes. This will significantly facilitate the development of monobodies with high affinity and functions.

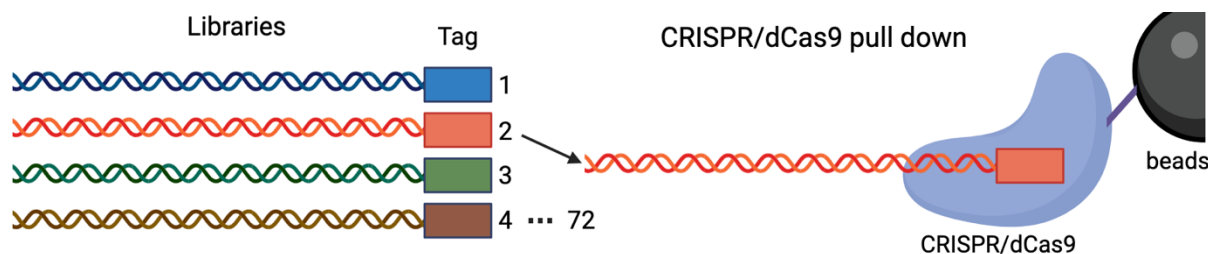


Figure 1. The strategy of accelerating affinity maturation selection by CRISPR/dCas9

[1] Kondo, T., *Sci. Adv.*, **2020**, 6(42), eabd3916.

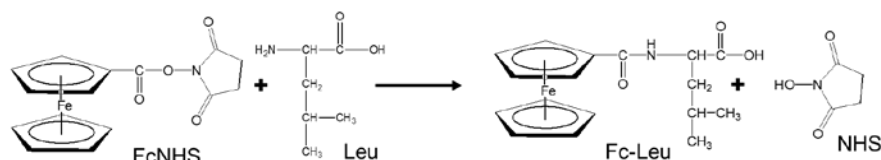
[2] Kondo, T., *Life Sci. Alliance*, **2022**, 5, 6, e202101322.

## ロイシン・イソロイシンのラベル化反応と HPLC 電気化学分析の迅速化

○横山 憲二<sup>1</sup>・丹羽 史佳<sup>1</sup>・上原 亜久理<sup>1</sup>・上村 英大<sup>1</sup> (<sup>1</sup>東京工科大応用生物)

**Rapid HPLC electrochemical detection of labelled leucine and isoleucine** (School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology<sup>1</sup>) YOKOYAMA, Kenji<sup>1</sup>; Niwa, Fumika<sup>1</sup>; UEHARA, Akuri<sup>1</sup>; KAMIMURA, Eito<sup>1</sup>

【緒言】アミノ酸の分析には、一般的に HPLC 分析法が用いられる。しかし、ロイシン (Leu) やイソロイシン (Ile) などの分岐鎖アミノ酸を高感度で分析するには、蛍光物質や電気化学活性種でラベル化する必要がある。演者らはこれまでに高い電気化学活性と酸化還元安定性を有するフェロセンカルボン酸-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル (FcNHS) を用いて、アミノ基をラベル化し、電気化学検出器を用いた逆相 HPLC 分析を行ってきた。しかし、フェロセンラベル化 Leu (Fc-Leu) と Fc-Ile を分離するには、長い溶出時間が必要であった。そこで本研究では、移動相の pH を最適化することにより、Fc-Leu、Fc-Ile の溶出時間に差を出し、HPLC 分析の迅速化を図ることを目的とした。



【実験方法】Leu または Ile 溶液 (リン酸緩衝溶液 pH8.7) と FcNHS のジメチルスルホキシド溶液を混合し、50°C、60 分間ラベル化反応を行った。反応停止剤には *n*-ブチルアミンを使用した。次に得られた Fc-Leu、Fc-Ile を C18 逆相 HPLC で分析した。移動相の緩衝溶液とアセトニトリルの比は 70:30 (V/V) とし、緩衝溶液には 0.1 M リン酸緩衝液、0.1 M 酢酸緩衝液を適宜、用いた。検出器には、UV 検出器 263 nm、電気化学検出器 ECD1 (上流) 300 mV vs Pd、ECD2 (下流) -400 mV vs Pd を用いた。

【結果と考察】移動相に pH2.0 リン酸緩衝溶液を用いたところ、Fc-Leu、Fc-Ile の溶出時間は、それぞれ 35.1 分、33.4 分であった。溶出時間を短縮するには、移動相のアセトニトリル濃度を上げることが最も簡単である。しかし、単純にアセトニトリル濃度を上げると、Fc-Leu と Fc-Ile のピークを分離できないことがわかった。

そこで、移動相の pH を上げ、カルボキシル基の解離を利用して、溶出時間の短縮を試みた。その結果、Fc-Leu、Fc-Ile ともに、移動相の pH が高くなると溶出時間が短縮されることが確認された。また測定した全ての pH 領域 (pH2.0~8.0) で、Fc-Leu と Fc-Ile のピークを分離することができた。特に pH3.5~5.0 の間では、溶出時間が大きく変化した。カルボキシル基の pKa 付近の pH であると考えられる。またこの pH 領域では、Fc-Leu、Fc-Ile の溶出時間の差が大きく見られた。

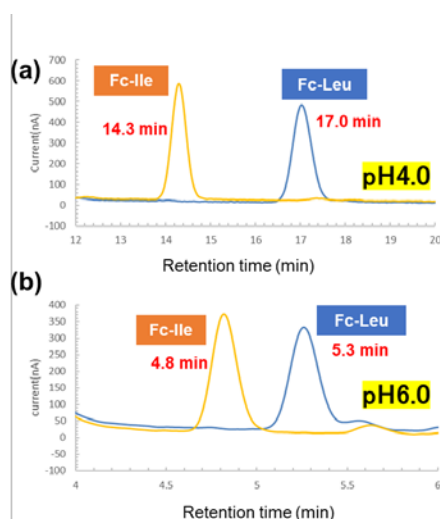


Fig. 1 Chromatogram of Fc-labelled branched chain amino acids  
Mobile phase: (a) 0.1 M acetate buffer pH4.0, (b) 0.1 M phosphate buffer pH6.0, buffer / acetonitrile = 70 / 30  
Flow rate 1.0 mL/min, ECD2: -400 mV vs Pd

## ジペプチドライブラリーを用いた疾患特異的酵素活性の探索と超偏極分子イメージングへの応用

○有村恵維<sup>1</sup>・Abdelazim Elsayed Elhelaly<sup>2</sup>・明田悠希<sup>1</sup>・兵藤文紀<sup>2</sup>・松尾政之<sup>2</sup>・大澤毅<sup>1</sup>・小松徹<sup>3</sup>・浦野泰照<sup>3,4</sup>・齋藤雄太朗<sup>1</sup>・山東信介<sup>1</sup>(東大院工<sup>1</sup>・岐阜大医<sup>2</sup>・東大院薬<sup>3</sup>・東大院医<sup>4</sup>)

**Exploration of disease-specific enzyme activity using dipeptide library and its application to hyperpolarized molecular imaging** (Graduate School of Engineering, Tokyo Univ.<sup>1</sup>, School of Medicine, Gifu Univ.<sup>2</sup>, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo Univ.<sup>3</sup>, Graduate School of Medicine, Tokyo Univ.<sup>4</sup>) ARIMURA Kei<sup>1</sup>, Abdelazim Elsayed Elhelaly<sup>2</sup>, AKETA Yuki<sup>1</sup>, HYODO Fuminori<sup>2</sup>, MATSUO Masayuki<sup>2</sup>, OSAWA Tsuyoshi<sup>1</sup>, KOMATSU Toru<sup>3</sup>, URANO Yasuteru<sup>3,4</sup>, SAITO Yutaro<sup>1</sup>, SANDO Shinsuke<sup>1</sup>

生体内代謝反応は多数の酵素によって駆動されており、疾患の発生及び進行における特定の酵素活性異常が複数例報告されている。疾患特異的な酵素活性を分子プローブによって検出することで、疾患の診断が可能になる。これまでに分子プローブ開発戦略として、蛍光分子プローブライブラリーを用いて新たな疾患特異的反応を探索する手法が報告されている<sup>1)</sup>。このようなスクリーニングアプローチは、未知の疾患メカニズムの解明及びイメージングを可能にするため、高精度な診断や創薬への貢献が期待される。

近年、非侵襲的な生体内代謝反応の画像化技術は、早期診断や治療後診断応用への需要が高まっている。そこで非侵襲的なイメージング手法である動的核偏極-核磁気共鳴 (DNP-MRI) 分子プローブにスクリーニングアプローチを適用し、高精度な非侵襲的診断方法の実現を目指す。DNP-MRI は <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N などの安定同位体で標識された分子プローブの核スピンに安定ラジカル由来電子スピンの高い偏極率を移し、一時的に NMR/MRI シグナルを数千〜1 万倍に高感度化する技術である<sup>2)</sup>。高感度化された分子プローブを生体内に投与すると、分子プローブ及びプローブ代謝物のシグナルが MRI を用いて観測され、リアルタイムで分子反応を追跡することが可能である。しかし DNP-MRI 分子プローブを開発する上での課題として、標的とする既知の疾患特異的反応の乏しさと、DNP-MRI 分子自体が生体内で機能する要件の多さがあり、*in vivo* イメージングに成功した分子はごく限られている。

本研究では、ジペプチドライブラリーを用いて疾患特異的な代謝反応を見出し、DNP-MRI 分子イメージングへと応用することを目指した。標的酵素群であるペプチダーゼ類は複数の疾患関連性が報告されており、生体内ペプチダーゼ活性を検出する DNP-MRI 分子プローブの設計基盤は当研究室の先行例として構築されているため<sup>3,4)</sup>、有望な標的であると言える。構築したライブラリーを用いて急性腎障害 (AKI) モデルマウス及び健常マウスの腎臓破碎液中での代謝反応を追跡したところ、N 末端に特定のアミノ酸残基を持つジペプチドは健常モデルと疾患モデルの間で異なる代謝率を示すことが分かった。そこで DNP-MRI 分子プローブとして生体内で機能しやすい分子構造として Xaa-[1-<sup>13</sup>C]Gly を設計した。また、責任酵素を同定するため、2 次元電気泳動と Peptide Mass Fingerprint 解析を組み合わせた DEG アッセイ<sup>5)</sup>により、Xaa-[1-<sup>13</sup>C]Gly の代謝に大きく関与する酵素を探索した。さらに、AKI モデルマウスと健常マウスにそれぞれ DNP 法により高感度化した分子プローブを用いて代謝解析を行ったところ、AKI モデルマウスにおいてプローブ代謝率が有意に減少していることが示された。

1) Y. Kuriki *et al.*, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 4474-4481.

2) J. H. Ardenkjær-Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 10158-10163.

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

4) Y. Kondo *et al.* *ChemRxiv* **2022**, DOI: 10.26434/chemrxiv-2022-tfkk1.

5) T. Komastu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6002-6005.

## ファージ提示法によって得られたペプチドを修飾したシリカ微粒子 による SARS-CoV-2 検出法の開発

○森村和花葉<sup>1</sup>・川井麻那歌<sup>1</sup>・鈴木寧々<sup>1</sup>・佐藤智典<sup>1</sup>・松原輝彦<sup>1</sup> (<sup>1</sup>慶應義塾大学理工学部)

**Detection of SARS-CoV-2 using silica microparticles modified with peptides obtained by phage display selection** (Dep. of Science and Technology, Keio University<sup>1</sup>) MORIMURA Wakaba<sup>1</sup>; KAWAI Manaka<sup>1</sup>; SUZUKI Nene<sup>1</sup>; SATO Toshinori<sup>1</sup>; MATSUBARA Teruhiko<sup>1</sup>

2019年に発見され、全世界に感染拡大したCOVID-19 (coronavirus disease 2019) は、SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) を原因ウイルスとする感染症である。2024年にWHOによって国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態に該当しないことが宣言されたが、SARS-CoV-2の新たな変異体が免疫を回避する可能性が示されており、まだ注視する必要がある。ウイルス感染症を抑えるためには、迅速で簡便、正確な検出法の開発が重要である。しかし現在一般的に用いられているPCR法やイムノクロマト法には、それぞれ時間がかかるもしくは高価な抗体を用いるといった欠点がある。そこで、本研究ではより迅速で簡便な検出方法として、ペプチド修飾シリカ微粒子を用いた検出法を開発した。

これまでに当研究室では、ファージ提示法を用いてSARS-CoV-2の膜表面に存在するスパイク糖タンパク質のS1サブユニットに結合するペプチド配列の探索を行い、15残基のペプチドC1R4-06を獲得した。C1R4-06のS1への結合活性を評価したところ $K_d$ 値が10.4  $\mu$ Mであり、さらにSARS-CoV-2シールドタイプウイルス (ppSARS-CoV-2) の細胞への感染阻害能を有することが分かった。また、我々はこれまで、糖鎖やペプチドを修飾した微粒子を用いることで、インフルエンザウイルスと微粒子の相互作用を目視で確認することのできる簡便な検出法を開発してきた。特に、シリカ微粒子を用いることで、ポリスチレン微粒子を用いた先行研究より迅速に検出できることから、本研究ではS1結合性ペプチドを修飾したシリカ微粒子を用いて、迅速で簡便なppSARS-CoV-2の検出法の開発を目指した (Fig. 1)。

まず、アジド基を導入したC1R4-06を合成した。アミノ基提示シリカ微粒子に縮合反応でリンカーを修飾し、クリック反応によってC1R4-06を結合させた。作製したC1R4-06提示シリカ微粒子とppSARS-CoV-2を丸底96 wellプレート上で混合し、凝集を目視で判別することで検出を行った。C1R4-06提示シリカ微粒子はppSARS-CoV-2を高い感度で、かつ10分という短時間で検出することができた。また、C1R4-06の15残基のうち、S1への結合の寄与の大きい残基を含む、8残基のペプチドで検出することを試みている。

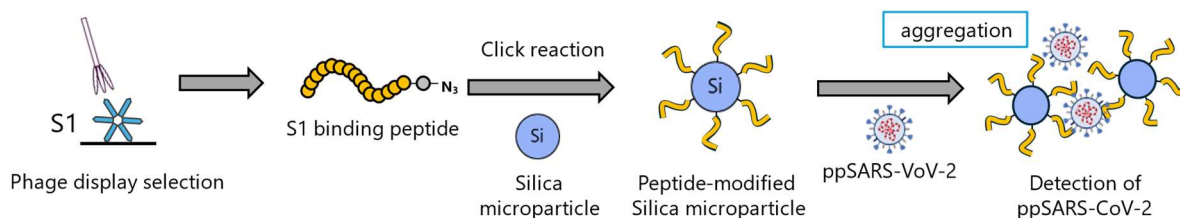


Fig. 1 本実験の概要. ファージ提示法により獲得した S1 結合性ペプチドをシリカ微粒子に修飾し、微粒子と ppSARS-CoV-2 との凝集反応を目視で判別することで検出する。



## 低分子抗体と 4 量体酵素の融合による 4 価抗体酵素複合体の開発と電気化学イムノセンシングへの応用

織田美帆<sup>1</sup>・〇徐千茗<sup>2</sup>・平賀健太郎<sup>3</sup>・早出広司<sup>4</sup>・津川若子<sup>1</sup>・池袋一典<sup>1</sup>・浅野竜太郎<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>農工大院工、<sup>2</sup>農工大工、<sup>3</sup>自然機構 ExCELLS、<sup>4</sup>UNC/NCSU 共同生命医工 )

**Development of tetravalent antibody-enzyme complexes by the fusion of antibody fragments and a tetrameric enzyme and the application to electrochemical immunosensing** (Graduate School of Engineering, Tokyo Univ. Agric. Technol.<sup>1</sup>, Department of Engineering, Tokyo Univ. Agric. Technol.<sup>2</sup>, ExCELLS<sup>3</sup>, Joint Dept. of Biomed. Eng., The Univ. of North Carolina at Chapel Hill and North Carolina State Univ.<sup>4</sup>) ODA, Miho<sup>1</sup>; XU, Qianming<sup>2</sup>; HIRAKA, Kentaro<sup>3</sup>; SODE, Koji<sup>4</sup>; TSUGAWA, Wakako<sup>1</sup>; IKEBUKURO, Kazunori<sup>1</sup>; ASANO, Ryutaro<sup>1</sup>

抗体酵素複合体は、抗体による分子認識能と酵素による触媒活性を併せ持つ分子認識素子である。我々の研究室では電気化学イムノセンシングへの応用を目指し、電極応答可能な酸化還元酵素と低分子抗体を融合した分子認識素子の開発を進めてきた。これまでに、グルコース脱水素酵素 (GDH) とラクダ科由来の単ドメイン抗体 (VHH) を融合した VHH-GDH を作製し、ヒト上皮成長因子受容体 (EGFR) の検出を試みてきたが、EGFR に対する親和性が低く検出を行うことができなかった。そこで本研究では、抗体の多価化による親和性の向上を指向し、ホモ 4 量体を形成する乳酸酸化酵素 (LOx) に着目し、LOx と VHH の融合による 4 価のイムノセンシング素子の構築プラットフォームの開発を目指した。抗体は N 末端周辺に抗原認識部位を持つため、N 末端への酵素の融合は抗体の結合能への影響が懸念される。そこで、抗体の C 末端に LOx を融合することで、LOx の多量体化に伴う、4 価の抗体酵素複合体の形成を期待した (図 1)。

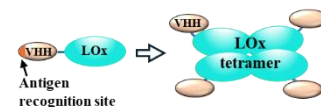


図 1 4 価抗体酵素複合体の作製

我々は、これまでに酸素との反応性を低下させ<sup>1,2</sup>、さらに熱安定性を向上させた *Aerococcus viridans* 由来の LOx 変異体の取得に成功している。この LOx 変異体の N 末端に抗 EGFR VHH の C 末端を融合させた VHH-LOx の発現ベクターを構築し、大腸菌による組換え生産を行った。その後、金属イオン固定化アフィニティクロマトグラフィー及び、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGE 解析を行った結果、均一な VHH-LOx 分子の調製が確認された。続いて、フローサイトメトリーによる抗原結合能及び、PMS/DCIP を電子受容体に用いた脱水素酵素活性の評価を行った結果、抗体の結合能及び酵素活性を維持していることが確認された。最後に、LOx 活性を指標とした血清中 EGFR の電気化学検出を行った。磁気ビーズ上に抗 EGFR IgG 抗体を固定し、VHH-LOx と EGFR の複合体を形成させた後に、磁石を用いて電極上に誘引し、乳酸添加時の酸化還元反応に基づく電気化学的検出を行った (図 2)。その結果、EGFR 濃度依存的なシグナル変化が確認され、1 価の抗体酵素複合体である VHH-GDH では検出できなかった EGFR を、4 価の VHH-LOx を用いることで検出することができた。現在は、汎用性を検証するため、ウイルス検出に向けた、ウイルス表面のタンパク質を標的とする VHH と LOx の融合を進めている。

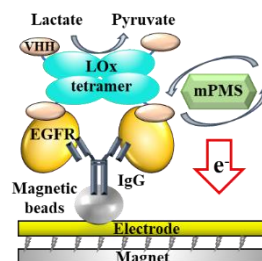


図 2 EGFR の電気化学検出

1 K. Hiraka *et al.*, Biosens. Bioelectron. 103, 163-170 (2018)

2 K. Hiraka *et al.*, Biosens. Bioelectron. 151, 111974 (2020)

## 電位依存性カリウムチャネル阻害剤を用いた N2a アッセイにおけるシガトキシンの高感度検出

横関俊昭<sup>1,2</sup>・川畑まどか<sup>1</sup>・藤田和弘<sup>2</sup>・平間正博<sup>1</sup>・〇円谷 健<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大阪公立大学院理、<sup>2</sup>日本食品分析センター研究開発部)

**Sensitive detection of ciguatoxins using a neuroblastoma cell-based assay with voltage-gated potassium channel inhibitors** (Graduate School of Science, Osaka Metropolitan Univ.<sup>1</sup>, Department of Research & Development, Japan Food Research Laboratories<sup>2</sup>) YOKOZEKI, Toshiaki<sup>1,2</sup>; KAWABATA, Madoka<sup>1</sup>; FUJITA, Kazuhiro<sup>2</sup>; HIRAMA, Masahiro<sup>1</sup>; TSUMURAYA, Takeshi<sup>1</sup>

シガテラは、年間 5 万人以上の罹患が推定される世界最大規模の自然毒食中毒である。原因毒素シガトキシン (CTX) は有毒渦鞭毛藻によって産生され、食物連鎖を介して多種の魚類へ移行、蓄積する。CTX は超微量で毒性を示し、魚の味や外見からその有無を判別できないことから、予防策として微量検出法の開発が望まれている。特に、CTX には多数の類縁体が存在するため、これらを同時に検出できる方法が重要となる。CTX は主に、電位依存性ナトリウムチャネル (Nav チャネル) に特異的に結合して開口させ、細胞を持続的に脱分極させることにより毒性を発揮すると考えられる。マウス神経芽腫細胞 (N2a 細胞) に対する CTX の毒性を利用した N2a アッセイは、CTX 同族体を一斉検出できることから微量検出法として有望であるが<sup>1</sup>、アッセイの普及のためにさらなる高感度化が求められている。近年、CTX は電位依存性カリウムチャネル (Kv チャネル) を阻害し、Nav チャネルへの作用と同様に細胞を脱分極させることから、Kv チャネルも毒性発現に寄与する可能性が明らかになった。したがって、Kv チャネル阻害剤を用いて細胞の脱分極の程度を高めることによって、CTX の N2a 細胞に対する感受性が高まることが期待される。そこで本研究では、従来の N2a アッセイに Kv チャネル阻害剤を加えることを検討し、N2a アッセイのさらなる高感度化を目指した。

Kv チャネル阻害剤として、CTX が阻害する一過性カリウム電流および遅延整流性カリウム電流を阻害するために、それぞれ 4-アミノピリジン (4-AP)、テトラエチルアンモニウム (TEA) を選択した。まず初めに、Kv チャネル阻害剤が引き起こす細胞死を最小限に留めるため、4-AP 単独、TEA 単独、4-AP と TEA 混合条件 (4-AP/TEA) における 100%細胞生存率、80%細胞生存率を与える濃度 (低濃度条件および高濃度条件) を決定した。また、従来の N2a アッセイで使われている、N2a 細胞の CTX に対する感受性を高める試薬 (ウアバイン:O/ベラトリジン:V) の、Kv チャネル阻害剤と併用した場合の最適濃度を決定した。O/V をこれらの Kv チャネル阻害剤と併用しても相乗的な毒性の増強は確認されなかったため、O/V の最適濃度は従来法と同じ O/V=31.25/3.125  $\mu$ M と決定した。最後に、最適化した低濃度条件および高濃度条件で、O/V のみ (従来法)、O/V+4-AP、O/V+TEA、O/V+4-AP/TEA における 6 種類の CTX 同族体に対する N2a アッセイを行い、得られた用量反応曲線からそれぞれの条件における EC<sub>50</sub> を算出した。その結果、低濃度条件では O/V のみ (従来法) と比較して検出感度の向上は認められなかったが、高濃度条件では従来法よりも明確な EC<sub>50</sub> の低下が認められた。最も EC<sub>50</sub> が低下した O/V+4-AP/TEA 条件では、従来法と比べて約 4 倍も N2a アッセイを高感度化することに成功した。本手法が実用化できれば、アッセイに供する魚肉抽出サンプルの精製を簡略化できると考えられ、シガテラ発生地域における水産資源の安全性の向上、さらにはシガテラの予防策となり得ることが期待される。また、本研究で得られた結果は、Kv チャネルの阻害が CTX の毒性を増強することを細胞レベルではじめて明らかにしたものであり、今後 CTX の毒性発現機構解明の足がかりとなる可能性がある。

1. Yokozeki, T., Hama, Y., Fujita, K., Igarashi, T., Hirama, M., Tsumuraya, T. Evaluation of relative potency of calibrated ciguatoxin congeners by near-infrared fluorescent receptor binding and neuroblastoma cell-based assays, Toxicon 230, 107161 (2023).

## ATP センサー蛍光タンパク質 QUEEN と白金ポルフィリンの発光 寿命測定による細胞内 ATP・酸素濃度デュアルイメージング

○藤原 優也・尾台 俊亮・伊藤 栄紘・蒲池 利章（東工大生命理工）

**Dual imaging of intracellular ATP and oxygen concentrations by measuring the emission lifetime of the ATP-sensing fluorescent protein QUEEN and platinum porphyrin** (Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) FUJIHARA, Yuya; ODAI, Shunsuke, ITO, Hidehiro, KAMACHI, Toshiaki

生体のエネルギー物質である ATP は、主にミトコンドリアでの酸化的リン酸化により酸素消費を伴って産生される。一方で、がん細胞など一部の細胞は、好氣的条件下においても ATP 産生を解糖系に依存することが知られている<sup>1</sup>。このように ATP と酸素は細胞内で複雑に関わっているため、これら分子の細胞内濃度分布を同時に測定する方法が求められている。

当研究室では、リン光寿命イメージング顕微鏡(PLIM)による細胞内酸素濃度イメージングに取り組んでいる<sup>2</sup>。励起三重項状態のリン光性色素は、酸素によって消光されるため、リン光寿命から酸素濃度を測定することが可能である。当研究室の顕微鏡システムでは蛍光とリン光を寿命の違いにより分離して解析することが可能である。そこで、蛍光性 ATP センサーと PLIM による細胞内酸素濃度イメージングを組み合わせた細胞内 ATP・酸素濃度デュアルイメージングを構想した。

柳沼秀幸先生らが開発した QUEEN は、 $F_0F_1$ -ATPase の  $\epsilon$  subunit と cpEGFP を組み合わせた ATP センサー蛍光タンパク質である<sup>3</sup>。37 °Cでの ATP 濃度測定に最適化された QUEEN-37C は、ATP 非結合時は 494 nm、ATP 結合時は 400 nm が最適励起波長であるため、両励起波長の発光強度比から細胞内 ATP 濃度を測定することができる<sup>4</sup>。QUEEN と同様の原理を利用したグルコースセンサー蛍光タンパク質 iGlucoSnFR-TS では蛍光寿命イメージング顕微鏡(FILIM)による細胞内グルコース濃度イメージングが報告されている<sup>5</sup>。これらの知見から QUEEN も蛍光寿命測定による ATP 濃度イメージングが可能であると考えた。本研究では、リン光性白金ポルフィリンの PtTCPP で染色した QUEEN 発現細胞の蛍光寿命とリン光寿命を測定することにより、細胞内の ATP 濃度と酸素濃度の同時イメージングを目指す。

大腸菌で発現させた組換え QUEEN-37C の蛍光寿命を測定したところ、予想通り ATP 濃度に応答して蛍光寿命が変化した。PtTCPP で染色した QUEEN-37C 発現 HeLa 細胞(HL-Q37C-701G7)の気相酸素濃度 20%, 1%における FLIM/PLIM の同時測定の結果を右図に示す。同視野の細胞内で QUEEN-37C の蛍光寿命と PtTCPP のリン光寿命の同時測定に成功し、細胞内 ATP・酸素濃度デュアルイメージングが達成できた。さらに、薬剤添加に対する細胞内 ATP・酸素濃度動態について報告する。

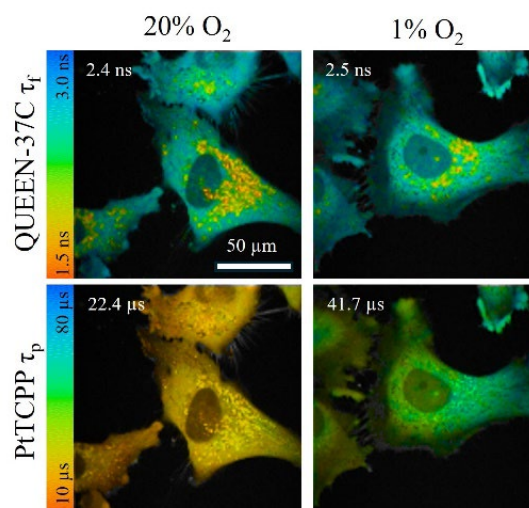


Figure Fluorescence and phosphorescence lifetime images of HL-Q37C-701G7 staining PtTCPP excited at 405 nm. Insert numbers are mean emission lifetime inside cells in the image.

<sup>1</sup> O. Warburg, *Science* 124, 269-270 (1956.)

<sup>2</sup> H. Kurokawa, *et al.*, *Scientific Reports* 5, 1, 10657 (2015)

<sup>3</sup> H. Yaginuma, *et al.*, *Scientific Reports* 4, 1 6522 (2014)

<sup>4</sup> Y. Okada, *et al.*, *bioRxiv*, 2021.10.08.463131

<sup>5</sup> C. M. Díaz-García, *et al.*, *J Neurosci Res.* 97, 8, 946-960 (2019)

## 金ナノ材料の特異な電気化学特性を用いたバイオセンサ開発

○大崎脩仁<sup>1,2</sup>・民谷栄一<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>産総研先端フォトバイオ、<sup>2</sup>阪大産研)

**Electrochemical characterization of gold nanomaterials and its application** (PhotoBIO OIL, AIST<sup>1</sup>, SANKEN, Osaka Univ.<sup>2</sup>) OSAKI Shuto<sup>1</sup>; Tamiya, Eiichi<sup>2</sup>

### 【緒言】

近年、金属やカーボンのナノ材料が持つ特異な特性をバイオセンサや電気化学分析に応用しようとする報告が盛んである。金や白金などのナノ材料を電極上に修飾することで電気化学活性の向上や分子認識素子の修飾を可能となるなど、その用途は多岐にわたる。中でも金ナノ粒子は抗体修飾が容易で物理的/化学的に安定、導電性が高いなど電気化学バイオセンサに適した材料である。発表者らの研究室では金ナノ粒子に2次抗体を修飾し、印刷電極に修飾した1次抗体との間にサンドイッチ型の抗原抗体反応を発生させ、金ナノ粒子の電気化学反応量から抗原を測定するバイオセンサを開発してきた(Figure 1)<sup>1-4</sup>。本発表では免疫系やストレスとの関連が指摘される唾液中イムノグロブリン A(IgA)を測定対象としてバイオセンサの基礎的開発から被験者唾液試料を用いた応用的検討まで行った結果について報告する。

### 【実験】

電気化学測定では作用極、対極、Ag/AgCl 参照電極が一体となった印刷電極(DEN-EP-PP, Biodevice technology, Japan)と小型のポテンシオスタット(MiniSTAT100, Biodevice technology, Japan)を用いた。1次抗体及び2次抗体は印刷電極及び金ナノ粒子に物理吸着を利用して修飾した。電気化学測定では2 mol/L のKCl 溶液を用いて微分パルスボルタンメトリーにより金ナノ粒子の電気化学反応を評価した。

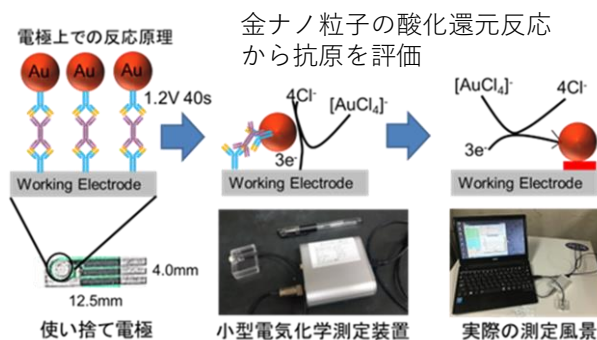


Figure 1: 発表者らが開発した電気化学バイオセンサの原理

### 【結果および考察】

Figure 2 は標準物質を用いて本バイオセンサの性能を評価した結果である。抗原抗体反応後に電極表面を電子顕微鏡で観察したところ直径 60 nm 程度の粒子が抗原濃度に応じた数で吸着していることが判明した(Fig. 2(a)). EDX 分析により元素解析したところ金であることが判明したため本バイオセンサは Fig. 1 に示すスキーム通りに動作していると判明した。また本センサの検出範囲は 10-150 ng/mL であった(Fig. 2(b))。唾液中の IgA 濃度が一般に 10~150 ug/mL 程度とされているため本バイオセンサは 1000 倍希釈した唾液試料中の IgA 測定に適していると判断した。そこで神奈川県立大学との共同研究により新型コロナワクチン接種後 10 か月間にわたる被験者 19 名の唾液中中和抗体の評価を行い、本バイオセンサが Point-of-Care Testing (POCT) に適していることを実証した。将来的には金ナノ粒子が持つ特異な電気化学活性や触媒活性を応用しより優れたバイオセンサを開発、実用していく予定である。

(1) Osaki, et. al., *Appl. Biochem. Biotech.*, **2021**, 193, 1311–1320

(2) Osaki, et al., *Electrochim. Acta*, **432**, 141180 (2022)

(3) E. Tamiya/S. Osaki, et al., *Biosensors*, **13**, 67 (2023)

(4) Osaki et al., *Biosensors* **2024**, 14(4), 165

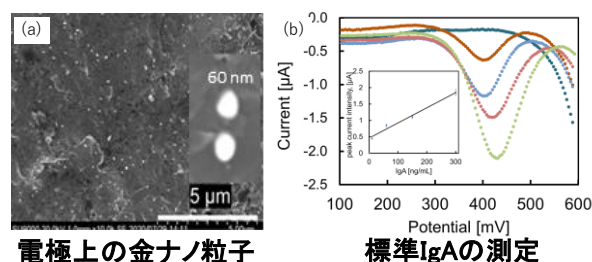


Figure 2: 抗原抗体後の電極 SEM 画像(a), 標準溶液測定時のボルタモグラム(b)



## 無標識・低侵襲な多点同時ラマン分光分析による細胞・薬剤スクリーニング

○畔堂一樹<sup>12</sup>・Li Menglu<sup>12</sup>・Liao Hao-Xiang<sup>2</sup> 藤田克昌<sup>123</sup> ( <sup>1</sup>産総研生命工学領域、<sup>2</sup>阪大院工、<sup>3</sup>阪大先導的学際研究機構 )

**Label-free and minimally invasive simultaneous multi-point Raman spectroscopic analysis for cell and drug screening** (Department of Life Science and Biotechnology, AIST<sup>1</sup>, Graduate School of Engineering, Osaka University,<sup>2</sup> Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives<sup>3</sup>) **BANDO, Kazuki**<sup>1</sup>; LI, Menglu<sup>12</sup>・LIAO, Hao-Xiang<sup>2</sup> FUJITA, Katsumasa<sup>123</sup>

本研究では、無標識かつ低侵襲なラマン分光分析技術を、多点同時測定により、高速化し、スクリーニング計測に応用することを目的としたものである。開発したラマンプレートリーダーによる高速に細胞および薬剤のスクリーニング手法を提案する。ラマン分光分析は、試料に対する化学的および物理的变化を非破壊的に測定できる優れた方法であり、本技術の応用範囲は細胞応答解析から食品、材料業界まで多岐にわたる。しかしながら、ラマン信号自体が弱く、多数の試料計測には不向きであった。

今回我々は 96 点の励起光スポットを持つ、多点同時ラマンプレートリーダーを開発した<sup>1</sup>。市販のマイクロウェルプレートの規格に合わせて 9 mm ピッチで励起光のスポットが並んでおり、ウェルごとの試料を同時に観察可能になった。

本技術ではあらかじめ顕微ラマンイメージングを用いて試料内の成分分布を詳細に観察したのちに<sup>2</sup>、プレートリーダーを用いて迅速かつ効率的なスクリーニングを行った。従来のラベル依存の方法と異なり、細胞をあるがままに、計測できる上に、典型的な逐次的に行うラマン計測方法と比較して、迅速な分析が可能となる。

モデルサンプルとして、3 次元培養した HeLa 細胞のスフェロイドに抗がん剤を投与をしたのちの、その薬効や、HepG2 細胞に脂肪酸を投与し、その取り込みの評価を行った。

本研究の成果は、細胞応答解析における新たな視点を提供し、医薬品開発における重要なツールとなることが期待される。また、この装置の応用は細胞応答試験だけにとどまらない。食品や、化学合成、半導体などの分野においても有用である。食肉の分析に結果についても議論する。

1. H. Liao et al., Anal. Chem. 95 (39), 14616–14623 (2023).
2. M. Li et al., Anal. Chem., 94 (28) 10019–10026 (2022).

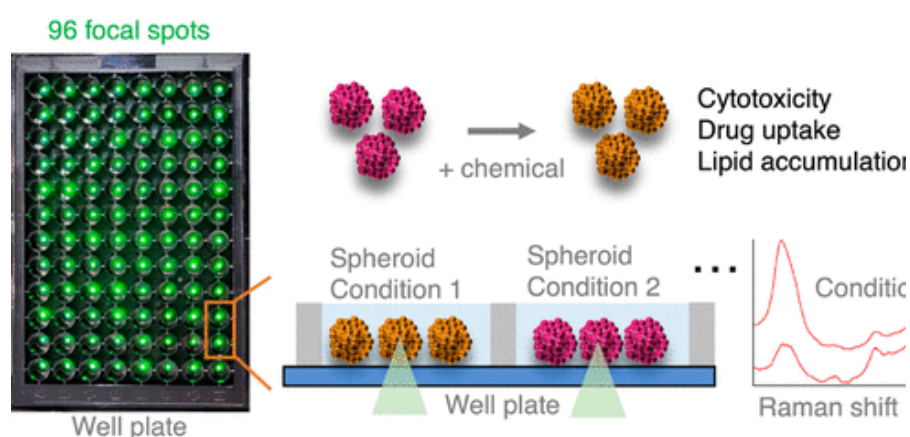


図 1 多点計測の概念図。異なる条件のスフェロイドからラマンを計測する。



## 細胞の表現系に基づくハイスループット薬剤スクリーニング：ヒト直交性酵素を用いる多色 cell-ELISA の開発

○平川琉偉<sup>1</sup>・金子諒右<sup>2</sup>・立石宙也<sup>1</sup>・古賀朗寛<sup>1</sup>・細川尊夏<sup>1</sup>・加隈綾晟<sup>1</sup>・谷戸謙太<sup>1</sup>・山中皓太<sup>1</sup>・新居輝樹<sup>2</sup>・岸村顕広<sup>2,3</sup>・森健<sup>2</sup>・片山佳樹<sup>2,3</sup>（九大院システム生命<sup>1</sup>・九大院工<sup>2</sup>・九州大学分子システム科学センター<sup>3</sup>）

**Development of Multicolor Cell-ELISA for High-throughput Drug Screening by Using Human Orthogonal Enzymes** (Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University<sup>1</sup>, Graduate School of Engineering, Kyushu University<sup>2</sup>, Center for Molecular Systems, Kyushu University<sup>3</sup>) HIRAKAWA, Rui<sup>1</sup>; KANEKO, Ryosuke<sup>2</sup>; TATEISHI, Chuya<sup>1</sup>; KOGA, Akihiro<sup>1</sup>; HOSOKAWA, Takamitsu<sup>1</sup>; KAGUMA, Ryosei<sup>1</sup>; TANITO, Kenta<sup>1</sup>; YAMANAKA, Kota<sup>1</sup>; NII, Teruki<sup>2</sup>; KISHIMURA, Akihiro<sup>2,3</sup>; MORI, Takeshi<sup>2</sup>; KATAYAMA, Yoshiki<sup>2,3</sup>

創薬において、*in vitro* における薬効の表現型スクリーニングが求められる。一般に、薬剤の効果を細胞膜表面のマーカーの発現量変化で評価する場合、フローサイトメトリー(FCM)やウェスタンブロット(WB)が用いられる。これらは細胞膜のマーカーの発現量を相対比較できるが、スループット性が低く、大規模なスクリーニングには不向きである。一方で、ELISA は分泌タンパク質を迅速に定量するアッセイであるが、膜タンパク質のような溶解・抽出しにくい標的に対しては定量が困難である。そこで、標的タンパク質を細胞から分離せずに細胞上でそのまま直接 ELISA を行う Cell-ELISA という方法が考案されている。Cell-ELISA は迅速・簡便な手法である反面、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼといった従来酵素では、ヒト細胞が持つ酵素と活性が競合してしまい、正確な定量ができないという問題があった。

この問題を解決するため、我々は細胞に活性が内在しない酵素として、アラビノフラノシダーゼ、キシロシダーゼ、ラムノシダーゼの3種を同定し、これらを「ヒト直交性酵素 (HOE)」と名付けた。HOE は標的の抗原の検出において、従来酵素比で最大 50 倍の S/N 比の向上が見られた。さらに、複数の標的タンパク質の同時検出のため、それぞれの HOE に特異的に反応する 3 色（4-メチルウンベリフェロン型、フルオレセイン型、レゾルフィン型）の蛍光基質を用意した。

本発表では、Cell-ELISAにHOEを適用し、5種の化合物（ラパマイシン、デキサメタゾン、クルクミン、フォーミルインドロカルバゾール、イブルチニブ）についてB細胞活性化抑制効果を評価した。B細胞としては、マウスの脾臓から抽出したB細胞を用い、薬剤で18時間処理した後、Anti-IgMによって6時間刺激して活性化させた。その後、B細胞の活性化マーカーであるCD80、CD86、CD69を標的としてHOEによるマルチカラー分析を行った結果、イブルチニブが最も強くB細胞活性化を抑制することが示唆された。

HOEを用いた多色Cell-ELISAを行い、サンプルの前処理を行うことなく、ダイレクトに複数種抗原の定量分析を達成した。B細胞活性化抑制薬剤スクリーニングにおいては、多色Cell-ELISAとFCMの結果が概ね一致したが、実用化のためには更なる高感度化が重要である。今後は、HOEについて新たに配列ベースのスクリーニングを行って、より高感度な酵素を探索する予定である。

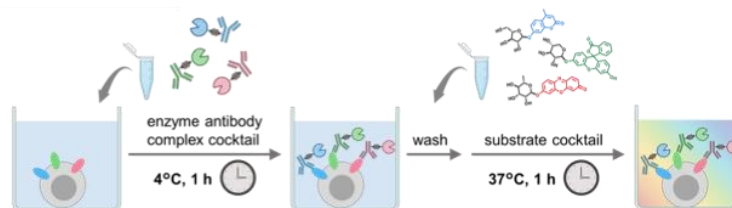


図1 HOEを用いた Cell-ELISA による  
薬剤スクリーニングの概略図

## ルテニウム-オスミウム連結錯体を鋳型特異的に形成脱離する新規 DNA プローブの合成とその核酸分析への応用

○ 境 ちひろ・成住 凌・北村 裕介・勝田 陽介・井原 敏博（熊本大学大学院先端科学研究部）

**Synthesis of novel DNA probes for the template-directed formation and release of ruthenium-Osmium complex** (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University) SAKAI, Chihiro; NARIZUMI, Ryo; KITAMURA, Yusuke, KATSUDA, Yousuke; IHARA, Toshihiro

標的核酸（鋳型）上に近接結合したプローブ核酸同士を連結し、その連結体を質量分析することで、高選択的かつハイスループットな核酸分析が可能である。しかしながら、核酸のイオン化効率は低い上、連結体は安定に鋳型に結合し続けるため、標的量に応じたシグナルしか得られない。本研究では、特徴的な同位体存在比を有するルテニウムもしくはオスミウムを中心金属とする錯体でラベル化された 2 種の核酸をプローブとして用いた。核酸と錯体を連結するリンカー部位にプロテインスプライシング反応に必須なペプチドユニットを導入している。図 1 に示すとおり、プローブが標的核酸に結合した際、互いのリンカー部位が近接するように設計しているため、鋳型特異的に両錯体が連結脱離することが期待される。金属錯体はイオン化効率が高いだけではなく、連結反応前後で錯体成分の同位体存在比と質量の顕著な変化が予想されるため、この連結錯体を分析対象とする。カチオン性の錯体が脱離することで、プローブの標的に対する熱安定性が低下するため、過剰量のプローブ存在下では、錯体脱離後のプローブと、より安定に結合可能な未反応のプローブが置換し、錯体の連結脱離反応が繰り返し起こると予想される（図 1）。標的核酸の存在を触媒的に生成する連結錯体の質量とユニークな同位体パターンの変化としてアウトプットすることが期待される。

ルテニウム錯体修飾プローブは以下の手順で合成した。まず、 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phen-NHS}](\text{BH}_4)_2$  (NHS: N-ヒドロキシスクシンイミド) を合成し、システイン-アスパラギンユニットを導入することで、 $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{phen-EDA-Cys}(\text{tBuS})-\text{Asn-Gly-Fmoc}](\text{NO}_3)_2$  を合成した。次に、Fmoc 基脱保護後、カルボジイミダゾールで 5'末端のヒドロキシル基を活性化した DNA と固相担体上でカップリング後、固相から切り出し、RP-HPLC で精製した。MALDI-TOF MS で解析したところ、目的物と一致する質量 ( $[\text{M}-3\text{H}]^- = 4453.77$ ) が検出されたためルテニウム錯体修飾プローブが合成されたと判断した。

オスミウム錯体修飾プローブは、以下の手順で合成した。 $[\text{Os}(\text{phen})_2\text{phen-EDA-AP-NHS}](\text{NO}_3)_2$  (AP: アジピン酸, EDA: エチレンジアミン) をアセトニトリルに溶解し、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィンと 3'末端チオール化 DNA の混合溶液に加え、両者をカップリングさせた。これを RP-HPLC により精製した。MALDI-TOF MS で解析したところ、目的物と一致する質量 ( $[\text{M}-3\text{H}]^- = 4378.09$ ) が検出されたため、オスミウム錯体修飾プローブが合成されたと判断した。今後、合成した 2 種類のプローブを標的核酸存在下で混合することによりルテニウム-オスミウム連結錯体の形成を評価し、シグナル増幅条件の最適化を行うことで、ハイスループットで高感度な検出の実現を目指す。

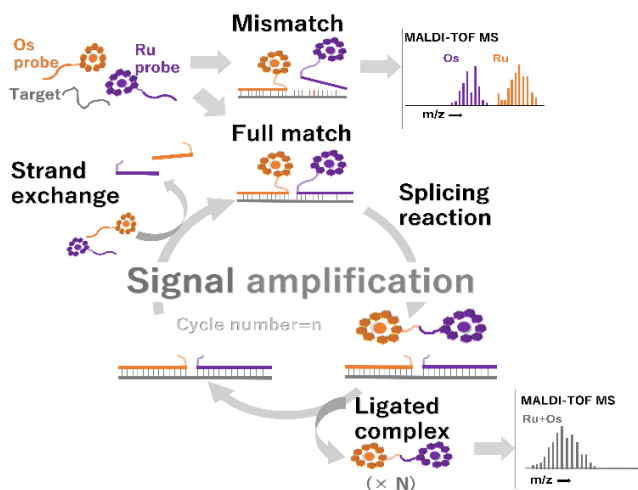


図 1. オスミウム錯体修飾 DNA プローブとルテニウム錯体修飾 DNA プローブによる標的の協働的認識および鋳型特異的に進行するルテニウム-オスミウム連結錯体の形成脱離

## SolutionDesignerRDB による実験自動化の試み

○酒井雄介（理研生命機能科学）

**Towards Automation of Experiments by SolutionDesignerRDB (RIKEN BDR) SAKAI, Yusuke**

自動化の進んだ分析装置の普及、人件費の増加や少人数からなる研究室の増加、自動分注装置の高機能化や低廉化に伴う普及により、実験の自動化は科学研究の効率性・持続可能性を高めるための有力なアプローチとなっている。実験自動化は、再現性の向上、高いスループットや長時間を要する研究設計の実現、科学研究環境におけるワーク・ライフ・バランスの向上などの形で科学の進展に寄与している。研究自動化の分野においては、そのようなサンプルの調製や分析といった実験部分の自動化にとどまらず、実験計画、記録、分析や解釈など、研究活動のすべてのプロセスを対象に、自動化を進める研究が行われている。

本発表では、DNA ナノテクノロジーや合成生物学における実験段階の自動化に主に焦点を当て、リレーショナルデータベース(RDB)と安価な自動分注装置を用いた開発事例を紹介する。DNA オリガミは、長い DNA を短い数百のオリゴ DNA で折りたたんだ構造をしており、一つの構造体あたり数百のオリゴ DNA を適切に設計・購入・混合・在庫管理しなければならない。構造体上のオリゴ DNA を様々な修飾して DNA オリガミを多様に機能化したり、DNA オリガミ同士の複合体を設計したり、また、目的に応じて DNA 構造体の設計を試行錯誤したりすることによって、研究の経過に伴ってオリゴ DNA バリエーションは次第に膨れ上がり、一つの研究で通算数万本のオリゴ DNA を扱うことも珍しくない。本発表では、実験者の根気と注意力に頼る従来の手法の非効率性を解消し、これらのプロセスを自動化するために開発した「SolutionDesignerRDB (SDRDB)」というツールを紹介する。

SDRDB は、GUI リッチなローコード RDB である Claris FileMaker を用いて構築されており、主に以下のコンポーネントで構成されている。(1) 無制限の多段階液体混合操作に対応し、混合成分の自動追跡と動的で統合的な組成編集を可能にするリレーショナルデータベース、(2) データベース上の溶液組成をユーザーが容易に一括または個別に設計・編集できる GUI (3) 特定の分注装置(Opentrons OT-2, Gilson TRACKMAN Connected, Beckman Coulter Echo)向けのプロトコルファイルを生成するためのスクリプト、(4) cadnano から生成されたオリゴ DNA リストから DNA オリガミ構造ごとの溶液組成を自動でデータベースにインポートするスクリプト、プレートオリゴ DNA の購入支援、チューブラベルの印刷、および自動分注装置準備などの研究援助ツール群。本ツールの現時点の制限として、水溶液の容量比混合を前提としていて溶媒等の混合による容積の変化が考慮されないこと、cadnano 以外の DNA/RNA ナノテクで用いられるファイル形式に未対応であることが挙げられる。

SDRDB はローコードアプリケーションを用いているため、ユーザーは比較的少ない学習コストで自分の研究上のシナリオに応じたスクリプトや GUI を追加・編集することができる。本ツールの、特に混合溶液設計・分注装置用プロトコル出力機能については、多数の因子から構成される混合溶液を設計・調製するシーンの多い生体機能関連化学やバイオテクノロジーの研究においても実験上のボトルネック解消に寄与しうろと考えている。本システムのコンセプトは当初、DNA オリガミ研究のためのツールとして「dna-origami-db」の名で『細胞を創る』研究会 16.0<sup>1</sup> 及び DNA29<sup>2</sup> にて発表された。この度、中核データベースの正規化と Data-oriented approach の徹底によるメンテナンス性やパフォーマンスの向上、加えて SQL を用いた Web アプリへの将来的な移行の準備を目的に、汎用的な溶液設計ツールとして再実装し、より実態に即した「SDRDB」へと改名を行った。ポスター前にてデモを行い、ダウンロード可能なリンクも掲示する予定である。

1. 「細胞を創る」研究会 16.0、目黒区、2023 年 9 月
2. 29th International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (DNA 29), Sendai, September, 2023

## キノコのアレロケミカルに関する研究

○松本花奈<sup>1</sup>・三枝拓<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>茗溪学園高、<sup>2</sup>筑波大院)

**Research on Allelochemicals of Mushrooms** (Meikei High School<sup>1</sup>, Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba<sup>2</sup>) MATSUMOTO, Kana<sup>1</sup>; SAEGUSA, Taku<sup>1,2</sup>

キノコのもつアレロパシーが周囲の植物や生態系にどのような影響を与えるのか未だに解明されていない。そのような未知な野生キノコから植物の成長を制御するもの、農業や植物の成長を促進させる生理活性物質を新規に発見することを目指している。生理活性物質を発見することで、合成化学物質を含まない環境負荷の少ない天然除草剤や成長促進剤の開発を目指す。

乾燥させた30種のキノコの傘の部分を細かく刻み、6穴マルチディッシュにそれぞれ3mg, 10mgずつ置いた。その上に、0.75%の寒天を加え固化させ、さらに0.75%の寒天を加え、再び固化させた。固化した寒天上にレタスの種子をひと穴6粒ずつ播種し、25℃、暗黒下で3~4日間培養した。1つのコントロールにつき2~3種類のキノコで実験を繰り返し行った。その後、レタスの下胚軸・幼根の長さをそれぞれ測定し、植物の成長が促進されているか阻害されているのかを調べた。

30種のキノコのアレロパシー活性を測定した。同時に生育させたコントロールの成長度を100%としてサンプルの成長度を相対的に表した。100%を下回るものは成長阻害、100%を上回るものは成長促進活性があると判断した。特に下胚軸の成長を促進させるキノコは、ノボリリュウタケ、ヒメカタショウロであることが分かった。特に幼根の成長を促進させるキノコは、ハカワラタケ、キツネタケだった。一方で、下胚軸の成長を阻害するキノコは、ハイイロイタチタケ、タモギタケであることが分かった。幼根の成長を阻害するキノコは、タモギタケ、タモギタケ、トキイロヒラタケであることが分かった(図1)。

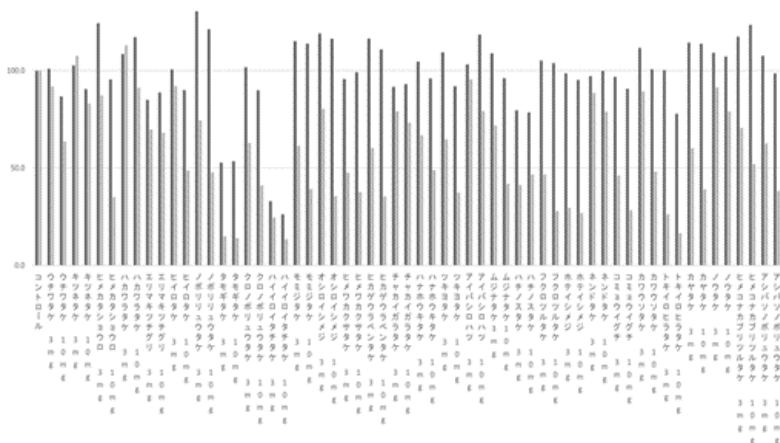


図1 キノコのアレロパシー活性 (相対値%)

この結果よりキノコに含まれる生理活性物質には植物の生育を促進する作用のあるもの、抑制する作用のあるものが存在する可能性が示唆された。それらの物質を組み合わせることで、合成化学物質を含まない環境負荷の少ない天然除草剤や成長促進剤の開発が可能になると考える。合成化学物質を含まない環境に優しい製品の開発は、我々の生活の質を向上させ、食品の生産においても、安価で安全な食の提供が期待され、これが持続可能な社会の実現につながるのではないかと。多くのキノコが、植物の成長を抑制させる何らかの生理活性物質を持っていることが示唆された。また、キノコの投与量が3mgの場合と10mgの場合で結果に大きな偏りは見られなかった。成長促進の効果が主に下胚軸で現れ、対照的に幼根の成長はほとんどが阻害されるという結果が得られた。この傾向に注目すると、1つのキノコが同時に下胚軸と幼根に対して反対の作用を示す、つまり下胚軸では促進、幼根では阻害という作用を示すきのこが多くあることに気が付いた。また、現段階では下胚軸と幼根ともに成長を促進させるキノコを見つけることはできなかったが、下胚軸と幼根ともに成長を阻害させるものとしてタモギタケが有効であることを見出した。

- ・ T. Kariya, *et al.*, J. Crop Res, 65, 55-63, 2020
- ・ Y. Fujii, *et al.*, J. Weed Sci. Tech, 49, 102-103, 2004

## チョコレート投与時のナルコレプシー様症状誘発に関する研究

○小林 梨乃<sup>1</sup>・三枝 拓<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>茗溪学園高、<sup>2</sup>筑波大院)

**Study on the induction of narcolepsy symptoms during chocolate administration** (Meikei High School<sup>1</sup>, Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba<sup>2</sup>) KOBAYASHI, Kano<sup>1</sup>; SAEGUSA, Taku<sup>1,2</sup>

睡眠はすべての動物にとって必要不可欠であり、心身の健康の維持、脳や体の健康の維持、記憶の定着や整理、免疫機能の維持/向上などの役割を担っているが、現在も原因が解明されていないことが多くある。本研究の目的は、「ナルコレプシーを発症しているマウスにチョコレートを与えるとカタプレキシーが誘発される」という先行研究<sup>1</sup>をもとに、与えるチョコレートの種類を変え、カタプレキシーとチョコレート摂取の関わりを実験的手法によって明らかにした。カタプレキシーはナルコレプシーという睡眠障害でみられる特有の症状であり、喜怒哀楽などの過度な感情の高まり、特にポジティブな情動によって全身の筋肉から力が抜けてしまい、覚醒しているにもかかわらず、レム睡眠と同様の筋脱力がみられる<sup>2</sup>。本実験では Hershey's キスチョコレートに加え、森永 DARS のミルク、甘さ控えめミルク、ホワイトの合計 4 種類のチョコレートを使用した。通常飼料のみのマウス 3 匹の脳波データを測定後、このデータをコントロールとし、全 4 回の投与でマウス 3 匹に 4 種類のチョコレートをランダムに与える。13 時に 3 つのケージ内にチョコレートを置き、13 時から 24 時間脳波測定を行う。水と餌については自由摂取とした。頭蓋骨に電極を固定し、頸部にワイヤーを刺入したマウスを用いて、脳波 (Electroencephalography, 以後 EEG と記述) および筋電図 (Electromyography 以後 EMG と記述) の測定を行った。マウスの睡眠状態は、覚醒 (図 1)・ノンレム睡眠 (Non-Rapid Eye Movement Sleep, 以後 NREM と記述) (図 2)・レム睡眠 (Rapid Eye Movement Sleep, 以後 REM と記述) (図 3) の 3 つに分類され、EEG と EMG をもとに解析を行う。脳波解析には脳波解析ソフトを用いる。脳波解析ソフト上で Wake から REM に移行している箇所をカタプレキシーとし、カタプレキシー回数を集計する。なお、当実験では測定した 24 時間のうち、測定開始からの 12 時間を解析対象とした。チョコレートなし、または Hershey's/DARS ミルク/DARS 甘さ控えめミルク/DARS ホワイト、いずれかを与えたマウスのカタプレキシー回数を集計し、回数の変移と平均をグラフ化した。(図 4) チョコレートはカタプレキシーを誘発する。DARS ホワイトチョコレートはカタプレキシー誘発効果が少ない傾向があり、DARS 甘さ控えめミルクはカタプレキシー誘発効果が高い傾向があった。Hershey's キスチョコレート、DARS ミルク、DARS 甘さ控えめミルク、DARS ホワイトはナルコレプシーの症状であるカタプレキシーを誘発する。DARS ホワイトは、カタプレキシー誘発効果が少ない傾向にあるが、チョコレートを与えていない時と比較すると 2 倍以上カタプレキシーが誘発されていることから効果がないとは言い切れない。また、DARS 甘さ控えめミルクは、カタプレキシー誘発効果が高い傾向にあったことから、カカオマスの含有量の違いではないかと示唆される。効率的にカタプレキシーを誘発させるための方法として DARS 甘さ控えめミルクの使用が検討できる。

1. Y. Oishi. *et al.*, J Neurosci, 33 (23) 9743-9751, 2013

2. S. Uchida. *et al.*, J Neurosci, 41 (7) 1582-1596, 2021

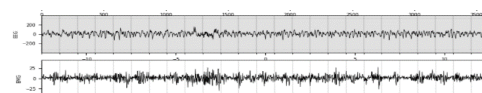


図 1 Wake 脳波 / 筋電図

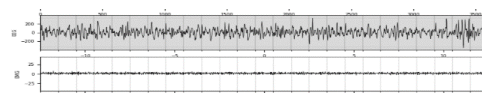


図 2 NREM 脳波 / 筋電図

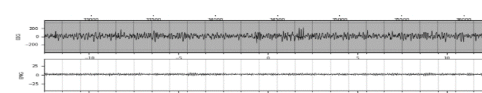


図 3 REM 脳波 / 筋電図

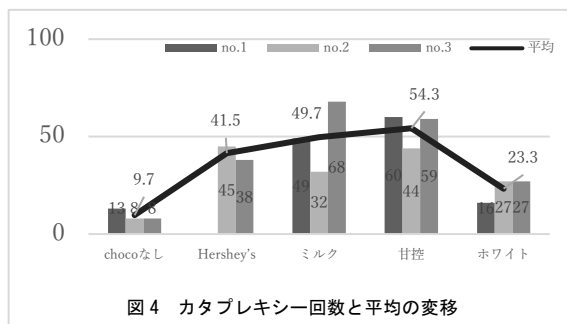


図 4 カタプレキシー回数と平均の変移



## 挿し木の成功率を上げるために～光の波長と発根の関係について～

福田百合野（茨城県立並木中等教育学校）

**To Increase the Success Rate of Cuttings ~The relationship between light wavelength and rooting~** (Ibaraki Pref. Namiki Secondary School) FUKUDA Yurino

挿し木とは、栄養生殖の一つであり、切り取った植物体を土や水に挿すことで発根させるものである。私は、挿し木による発根と、光の波長の関係性について、波長別の発根数や、植物に含まれているオーキシン濃度の違いなどの観点から調べている。なお、実験で挿し木をする際は、ローズマリーを用い、ビーカーに水を入れその中に植物体を挿した（＝水挿し）。

植物が成長するために必要な光は赤色光と青色光だと言われていることから、赤色 LED ライトのみ当てて挿し木したサンプルと、青色 LED ライトのみを当てて挿し木したサンプルを比較した。

光量子束密度をそろえ、ビーカーにアルミ箔を覆い、植物体の上半分のみに光が当たるようにして挿し木を行った。なお、これは土に挿し木している時と同じ状態にするためである。実験を何回か繰り返し行った結果、赤色光は根の数を増やし、青色光は根の長さを伸長する傾向が見られた。ただし、その差は小さかった。

また、植物全体に含まれているオーキシン濃度の定量を、HPLC を用いて行った。HPLC で、オーキシンは約 16 分の時に析出される。HPLC にかける前に、次のような抽出作業を行った。まず、植物体を乳鉢・乳棒を用いてすり潰し、80%エタノールに溶かしたあと、エバポレーターでエタノールを飛ばした。残った液体を、石油エーテルを用いて不純物を除去し、ジエチルエーテルにオーキシンを移動させた。その後、ジエチルエーテルを飛ばし、乾固した物質を酢酸ナトリウム溶液に溶かして、サンプル溶液とした。HPLC にかけた結果、赤色光を当てた植物体の方が、オーキシン濃度は高いことが分かった。

現在まで行った実験結果から、次のように考察した。1 つ目の実験結果から、波長と発根の間には何かしらの関係性があると考えられる。オーキシン濃度が高い方が、発根は促進されるが、根の伸長はオーキシン濃度が低い方が伸長されると言われていることから、赤色光を当てた植物体の方が、植物（根）に含まれているオーキシン濃度は高いと考えられる。この考察の通り、HPLC の結果から、赤色光を当てた方が、オーキシン濃度は高くなりやすいと言えると思われる。

今後は、このような傾向が見られた原因について追及していきたいと考えている。まず、オーキシンの合成には光はほとんど関係ない。このことから、青色光を当てるとオーキシンが減少するのではないか、という仮説を今立てている。このことについて、挿し木前の植物体のオーキシン濃度と比較することで、調べようと思う。

また、青色光には、オーキシンを光の当たらない箇所に移動させる働きがある。（光受容体フォトトロピンの作用による）。このことから、オーキシンの輸送のされ方が、波長によって違う可能性が高いので、この観点についても調べてみたい。

また、波長の違いによる発芽の違い、茎の成長の違い、などは多く報告されているが、発根の違いはほとんど見受けられない。よって、波長の違いは、種から育てた植物の発根には大きな影響を与えず、挿し木による不定根の形成のみに影響を与えるのかもしれないと考えた。なので、波長別の種子の発根の仕方を調べ、挿し木による発根と比較してみたい。

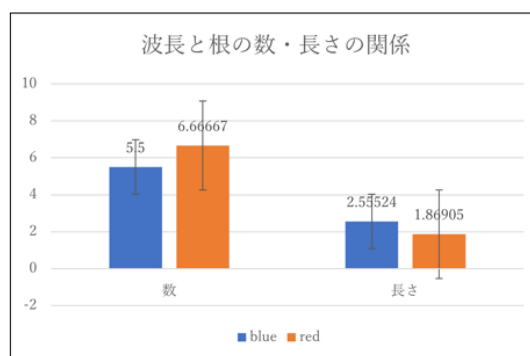


図 波長と根の数・長さの関係

## アレロケミカルと細胞周期の関係

渋谷悠太・石原大馳（茨城県立並木中等教育学校）

**Allelochemical and the cell cycle** (Ibaraki Pref. Namiki Secondary School) SHIBUYA Yuta; ISHIHARA Taichi

### 1. 動機および目的

植物がもたらす成長阻害作用を解明することを目的に研究を始めた。これまでの実験から、シロツメクサをもとに作製した被検液はレタスの根の伸長を抑制するが、根端分裂組織の細胞の大きさに変化はないことが分かった。本研究ではレタスの細胞分裂に与えている影響を調べることを目的とした。

### 2. 方法

#### <被検液の作製>

- ①シロツメクサの茎を刈り取り、24 時間乾燥させた。
- ②乾燥試料 1 g あたり 100mL の蒸留水を加えた
- ③ミキサーで粉碎し、遠心分離をかけて、上澄み液を被検液とした。

#### <実験方法>

- ①レタスを実験群（被検液で育成）、統制群（蒸留水で育成）に分け、3 日間育てた。
- ②2 つの群それぞれの根を先端から 3 mm 切り取り、固定、解離、染色の操作を行った。
- ③位相差顕微鏡で観察し、写真を撮り、間期、前期、中期、後期、終期の細胞数を実験群は 828 個、統制群は 1293 個数え、細胞周期の時期ごとに割合を調べた。
- ④実験群と統制群において、細胞周期の時期ごとの割合に差があるかを調べるためにカイ二乗検定を行った。

### 3. 研究結果

実験群は統制群と比べて、茎の長さが 31% 減、根の長さは 79% 減となった。よって、成長抑制作用について根に対しての方が、48% 大きく、これは t 検定から、1 % 水準で有意な差であることが分かった。5 % 水準で、根の細胞では、前期の割合は有意に高く、間期の割合は有意に低かった。中期、後期、終期の割合に有意な差はなかった。

### 4. 考察

以下の 2 つについて検討を行った。

1 つ目は、間期の時間を短くしていることについてである。間期から前期に移行するときに不完全の状態の前期に入ってしまう、正常なときと比べて、前期から中期の細胞になる時間が長くなっている可能性である。すなわち、シロツメクサのアレロケミカルが細胞周期制御系に影響をあたえ、細胞周期制御系がシグナルを受け取れなくなり、DNA 合成過程に何らかの不具合があった細胞も前期に移行させてしまうと考えられる。この場合、シロツメクサのアレロケミカルは、細胞周期制御系がシグナルを受け取れなくなるようにする物質であると考えられる。前期での DNA 合成過程が単純に促進されているように見えるが、その場合、中期、後期、終期の時間の割合が大きくなり、また、レタスの根の長さは短くならないはずなので、これは考えられない。

2 つ目は、前期から中期に移行するための時間を長くしていることについてである。前期から中期に移行するとき、まず、核膜が崩壊する。この段階を阻害している場合、シロツメクサのアレロケミカルは核膜が崩壊するときに、シグナルとしてはたらくサイクリン依存性キナーゼを阻害する物質であると考えられる。次に、紡錘体の形成を開始する。この段階を阻害している場合、シロツメクサのアレロケミカルは微小管形成に用いられるモータータンパク質の働きを阻害する物質であると考えられる。

### 5. 参考文献

ブルース・アルバーツ,アレクサンダー・ジョンソン,THE CELL 細胞の分子生物学第 6 版,ニュートンプレス,2017