

2024年9月12日(木)

ポスター会場

ポスター発表 | 1P-01~1P-109

ポスター発表

13:20 ~ 15:00 ポスター会場 (多目的ホール)

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

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

[1P-02] eDHFRタグを基本骨格とする化学遺伝学 Ca^{2+} センサーのタンパク質工学的改変

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[1P-10] 蛍光イメージングのための世界最小モノボディタグの創製

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

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

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

[1P-12] 翻訳後切断を指向した DNA結合タンパク質 Repの改変

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[1P-19] 細菌細胞表面ファイバータンパク質のメチル化修飾

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

[1P-20] 外的刺激による pH 応答性伸縮タンパク質集合体の運動制御

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

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

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

[1P-22] 合成分子による GLUT4 の膜動態の操作

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

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

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

[1P-24] β酸化活性を指標とした代謝フェノタイプスクリーニング

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

府)

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

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

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

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

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

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

[1P-28] マグネトソーム膜上の脂質組成調節による膜受容体の機能解析

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

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

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

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

*谷 歩峻¹、野尻 正樹¹ (1. 大阪大学大学院理学研究科)

[1P-31] 相同組換え誘導が可能な Cas9 変異体取得法の開発

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

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

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

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

[1P-33] 細胞骨格様 2 成分蛋白質チューブの創生

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[1P-38] 人工細胞膜上で二量化可能な膜貫通人工核酸三重鎖

の開発

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

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

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

[1P-40] リポソームで区画化された酵素代謝反応システム

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

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

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

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

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

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

*牧野 哲直¹、田中 真紀子¹ (1. 電通大院情報理工)

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

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

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

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

[1P-46] 電位差計測で DNA検出を行うための溶液条件の検討

*猪狩 雅徳¹、古澤 宏幸^{1,2} (1. 山形大学大学院有機材料システム研究科、2. 山形大学教育推進機構)

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

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

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

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

[1P-49] 天然核酸塩基対 A/T と G/C のサイズを模倣したア

ルキニル C-ヌクレオチド二重鎖の開発

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[1P-54] 蛍光色素導入 SNAらせん増幅系の評価

*杉山 乙珠¹、浅沼 浩之¹、樫田 啓¹ (1. 名古屋大学工学研究科)

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

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

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

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

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

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

[1P-58] 人工塩基導入 PNA配列解析法の開発

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

[1P-59] 二重鎖形成を利用した非環状型人工核酸 SNAの配列解析

*日比野 希美¹、浅沼 浩之¹、樫田 啓¹ (1. 名大院工)

[1P-60] ケージド相分離液滴の光応答挙動

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

[1P-61] ペプチド固定化ビーズを用いた環境中の鉛イオンの簡便な検出

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

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

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

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

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

[1P-64] Dアミノ酸を利用した大環状ヘキサデカペプチドの合理構築

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

[1P-65] オリゴアルギニン付与により生じる細胞毒性を軽減する方法

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

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

*清水 雅俊¹、相田 卓三¹、三木 卓幸¹ (1. 東京大学大学院)

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

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

[1P-68] 分割インティンを用いた標的タンパク質結合ペプチドの探索

*信澤 佳奈¹、渡辺 雄太郎¹、高橋 剛¹ (1. 群馬大院理工)

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

*清水 もも花¹、信澤 佳奈¹、高橋 剛¹ (1. 群馬大院理工)

[1P-70] 分割インティンとルシフェラーゼを用いた脱糖鎖酵

素 ENGase活性を発光検出するプローブの開発

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

[1P-71] ナノポアライブラリの構築および測定・解析手法の確立

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

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

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

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

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

[1P-74] ジチロシン架橋によるレジリン様ポリペプチドの化学酵素合成

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

[1P-75] MTS誘導体を用いたがん選択的なペプチドの合成と特性評価

*齋田 颯心¹、山崎 正幸¹、富崎 欣也¹ (1. 龍谷大学)

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

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

[1P-77] 赤血球ゴーストを反応場とした光水素生成反応の制御

*坂本 大芽¹、越山 友美¹ (1. 立命館大院生命科)

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

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

[1P-79] ナノ構造脂質キャリアを用いた¹⁹F MRI造影剤の開発研究

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

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

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

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

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

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

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

[1P-83] 光誘導電荷分離分子搭載ナノディスクによる細胞膜電位の制御

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

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

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

[1P-85] 簡便かつ迅速な Zn置換クロロフィル誘導体の調製方法の開発

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

[1P-86] 血小板が結合した血中循環がん細胞の3Dイメージング解析

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

[1P-87] 光増感色素固定化基板の作製と間葉系幹細胞への影響評価

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

[1P-88] 交流電場による細菌の Swarming運動促進効果

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

[1P-89] 電子移動反応を駆使した可視光光解除性保護基の開発

*家田 直弥^{1,2}、中村 旭良²、館 実優²、富田 なつみ²、堀

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

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

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

[1P-91] イソプレノイドを配位結合で捕捉するホスト分子の開発

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

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

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

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

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

[1P-94] 金属連結ペプチド鎖による編み込みシートの構築と力学物性調査

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

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

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

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

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

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

*河合 寛太¹、辻 美恵子¹、平山 祐¹ (1. 岐阜薬科大学)

[1P-98] ルミノール化学発光を利用したヒト赤血球の脆弱性評価

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

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

*谷田部 浩行¹、齋藤 雄太郎¹、高草木 洋一^{2,3}、齋藤 圭太

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

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

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

[1P-101] 大豆根粒菌のラマン分光解析を通じた大豆の窒素固定活性予測

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

[1P-102] シュードノットアプタマーを用いたストレス検出バイオセンサ

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

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

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

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

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

[1P-105] ヒト腸管モデルにおけるアルカリホス

ファターゼ活性の定量評価に向けた多孔膜電極デバイス

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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¹、真辺 諒²、門場 啓一郎²、藤野 公茂¹、林 剛介¹、森信 暁雄²、岩井 一宏³、村上 裕¹ (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¹ (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¹、クリストファー ヴァヴリッカ¹、清田 洋正² (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¹、水嶋 真吾¹、竹内 優紀乃¹、林 剛介¹、村上 裕^{1,2} (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¹、藤原 綱大¹、真島 剛史¹、小林 直也¹、金井 賢一¹、松井 貴輝¹、別所 康全¹、廣田 俊¹ (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¹、蓼島 維文¹、菊地 和也^{1,2} (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¹、藤野 公茂¹、園田 凌吾¹、三城 恵美²、加納 圭子²、村上 裕^{1,3} (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トの開発

*水野 愛香¹、堂浦 智裕¹、清中 茂樹¹ (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_{2A}受容体選択的な活性化

*鈴木 啓文¹、松葉 佑弥¹、堂浦 智裕¹、清中 茂樹¹ (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¹、幡野 明彦¹ (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¹、南畑 孝介¹、石川 聖人²、吉本 将悟³、堀 克敏³、神谷 典穂^{1,4} (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¹、伊藤 海児¹、渡邊 愛梨¹、深田 梨沙子¹、田代 有輝¹、金岡 英徳²、清中 茂樹¹ (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¹、曾我 恭平¹、Hansel Adriel²、柴田 晃大¹、藤原 孝彰²、南後 恵理子^{2,3}、清中 茂樹¹ (1. 名古屋大学工学研究科、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¹、池田 優乃²、林 理恵¹、田中 祐圭³、吉田 亘^{1,2} (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¹、黒田 直希¹、荒川 貴博²、須磨岡 淳²、吉田 亘¹ (1. 東京工科大学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¹、八塚 研治¹、渡邊 愛梨¹、深田 梨沙子¹、田代 優輝¹、金岡 英徳²、清中 茂樹¹ (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¹、堂浦 智裕¹、山崎 友照²、藤永 雅之²、張 明栄²、掛川 渉³、清中 茂樹¹ (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¹、杉本 梨緒¹、南畑 孝介²、吉本 将悟³、堀 克敏³、神谷 典穂^{2,4}、石川 聖人¹ (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ボソーム

*杉本 梨緒¹、横江 優来¹、吉本 将悟²、堀 克敏²、石川 聖人¹ (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¹、笠原 彰友²、山次 健三² (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究院)

[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¹、山口 将平¹、真島 剛史¹、小林 直也¹、段 練²、藤木 涼²、Kowit Hengphasatporn²、重田 育照²、緒方 英明³、一二三 恵美⁴、宇田 泰三⁵、廣田 俊¹ (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 Lin¹, Hui Yang², Eiji Nakata¹, Takashi Morii^{1,3} (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¹、Longo Liam¹、松浦 友亮¹ (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¹、古賀 大晴¹、大川 優生¹、伊藤 智之³、南畑 孝介¹、梅津 光央³、神谷 典穂^{1,2} (1. 九州大学大学院工学研究院、2. 九州大学未来化学創造センター、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^{1,2}、西山 健太郎¹、鎌田 春彦^{1,2}、大野 浩章^{1,2} (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¹、村田 武士²、安田 賢司²、福永 圭佑³、松浦 友亮³ (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 凜¹、中根 啓太¹、菊池 智子¹、安田 早緒理¹、池ノ上 達哉²、佐藤 伸一^{1,3}、*友重 秀介¹、石川 稔¹ (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¹、荒井 堅太^{2,1} (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^{1,2}、木野 晴揮¹、楳村 青央空¹、濁川 清美^{1,2} (1. 広島大学大学院医系科学研究科、2. 広島大学薬学部)

[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¹、湯沢 哲至¹、ヴァヴリッカ クリストファー¹ (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¹、西岡 菜季²、田井 章博³、二木 史朗¹、*今西 未来¹ (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¹、Mehdi Davari²、小野田 晃¹ (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 峻介¹、中田 栄司²、森井 孝^{2,3}、桑原 淳¹（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¹（1. 東京農工大学工学府）

[2P-35] ONOO⁻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¹、朱 浩¹、松葉 恭一¹、浜地 格^{1,2}（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¹、高橋 泰人¹、齊藤 知恵子²、吉川 雅英²、水上 進¹（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のキャラクターゼーション

*中澤 真優¹、赤川 絵里¹、澤田 真希¹、武田 康太²、藤井 敏司³、養王田 正文¹、中村 暢文¹（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^{1,2}、後藤 祐平^{2,3}、杉山 博紀^{2,4}、築地 真也⁵、青木 一洋^{2,3}（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¹、平原 令偉¹、莫 峻凌¹、藤本 健造¹（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¹、小山田 知輝²、影近 弘之²（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¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹（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¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹（1. 名古屋大学）

[2P-43] Histidine-Cd²⁺錯体を用いた人工核酸 L-aTNAの非酵素的ライゲーシオン反応の解析

*別所 弘麻¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹（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 奏乃¹、稲葉 央¹、遠藤 玉樹²、建石 寿枝²、杉本 直己²、松浦 和則¹（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¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹（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¹、金森 功史¹、河添 好孝²、杜 瑤瑤¹、吉田 七唯¹、湯浅 英哉¹（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 HAILILI¹, Fujimoto Kenzo¹（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¹、沖田 ひかり¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹（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¹、田口 真彦²、林 重彦¹（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¹、永谷 恵梨佳¹、星野 秀和²、笠原 勇矢^{2,3}、小比賀 聡^{3,4}、栗原 正靖¹（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¹、三瓶 悠¹、松崎 有修¹、駒野 淳²、柴田 淳史³、山本 剛史¹、堂野 主税⁴、和田 健彦⁵、山吉 麻子^{1,6}（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^{1,2}、奥田 修二郎³、凌 一葦³、建石 寿枝^{1,2}、杉本 直己² (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¹、前原 大悟¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学大学院理工学研究科)

[2P-54] 液-液相分離における DNAトポロジーの効果

*千田 隆誠¹、田立 ののか²、文屋 諒太郎²、田代 竜³、大吉 崇文^{1,2,4,5} (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¹、中村 光伸¹、高田 忠雄¹ (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¹ (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¹、小畑 健太郎¹、松原 一稀¹、松尾 和哉¹、和久 友則¹、小堀 哲生¹ (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 Asif¹、Eiji Nakata^{1,2}、Peng Lin^{1,2}、Morii Takashi³ (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^{1,2}、PATHAK Soumitra^{1,2}、百武 篤也³、池袋 一典⁴ (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¹、勝田 陽介^{1,2}、木田 朋輝¹、佐藤 慎一^{1,2}、北村 裕介¹、井原 敏博¹ (1. 熊本大学大学院先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio)

[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¹、小野 高広¹、上田 卓見^{2,3}、竹内 恒³、森本 淳平¹、山東 信介¹ (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¹、藤本 和久¹、長門石 暁²、津本 浩平²、阪本 知樹³、山置 佑大³、永田 崇³、片平 正人³、柴田 奈津希⁴、大吉 崇文^{4,5,6} (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¹、山崎 正幸²、富崎 欣也¹ (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¹、日高 由梨¹、池田 拓未¹、大洞 光司¹、林 高史¹ (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¹、富崎 欣也¹ (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¹、笠原 彰友²、山次 健三² (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究科)

[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¹、稲葉 央¹、角五 彰²、松浦 和則¹ (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¹、稲葉 央¹、角五 彰²、松浦 和則¹ (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¹、佐藤 智典¹、松原 輝彦¹、鈴木 寧々¹ (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¹、小澤 英知¹、林 剛介¹、村上 裕^{1,2} (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¹、沼田 圭司^{1,2,3} (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所)

- [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^{1,2}、角田 達彦³、野本 梯吾³、藤井 七彩³、池本 光志⁴、宮前 友策¹ (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¹、小田井 柊也¹、MO Junling¹、藤本 健造¹ (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¹、若林 里衣¹、神谷 典穂¹、後藤 雅宏¹ (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¹、越山 友美¹ (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¹ (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¹、佐藤 史也¹、エルナンデス パニアグア リリアナ アレハンドラ¹、稲垣 奈都子²、伊藤 大知²、吉野 大輔¹、寺 正行¹ (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¹、金森 功吏¹、飛田 飛田健司¹、能城 地洋¹、小倉 俊一郎¹、湯浅 英哉¹ (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¹、若林 里衣¹、後藤 雅宏^{1,2}、神谷 典穂^{1,2} (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 Tan¹、Rie Wakabayashi¹、Noriho Kamiya^{1,2}、Masahiro Goto^{1,2} (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 晃一¹、南出 悠貴¹、橋本 穂亜¹、田中 喜基¹、真野 祐樹¹、葛谷 明紀¹ (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¹、小林 茉穂¹、関 篤也¹、小寺 南渡¹、加藤 紀弘¹、奈須野 恵理¹ (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ニブの合成と阻害活性評価
*三田村 啓史¹、筒井 啓太¹、吉川 優¹、築地 真也¹ (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¹、森 英樹¹、原 正之¹ (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¹、古田 寿昭¹ (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¹、古田 寿昭¹、佐藤 創¹ (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¹、河合 靖¹ (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¹、幡野 明彦² (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^{1,2}、岩井 悠馬¹ (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¹、牛島 成実²、奈須野 恵理²、加藤 紀弘² (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_{2A}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¹、堂浦 智裕¹、清中 茂樹¹ (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¹、針尾 紗彩¹、寺井 琢也¹、キャンベル ロバート¹ (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¹、西村 賢宣¹ (1. 筑波大学)
- [2P-94] An efficient affinity maturation method for antibody-like proteins by using CRISPR/dCas9 system
*MingYao Yan¹, Ryusei Matsuo², Tomoshige FUJINO¹, Gosuke HAYASHI¹, Hiroshi MURAKAMI^{1,2} (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 憲二¹、丹羽 史佳¹、上原 亜久理¹、上村 英大¹ (1. 東京工科大学応用生物学部)
- [2P-96] シ⁺ヘ⁺フ⁺チト⁺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¹、Elhelaly Abdelazim²、明田 悠希¹、兵藤 文紀²、松尾 政之²、大澤 毅¹、小松 徹³、浦野 泰照^{3,4}、齋藤 雄太郎¹、山東 信介¹ (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¹、川井 麻那歌¹、鈴木 寧々¹、佐藤 智典¹、松原 輝彦¹ (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¹、*徐 千茗²、平賀 健太郎³、早出 広司⁴、津川 若子¹、池袋 一典¹、浅野 竜太郎¹ (1. 東京農工大学大学院工学部、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^{1,2}、川畑 まどか¹、藤田 和弘²、平間 正博¹、* 円谷 健¹ (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¹、尾台 俊亮¹、伊藤 栄紘¹、蒲池 利章¹ (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^{1,2}、民谷 栄一^{1,2} (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^{1,2}、Liao Hao-Xiang²、Li Menglu^{1,2}、藤田 克昌^{2,1} (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¹、金子 諒右²、立石 宙也¹、古賀 朗寛¹、細川 尊夏¹、加隈 綾晟¹、谷戸 謙太¹、山中 皓太¹、新居 輝樹²、岸村 顕広^{2,3}、森 健²、片山 佳樹^{2,3} (1. 九州大学システム生命科学府、2. 九州大学工学部、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¹、成住 凌¹、北村 裕介¹、勝田 陽介¹、井原 敏博¹ (1. 熊本大学大学院先端科学研究部)
- [2P-105] SolutionDesignerRDBによる実験自動化の試み
*酒井 雄介¹ (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¹、三枝 拓^{1,2} (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
高校生参加企画 *小林 袈乃¹、三枝 拓^{1,2} (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～
高校生参加企画 *福田 百合野¹ (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¹、石原 大馳¹ (1. 茨城県立並木中等教育学校)

ポスター発表 | 1P-01~1P-109

ポスター発表

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

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

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

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

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

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

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

群、2. 物質・材料研究機構 高分子・バイオ材料研究センター)

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

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

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

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

[1P-83] 光誘導電荷分離分子搭載ナノディスクによる細胞膜電位の制御

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

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

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

[1P-85] 簡便かつ迅速な Zn置換クロロフィル誘導体の調製方法の開発

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

[1P-86] 血小板が結合した血中循環がん細胞の3Dイメージング解析

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

[1P-87] 光増感色素固定化基板の作製と間葉系幹細胞への影響評価

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

[1P-88] 交流電場による細菌の Swarming運動促進効果

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

[1P-89] 電子移動反応を駆使した可視光光解除性保護基の開発

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

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

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

[1P-91] イソプレノイドを配位結合で捕捉するホスト分子の開発

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

[1P-92] ミトコンドリアにおけるタンパク質合成を検出する

蛍光プローブの開発

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

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

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

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

科学センター)

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

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

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

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

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

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

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

【目的】

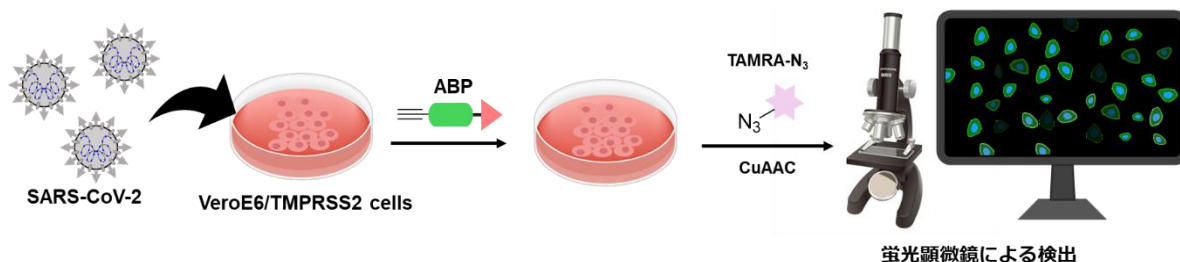
重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は、2020 年に世界的な大流行へと発展した COVID-19 の原因ウイルスである。SARS-CoV-2 のウイルス複製における重要因子として 3CL プロテアーゼ (3CLpro) が知られており、抗 COVID-19 治療戦略の標的として注目されている。これまでに 3CLpro に対する創薬研究を中心として、結晶構造解析や成熟化機構など様々な研究が展開されてきた。3CLpro に関する特性や機能への理解が深まる中で、SARS-CoV-2 感染細胞内における 3CLpro の分布や活性発現、細胞内局在などは十分に解明されてい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

【方法・結果】

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

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

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



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

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

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

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

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

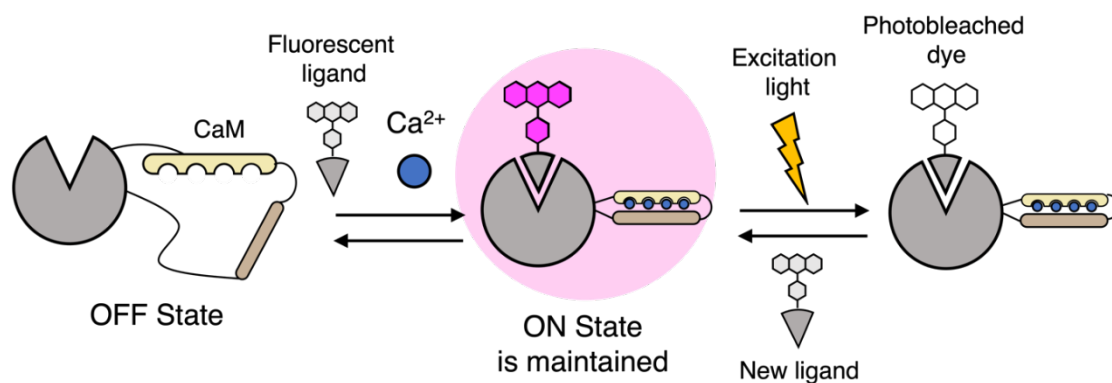


Figure 1. eDHFR 型化学遺伝学 Ca^{2+} センサーの模式図

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

ジスルフィド結合含有蛋白質のフォールディング反応中間体の検出

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

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

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

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

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

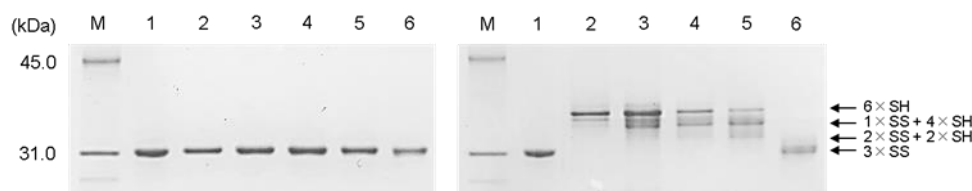


図 1 トリプシノーゲン様酵素(proCCN)のリフォールディング反応溶液を *N*-エチルマレイミド(左)あるいは Male-Arg₅-Tyr-NH₂ (右)で処理した反応混合物の SDS-PAGE ; レーン 1: 未処理、レーン 2-6: 反応時間 0, 1, 2, 3, 24 時間

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

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

○笹原 純・逸見奎太・吉本将悟・堀 克敏（名大院工）

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

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

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

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

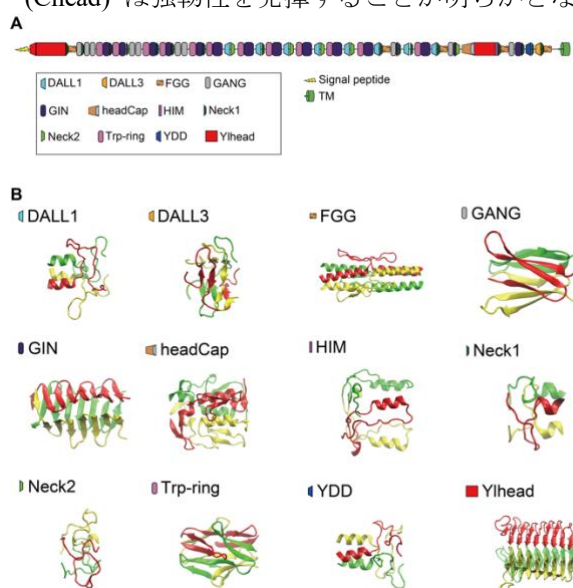


図 1 (A) AtaA ファイバーと(B) 各ドメインの構造

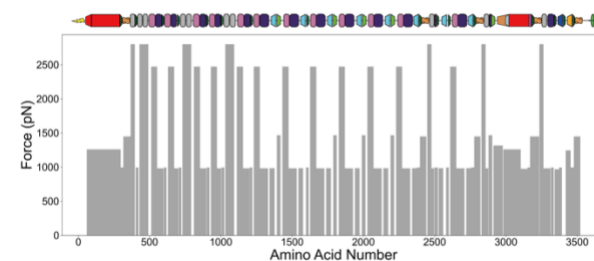


図 2 AtaA のドメイン-力学強度マッピング

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

○足立柚斗・藤沢修斗・加藤俊介・林 高史（阪大院工）

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

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

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

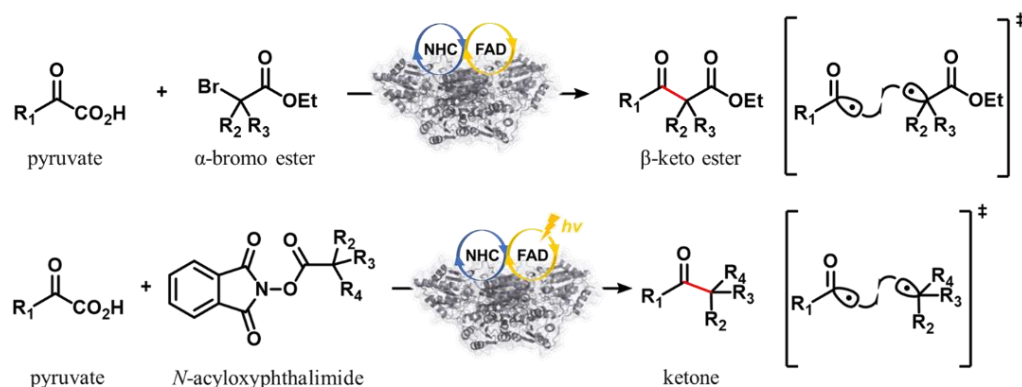


図 1 FAD/ThDP 依存性酵素が触媒する非生物学的ラジカルカップリング反応

シトクロム P450BM3 による非天然基質の酸化を促進する

ジカルボン酸導入デコイ分子の開発

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

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

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

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

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

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

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

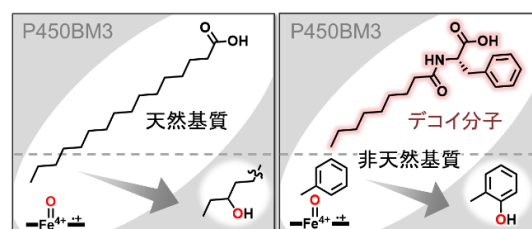


図 1. P450BM3 による反応 (左)天然基質の水酸化(右)デコイ分子によるトルエンの水酸化

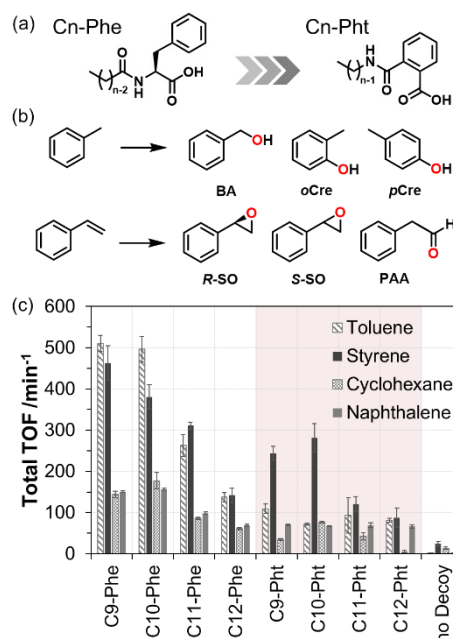


図 2. (a)従来型デコイ分子と新規骨格デコイ分子の構造 (b)トルエン水酸化とスチレンエポキシ化 (c)各反応の速度

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

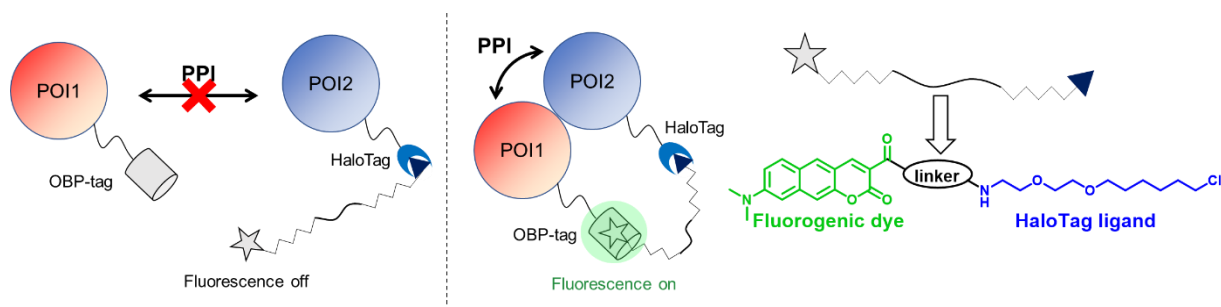
Development of Fluorescent Probes for Detection of Protein-protein Interaction Using a Reversible Labeling System

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

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

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

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



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

野生型と一残基変異型サブユニットからなる

二量体ががん関連酵素の高純度精製方法の確立

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

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

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

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

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

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

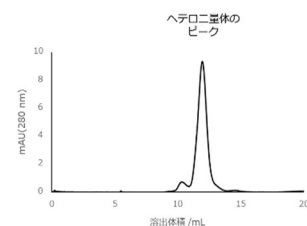


図 1 最終ゲル濾過クロマトグラフィーの結果

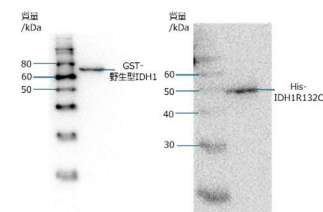


図 2 ウェスタンブロットによるタグの確認

細胞内局所の粘度計測を可能にする FRET 型粘性感受性蛍光プローブの開発

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

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

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

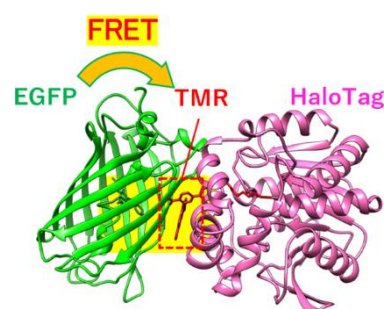


図 1 Chimera 1-TMR のデザイン

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

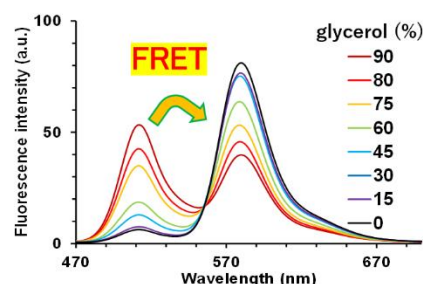


図 2 グリセロール濃度依存的な Chimera 1-TMR 蛍光スペクトルの変化 (Ex. 450 nm)

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

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

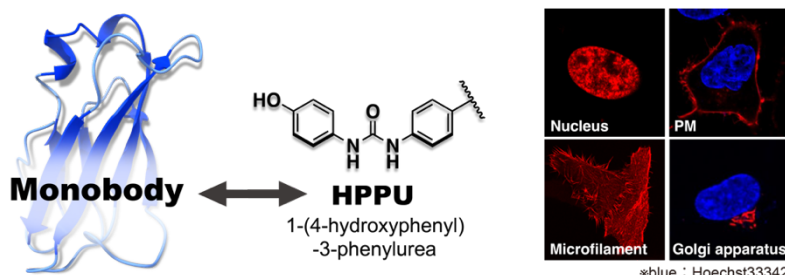
蛍光イメージングのための世界最小モノボディタグの創製

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

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

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

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



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

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

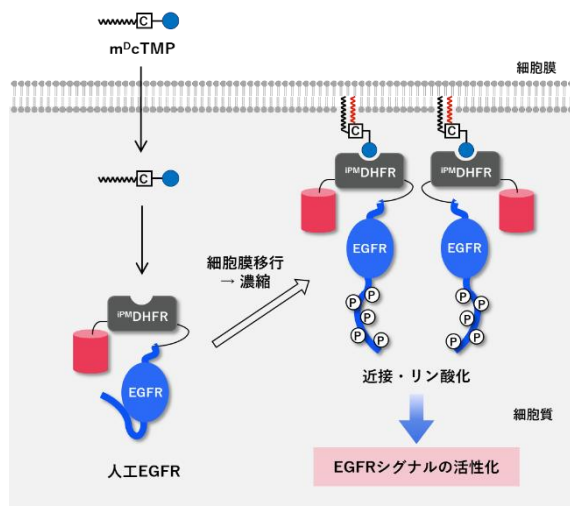
○大平修也・田原海・吉川優・築地真也 (名工大院・工)

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

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

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

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



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

翻訳後切断を指向した DNA 結合タンパク質 Rep の改変

○村山瑞季・西田慶・小島英理・三重正和（東工大生命理工学院）

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

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

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

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

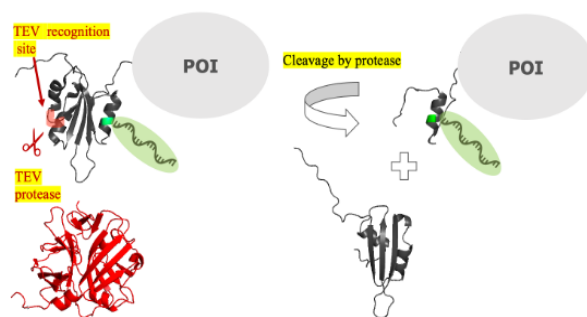


Fig. 1 Schematic illustration of post-translational cleavage of Rep by TEV protease

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

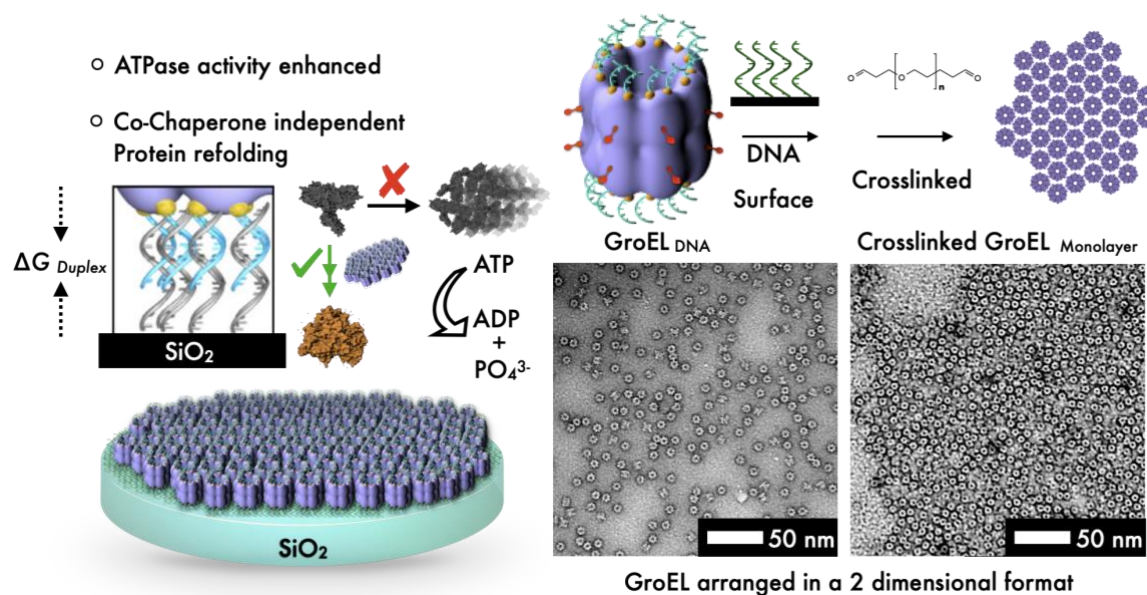
(¹Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, ²RIKEN Center for Emergent Matter Science, ³Institute of Innovation Research, Tokyo Institute of Technology)

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

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

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

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



[References]

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

寛容にタンパク質を認識するチオール化合物の酸化的フォールディング促進効果

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

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

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

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

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

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

抗 CLIC1 モノクローナル抗体の結合特性とがん浸潤抑制効果

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

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

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

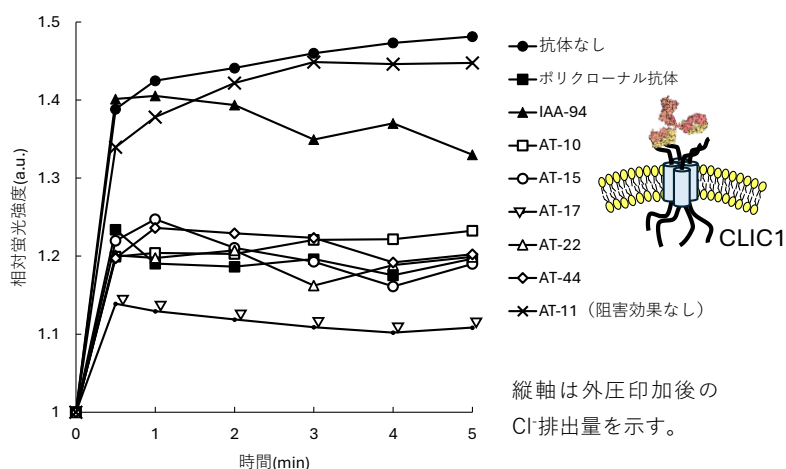


図 1 モノクローナル抗体によるマウス乳がん細胞の Cl⁻排出阻害

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

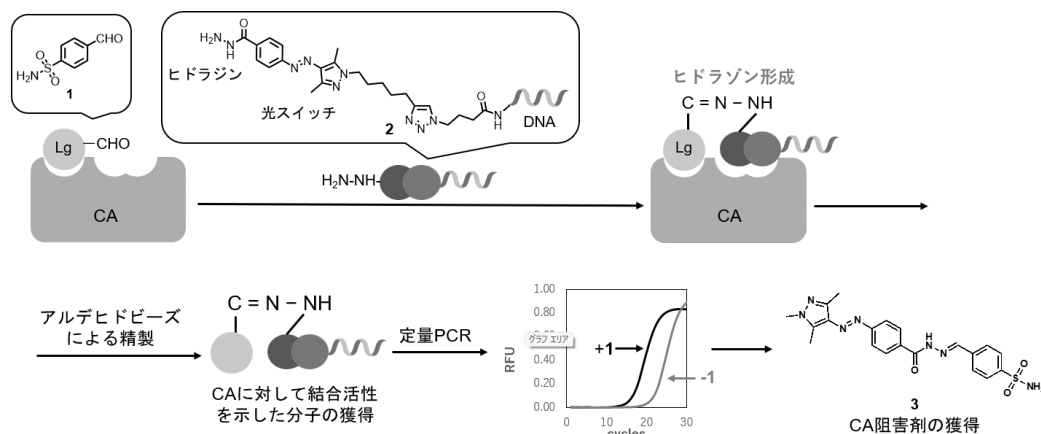
○瀬川友香¹・藤原壮汰¹・松尾和哉¹・和久友則¹・小堀哲生¹ (京工繊大)

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

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

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

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



Scheme 1. Schematic workflow of this study

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

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

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

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

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

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

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

実際に分子内に3つのSS結合を有するタンパク質

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

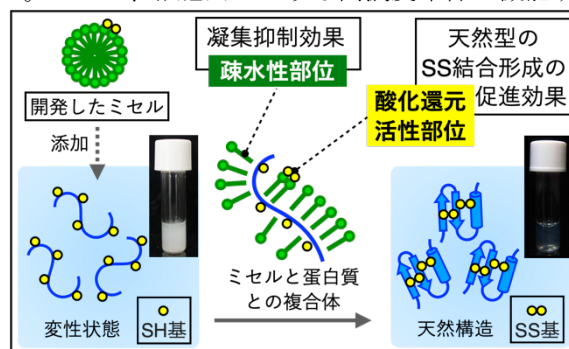


図 1. 本研究のコンセプト

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

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

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

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

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

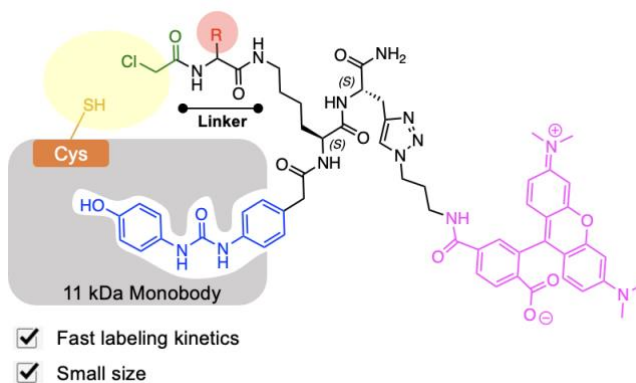


Figure 1. Schematic of covalent HPPU-Monobody tag

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

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

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

細菌細胞表層ファイバータンパク質のメチル化修飾

○井上翔理・吉本将悟・堀克敏（名大院工）

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

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

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

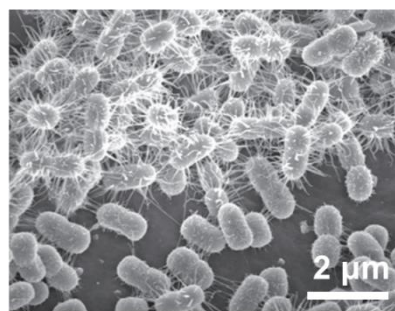


図1. ファイバー状のタンパク質を介して凝集する *Acinetobacter* sp. Tol 5

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

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

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

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

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

外的刺激による pH 応答性伸縮タンパク質集合体の運動制御

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

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

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

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

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

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

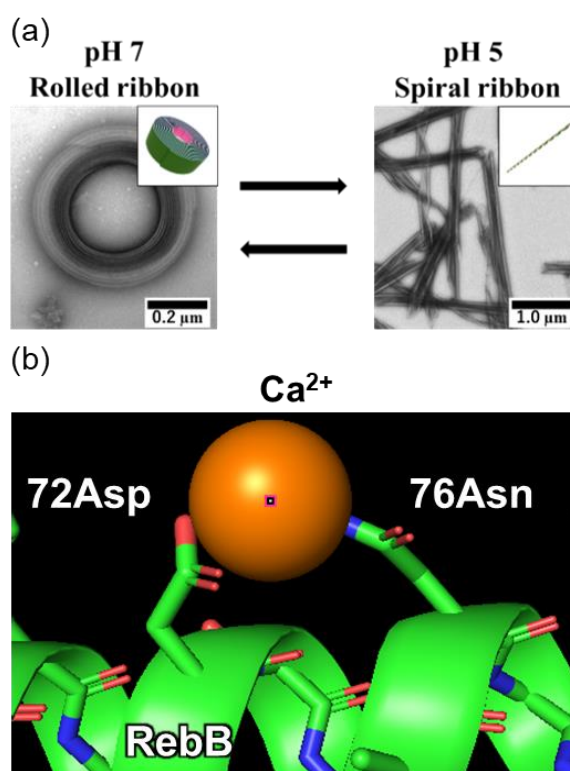


Fig.1 (a) TEM image of R-body.² (b) AlphaFold3 model for RebB and metal ions (Ca^{2+}).

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

ジャスモン酸関連主要転写因子 MYC に対する選択的低分子阻害剤の開発

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

(¹東北大院理、²理研 環境資源科学研究センター、³東北大院生命科学)

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

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

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

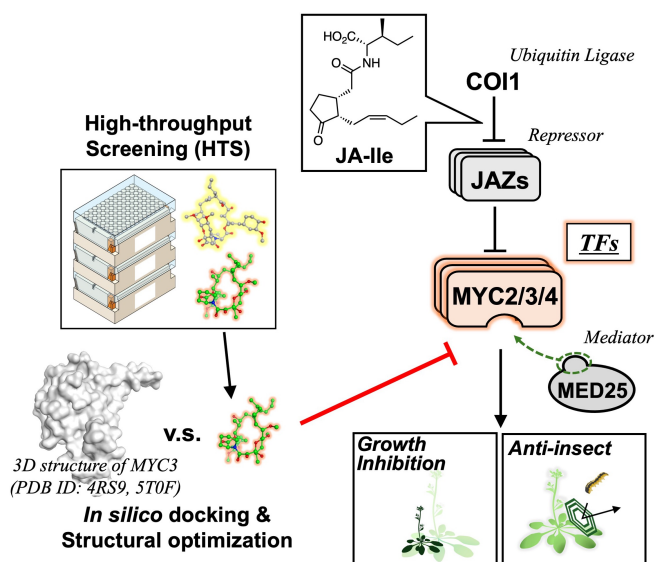


図1. ジャスモン酸シグナル伝達経路の概要
及び MYC 阻害剤の HTS と構造最適化。

REFERENCES

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

合成分子による GLUT4 の膜動態の操作

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

Control of GLUT4 Dynamics Using Synthetic Molecules

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

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

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

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

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

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

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

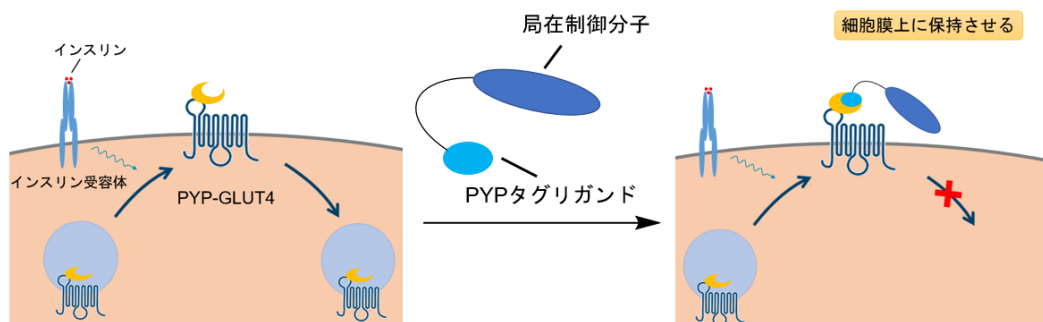


Fig. 1 合成分子による GLUT4 動態の操作

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

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

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

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

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

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

【背景・目的】

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

【方法・結果】

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

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

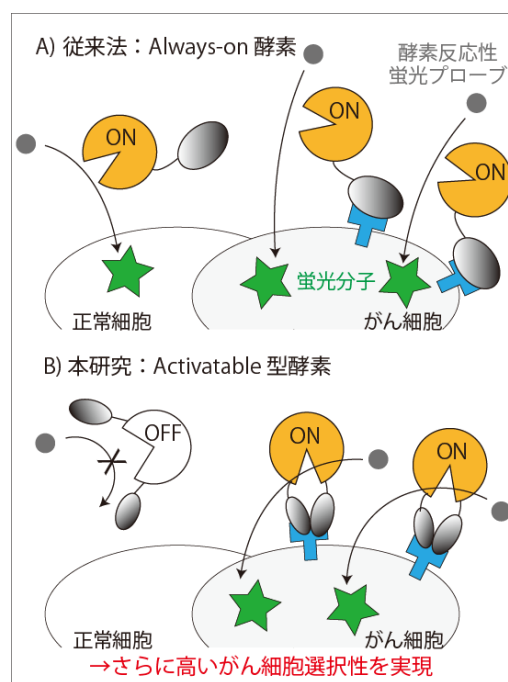


Fig. 1 本研究のコンセプト

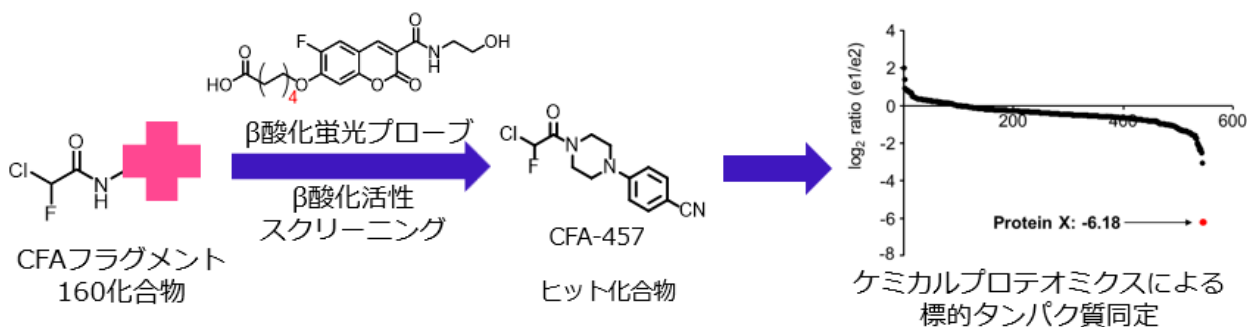
β酸化活性を指標とした代謝フェノタイプスクリーニング

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

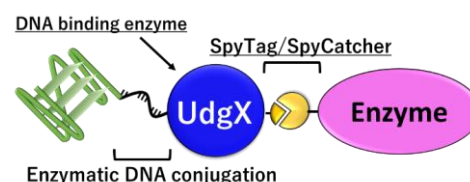


図 DNA-タンパク質複合体の作製

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

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

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

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

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

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

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

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

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

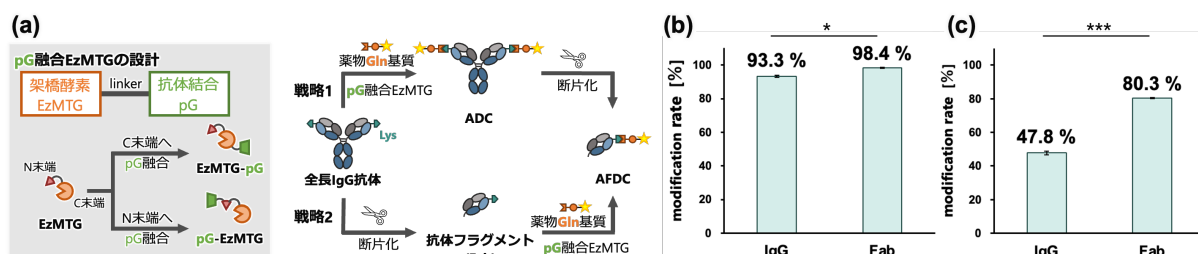


Fig. 1. (a) Conceptual diagram of this research. (b, c) Modification rates of a fluorescently modified Gln-donor substrate by EzMTG-pG or pG-EzMTG. $N = 3$; mean $\pm$ SE; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

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

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

リボソームディスプレイ法を用いたアデノシン A2A 受容体の指向性進化

○深澤元喜¹・松岡佑真²・堂浦智裕²・清中茂樹²・松浦友亮³

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

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

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

無細胞翻訳系に A_{2A}R をコードする DNA と 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG)- nanodisc を加え、37°C で 18 時間インキュベーションすることで A_{2A}R を *in vitro* で合成した。合成した A_{2A}R のリガンド結合能は、アンタゴニストである ZM241385 を蛍光修飾した ZM-Cy3 を用いた Fluorescence Size Exclusion Chromatography (FSEC) によって確認し、合成条件を検討した。次に、検討した合成条件を用いて、Protein-Ribosome-mRNA の三者複合体をビオチン修飾 ZM241385 (ZM-PEG12-Biotin) 共存下で合成し、Streptavidin ビーズによって mRNA を回収できるかどうかを検証した。ZM を代わりに加えた場合と比べて ZM-PEG12-Biotin 添加時には 1000 倍程度の mRNA を回収することできた。続いて、A_{2A}R への RD 法の適用が示唆されたのでスクリーニングの対象となる DNA ライブラリを作成した。リガンドとの親和性が変化した変異体を取得するために細胞外ループに着目し、飽和変異を導入した 2 つの DNA ライブラリを作成した。作成した変異体ライブラリを用いて RD 法により *in vitro* スクリーニングをおこない、各ラウンドでの変異体の多様性を NGS で解析した。

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

【参考文献】

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

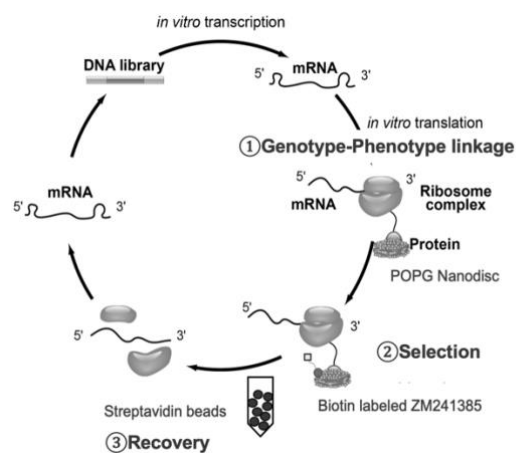


Fig.1 Schematic view of Ribosome Display

マグネトソーム膜上の脂質組成調節による膜受容体の機能解析

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

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

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

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

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

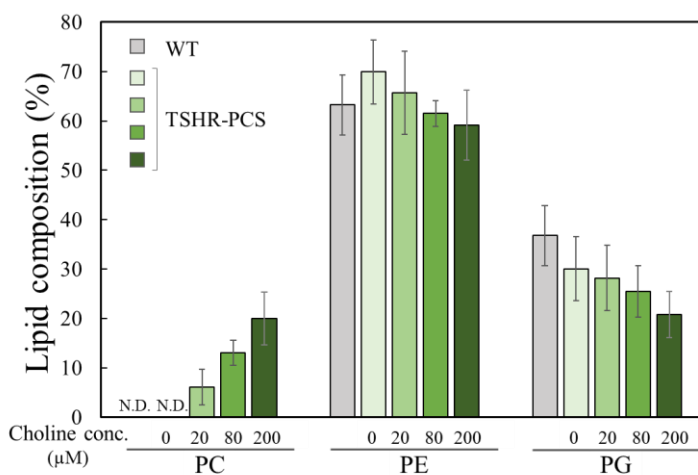


Fig. Lipid composition of the magnetosomes in *M. magneticum* wild-type (WT) and transformants (TSHR-PCS) cultured with various choline concentration.

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

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

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

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

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

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

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

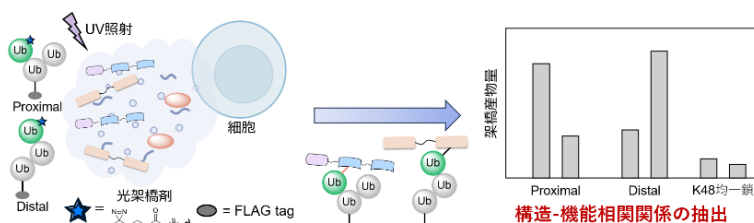


Fig. 1. 光架橋型不均一ユビキチンによる URP 捕捉と相互作用解析

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

○谷歩峻・野尻正樹（阪大院理）

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

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

[3Fe-4S]

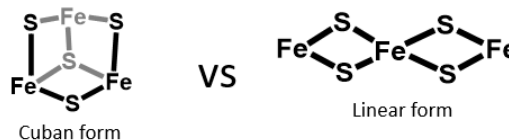
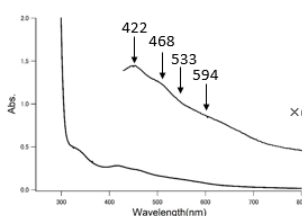


Fig1. [3Fe-4S]がとりうる構造

Spectroscopic

UV-vis



ESR spectrum

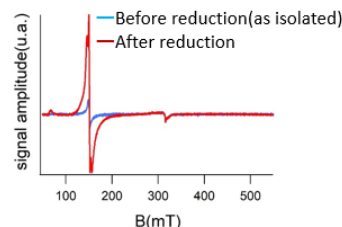


Fig2. MBP-GciSの分光学的解析

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

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

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

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

相同組換え誘導が可能な Cas9 変異体取得法の開発

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

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

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

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

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

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

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

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

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

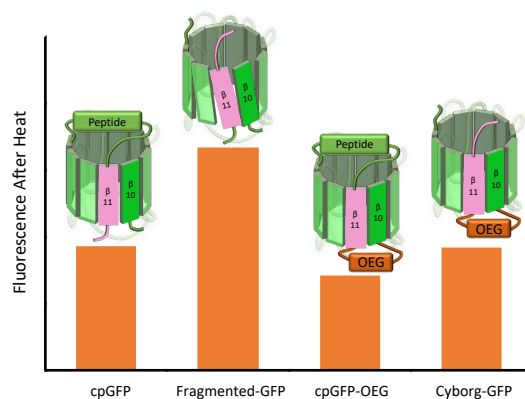


Figure 1. Fluorescence intensity of GFPs after heat treatment.

細胞骨格様 2 成分蛋白質チューブの創生

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

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

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

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

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

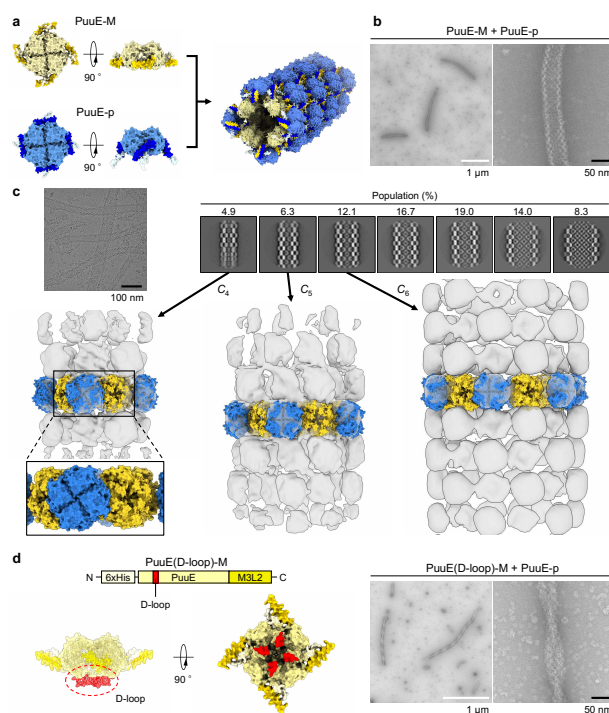


図 本研究の全体像

エピジェネティクスタンパク質を分解誘導する EpiTAC 技術の開発

○安田壮秀¹・森廣邦彦¹・岡本晃充¹（¹東大院工）

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

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

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

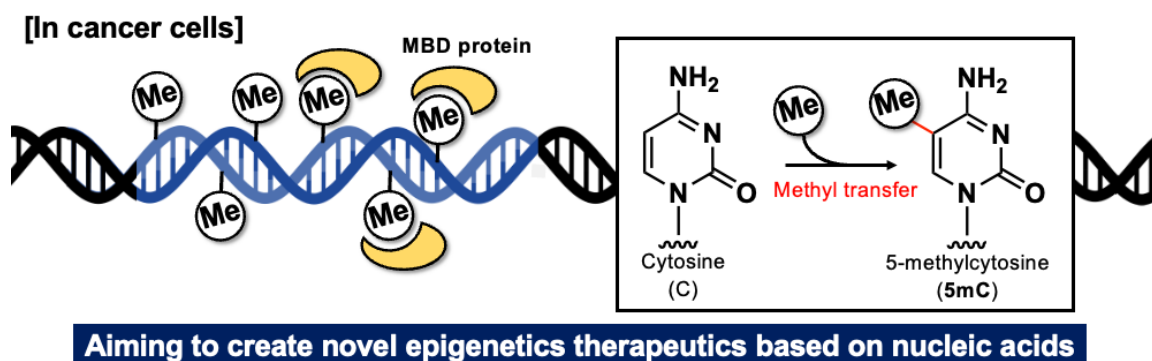


図. シトシン 5 位のメチル化

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

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

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

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

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

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

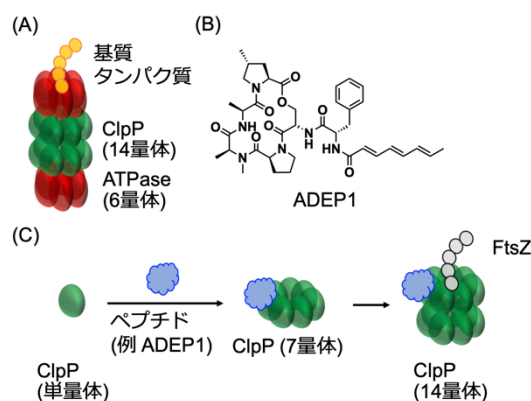


図. (A) 細菌のタンパク質分解系. (B) ADEP1 の構造. (C) ADEP1 の多量体形成機構.²

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

タンパク質化学修飾を指向した生理条件でのナイトレン発生法の開発研究

○豊島暖生・笠原彰友・山次健三（千葉大院薬）

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

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

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

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

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

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

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

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

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

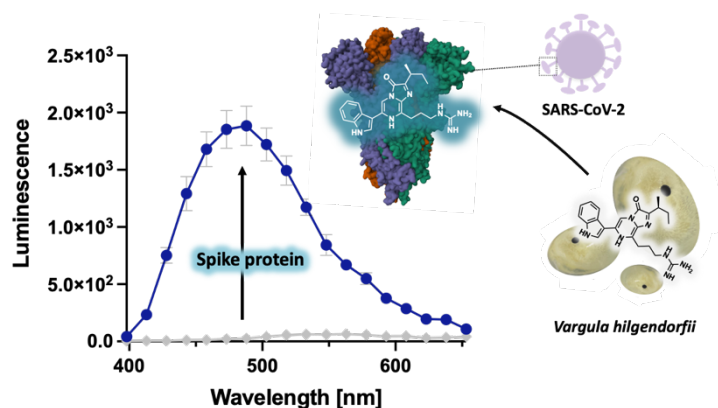


図1 擬似ルシフェラーゼ活性の発見：SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質がウミホタル由来発光基質の発光反応を触媒した。

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

人工細胞膜上で二量化可能な膜貫通人工核酸三重鎖の開発

○劉凱夫・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

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

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

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

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

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

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

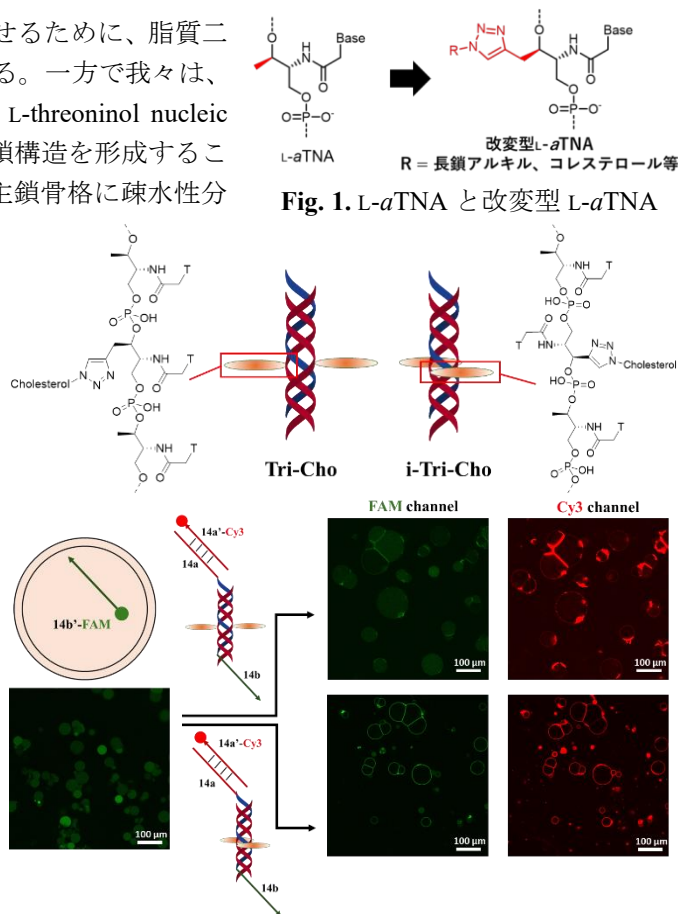


Fig. 1. L-aTNA と改変型 L-aTNA

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

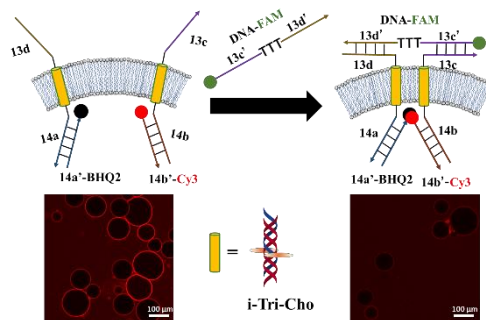


Fig. 3. i-Tri-Cho の膜上での二量化

光架橋性新規修飾塩基導入SNAの合成とSNA/RNA二重鎖の光制御

○池田彩華・佐藤史経・村山恵司・浅沼浩之（名大院工）

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

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

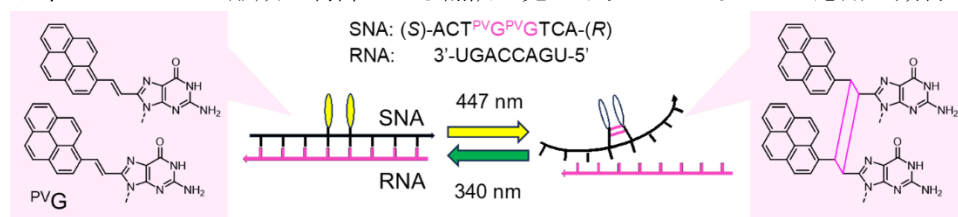


Fig. 1. Design of photo-regulation system using SNA involving PVG.

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

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

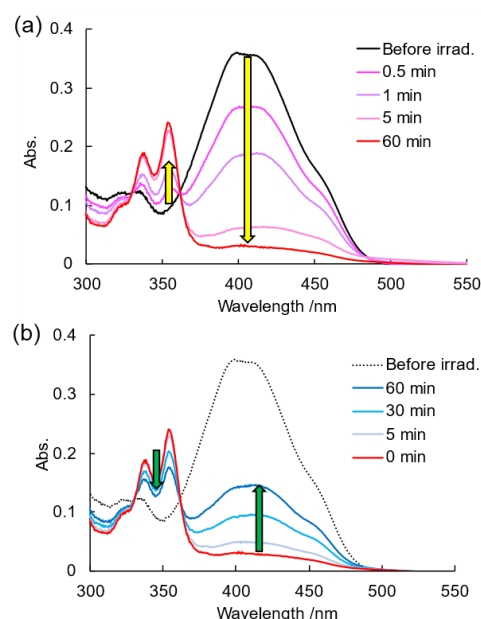


Fig. 2. Absorption spectra of PVG-SNA/RNA (a) after 447 nm light irradiation and followed by (b) 340 nm light irradiation.

リポソームで区画化した酵素代謝反応システム

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

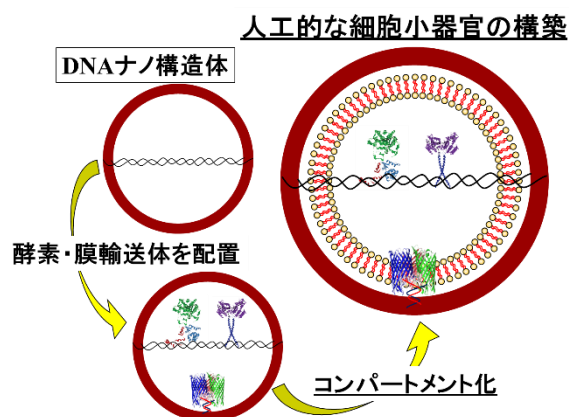


図1 酵素を内包したリポソームの構築.

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

○白川真純¹・植木亮介¹・森本淳平¹・山東信介¹ (¹ 東大院工)

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

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

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

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

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

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

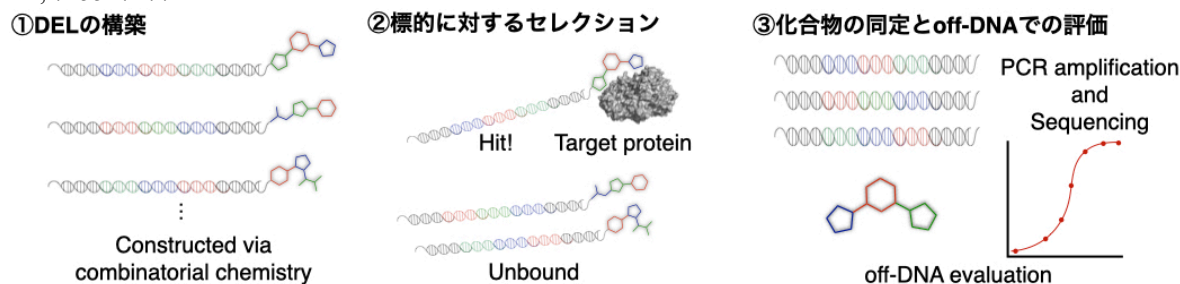


図 1. DEL スクリーニングの一般的なワークフロー

構造化したループ領域をもつグアニン四重らせん構造の液液相分離

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

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

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

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

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

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

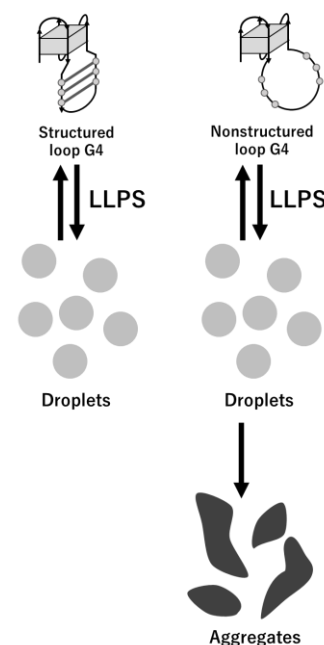


Figure 1. Effects of structured loop G4 on LLPS and aggregate.

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

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

○牧野哲直¹・田仲真紀子¹ (1 電通大院情報理工)

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

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

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

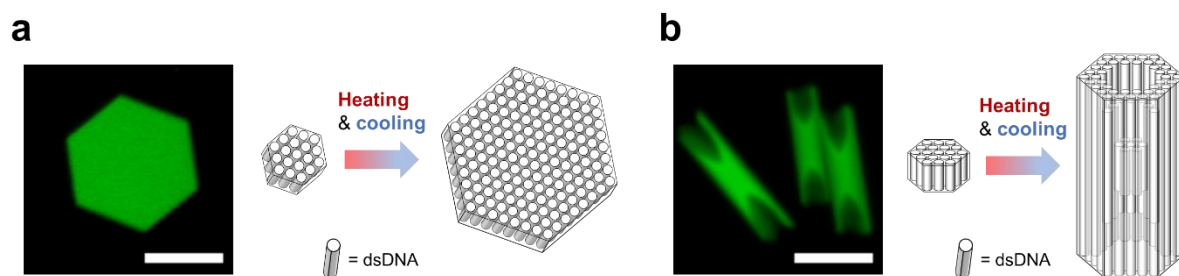


図 1. SYBR Green I で染色した DNA 集合体の蛍光画像と模式図 (a)一種類の短鎖 DNA で形成される六角形構造体および、(b)二種類の短鎖 DNA で形成されるシリンダー状の構造体。スケールバー：10 μm

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

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

○野原玲奈¹・棚谷 優磨¹・長澤 和夫¹・寺 正行¹ (¹東農工大院工)

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

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

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

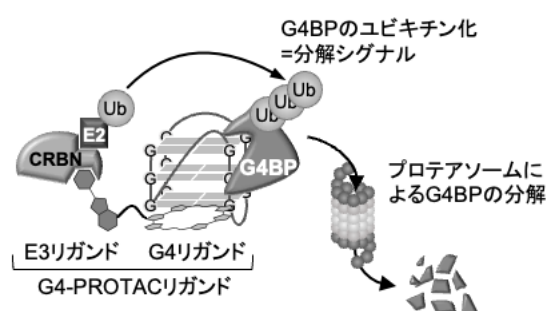


Figure 1. G4-PROTAC リガンドによる G4BP のノックアウトの概略図。

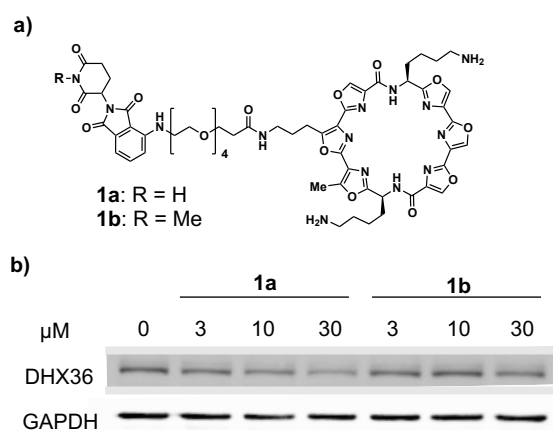


Figure 2. (a) **1a** と **1b** の構造式. (b) **1a** または **1b** を Hela 細胞に 24 時間処理した場合の DHX36 のウェスタンブロット解析の結果。

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

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

○飛田祐希¹・西原達哉¹・田邊一仁¹ (¹ 青学大院理工)

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

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

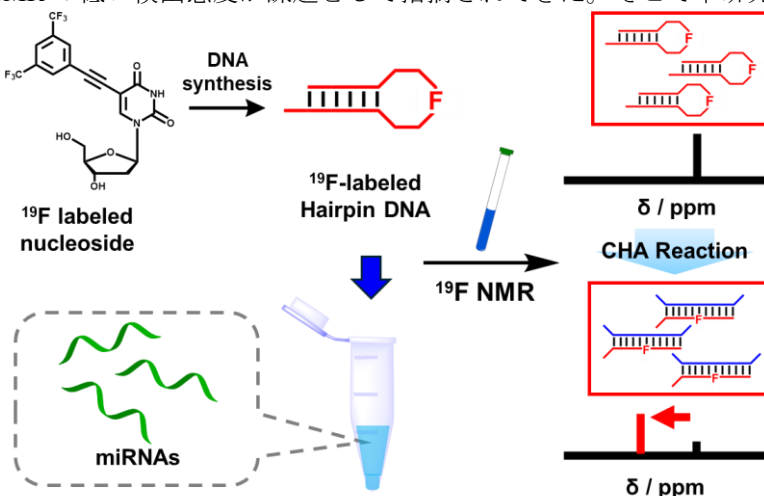


Figure 1. Schematic of miRNA detection using CHA reaction by ^{19}F NMR.

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

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

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

電位差計測で DNA 検出を行うための溶液条件の検討

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

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

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

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

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

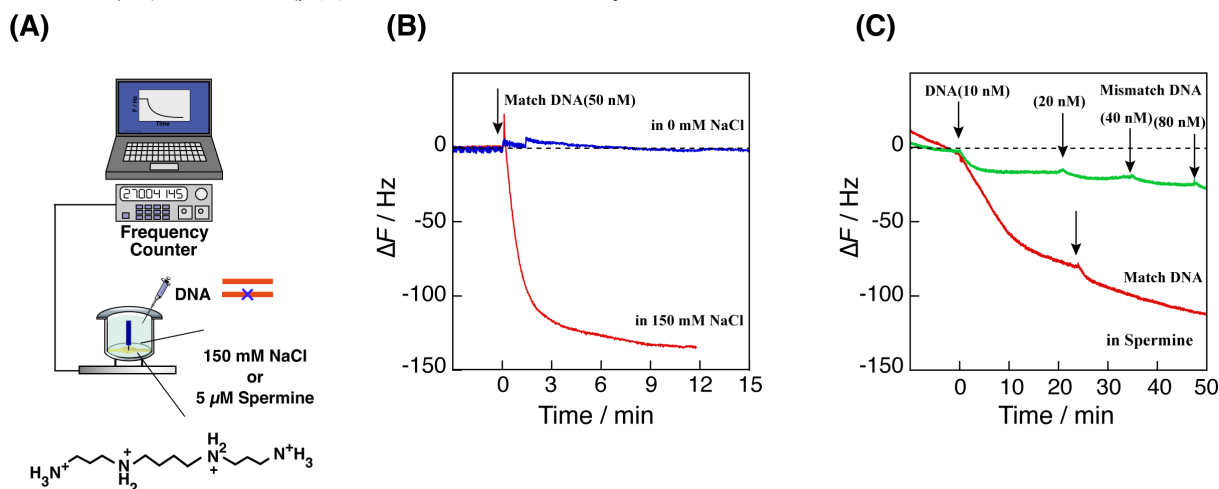


図1 (A) QCM 装置の模式図、(B) DNA 二重鎖形成の観察(10 mM Tris-HCl, pH8.0, 0 or 150 mM NaCl)、(C) スperlミン存在化での観察(1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 μ M スperlミン)

アゾラト架橋白金二核錯体の一本鎖 DNA 液滴形成能と核酸結合様式

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

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

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

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

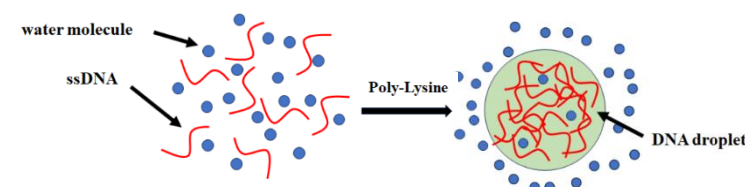


Fig. 1

Reference

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

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

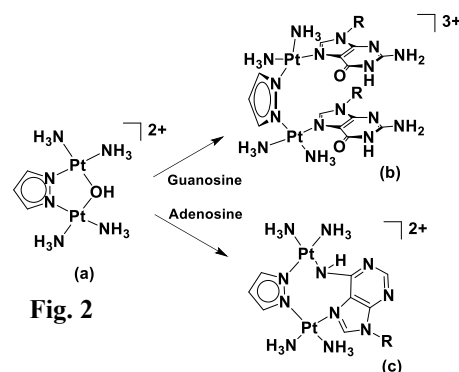


Fig. 2

人工基質 RNA を用いた ADAR2 の RNA 編集基質認識特性の解析

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

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

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

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

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

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

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

○山本こみち・千葉順哉・大石雄基・井上将彦（富山大・院薬）

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

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

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

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

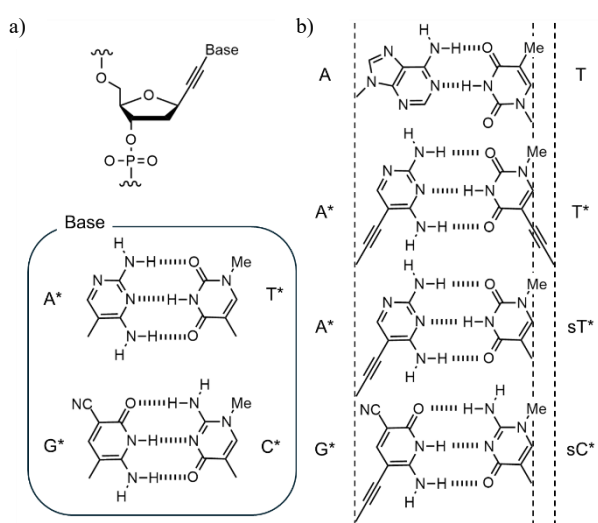


Figure 1. a) Alkynyl DNA
b) Comparison of distances between anomeric carbons of complementary strands

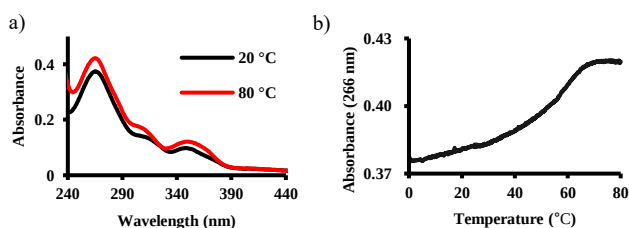


Figure 2. UV-vis and CD data for 5'-d(A*sT*A*sT*G*G*sC*sC*A*sT*A*sT*)-3' (4.0 μM) in 10 mM HEPES (pH 7.0), 10 mM MgCl₂ and 100 mM NaCl.

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

RNase H を標的としたスプリットアプタマーの開発と検出系の構築

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

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

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

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

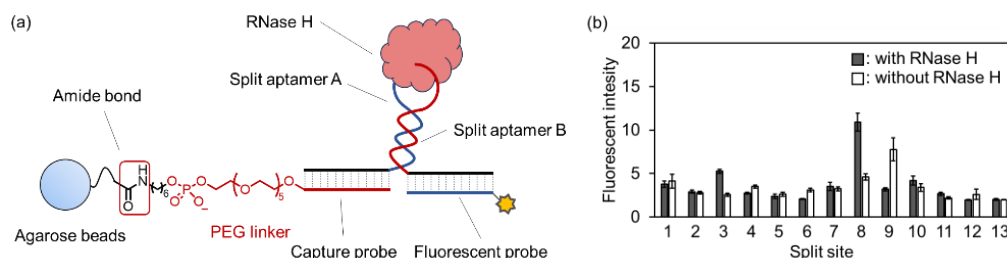


Figure 1. (a) Screening of split aptamers for recognition of RNase H. (b) Quantification of fluorescent intensity of agarose beads with each split aptamer.

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

1 細胞内の転写活性を時系列に計測する、新生 RNA ラベルシーケンス法

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

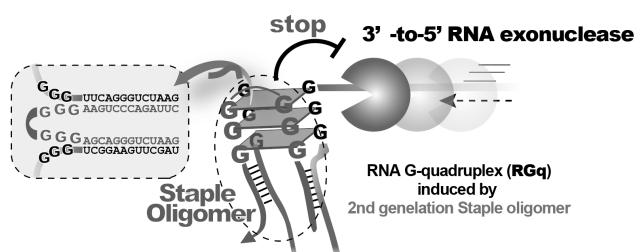


Fig. 1 Staple 核酸による mRNA 分解耐性獲得の概略図。Staple 核酸によって 3'UTR に形成された RGq が 3'-to-5' exonuclease の分解反応を阻害することによって mRNA の分解耐性が向上し、生体内半減期が延長されることによるタンパク質発現増加効果が期待される。

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

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

Controlling slip phenomena in DNA Polymerase by applying RNA hacking technology

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

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

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

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

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

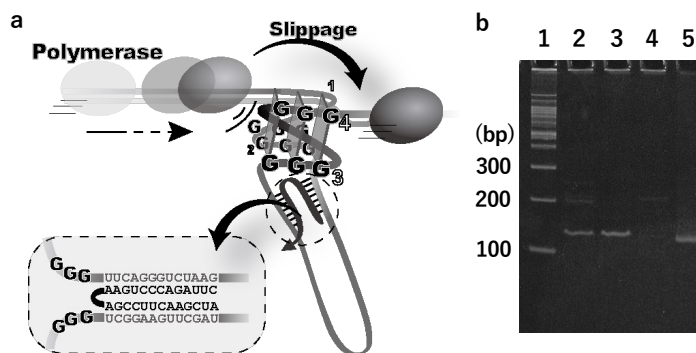


Fig. 1 a. Staple 核酸による Gq 誘導と **Slippage** の模式図。 **b.** PCR 増幅による **Slippage** の確認結果。レーン 2, 3 の 120 bp 付近に見えるバンドが **Slippage** によるバンドと考える。

蛍光色素導入 SNA らせん増幅系の評価

○杉山乙珠・浅沼浩之・樫田啓（名大院工）

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

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

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

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

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

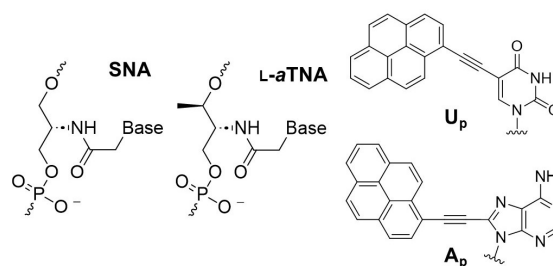


図1 非環状型人工核酸と蛍光塩基の構造

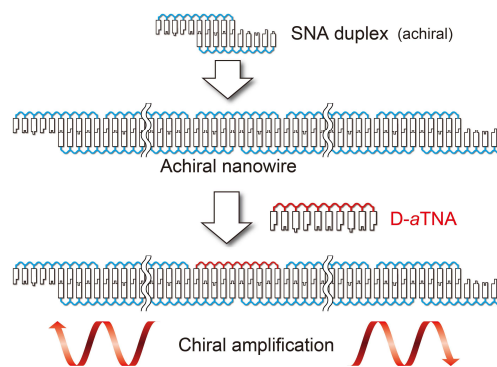


図2 SNA らせん増幅系の模式図

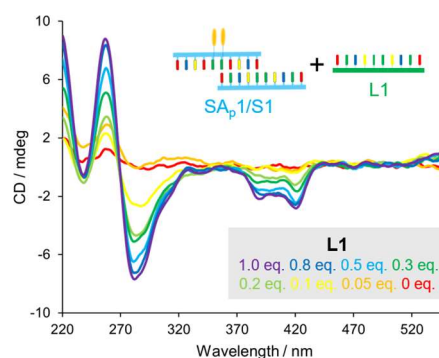


図3 SNA ナノワイヤー（SA_p1/S1）に対してL-*a*TNA（L1）を添加した際のCDスペクトルの変化

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

○藤川真広・大西和希・高橋萌・小川敦司（愛媛大プロテオサイエンスセンター）

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

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

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

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

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

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

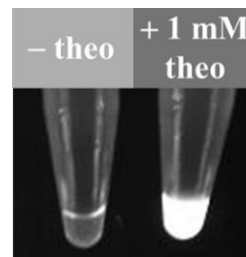


図 1: 最適 *theo* 応答リボ
スイッチの YPet 発現

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

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

速度論的機構で IRES 媒介翻訳を制御する真核リボスイッチの構築

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

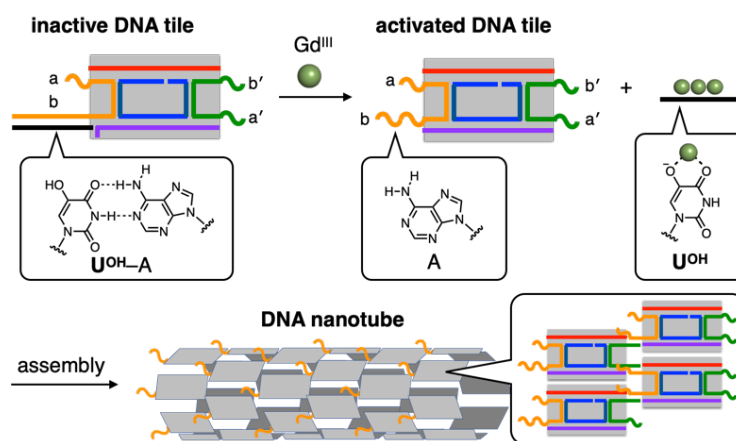


図 1 Gd^{III} イオン添加による DNA ナノチューブ構造の形成。ブロッカー鎖 (黒) は、3 個の U^{OH} 塩基を含む。相補的な粘着末端(a-a'および b-b')の二重鎖形成により、DNA ナノチューブが形成する。蛍光顕微鏡観察には、蛍光色素で修飾した DNA タイルを用いた。

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

人工塩基導入 PNA 配列解析法の開発

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

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

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

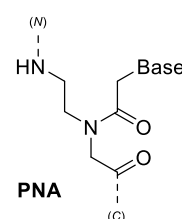


Fig. 1. Chemical structure of PNA.

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

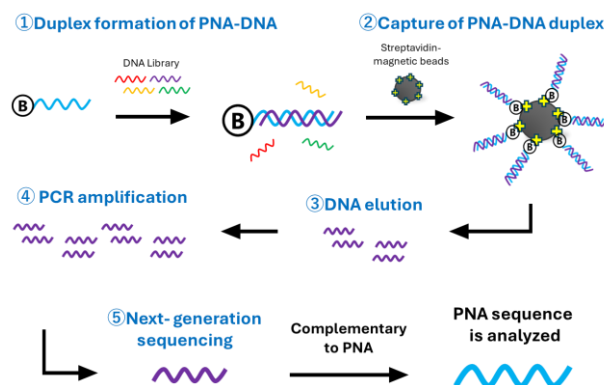


Fig. 2. Novel sequencing method of PNA using duplex formation.

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

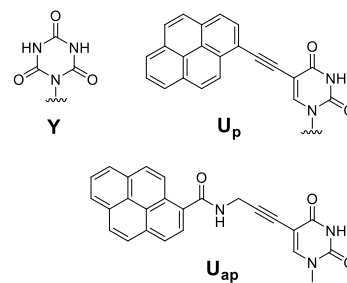


Fig. 3. Chemical structures of Y, U_p and U_{ap}.

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

二重鎖形成を利用した非環状型人工核酸 SNA の配列解析

○日比野希美・浅沼浩之・檜田啓（名大院工）

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

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

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

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

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

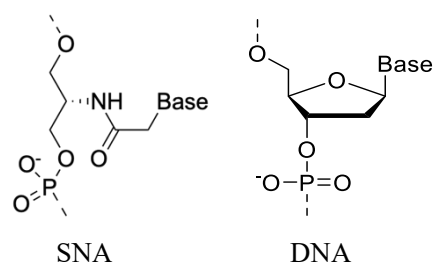


Fig. 1. SNA と DNA の構造

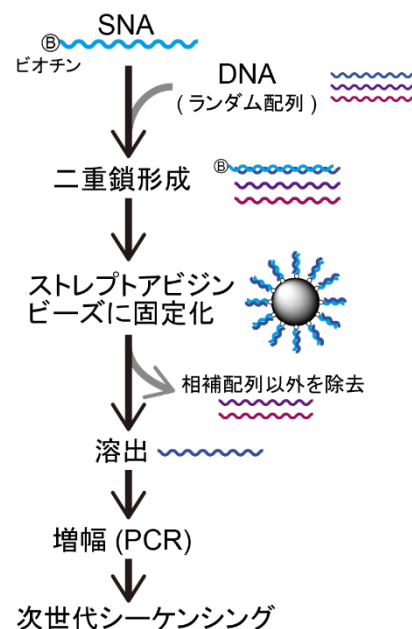


Fig. 2. 開発した配列解析法

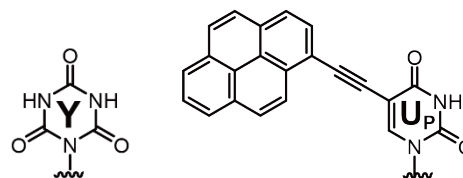


Fig. 3. シアヌル酸及びピレニルウラシルの構造

ケージド相分離液滴の光応答挙動

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

(¹岡大院統合科学、²近大総合理工)

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

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

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

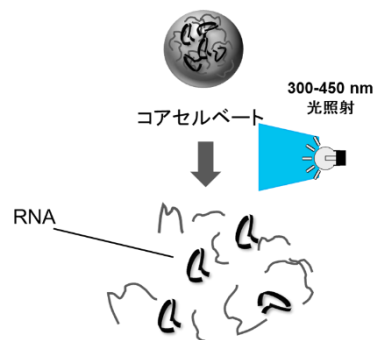


図1 コアセルベートの光依存的分散

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

ペプチド固定化ビーズを用いた環境中の鉛イオンの簡便な検出

○吉田秀平・吉田光輝・鶴岡孝章・臼井健二（甲南大院 FIRST）

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

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

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

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

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

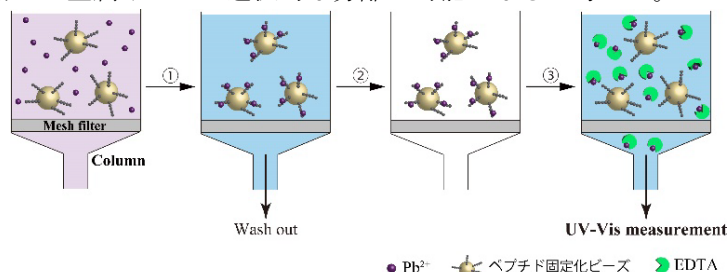


図 1 本実験の操作手順

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

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

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

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

(¹東大院工、²分子研、³京大 iCeMs、⁴東大国際高等研)

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

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

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

本研究では、球状錯体への閉じ込めにより単離された $A\beta$ 疎水性断片($A\beta_{16-23}$, KLVFFAED)会合体の NMR 構造解析を行った(Fig. 1)。 $A\beta_{16-23}$ を N 末端で2分子縮合した配位子を合成し、無修飾の配位子と Pd(II)イオンとの錯形成により2分子の $A\beta_{16-23}$ を $M_{12}L_{24}$ 錯体へ包接した⁴。 $A\beta_{16-23}$ の疎水性5残基(LVFFA)を ^{13}C , ^{15}N 安定同位体で標識することで、水性条件(50% $\text{H}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ (v/v))での会合体構造を解析した。 ^1H - ^{15}N HSQC スペクトルでは、標識された5残基に対し主ピークに加えて副ピークが観測された(Fig. 1b)。3次元 NMR で主鎖・側鎖の隣接残基間の相関を調べると、HSQC ピークは主に2組のコンフォメーションに帰属され、会合に伴う $A\beta_{16-23}$ 二分子の非対称化が示唆された。NOESY (nuclear Overhauser effect spectroscopy) NMR により、異なるコンフォメーション間、すなわち会合 $A\beta_{16-23}$ における分子間の NOE 相関が観測された。本発表では、クロスピークの帰属と NOE 相関解析により明らかになった $A\beta_{16-23}$ 会合体の NMR 構造について議論する。

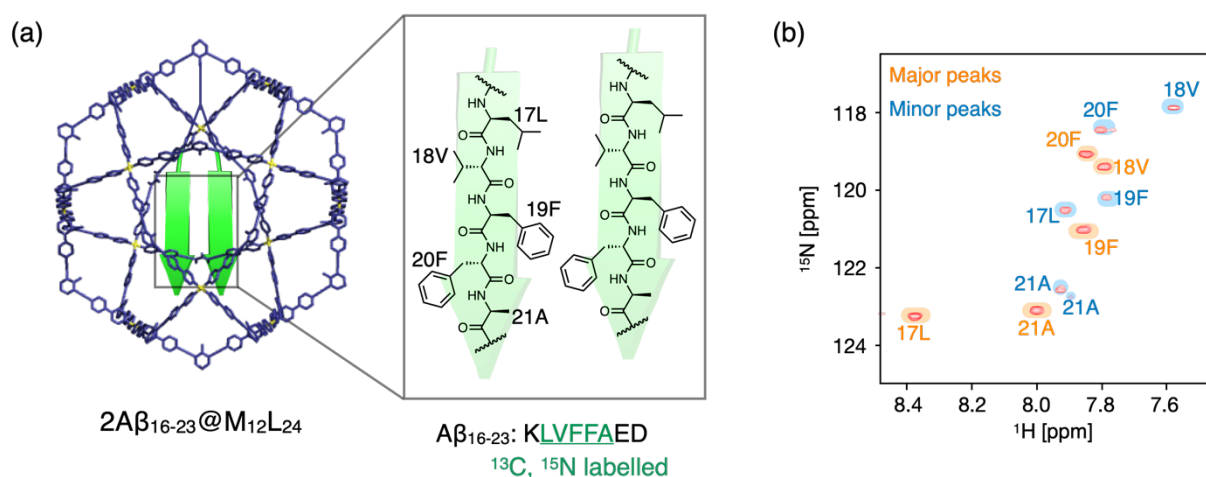


Fig 1. NMR analysis of the dimeric structure of $A\beta$ fragments ($A\beta_{16-23}$) by confinement in a self-assembled $M_{12}L_{24}$ cage. (a) Structure of two $A\beta_{16-23}$ fragments encapsulated in the cage ($2A\beta_{16-23}@M_{12}L_{24}$). (b) ^1H - ^{15}N HSQC NMR spectrum of $2A\beta_{16-23}@M_{12}L_{24}$ (500 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{CN}$ = 1:1, 300 K).

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

酵素耐性と細胞内移行性の向上を指向した二重架橋ヘリカルペプチドの開発

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

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

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

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

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

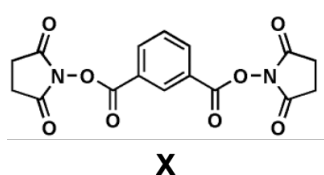


図 1 イソフタル酸型架橋剤

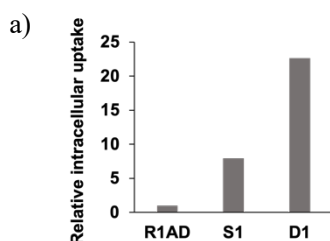
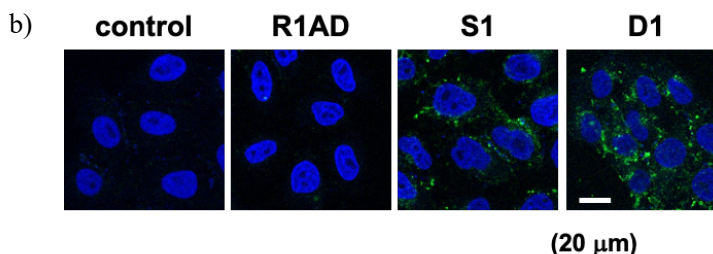


図 2 a) フローサイトメトリーによる細胞内移行性評価 b) 共焦点レーザー顕微鏡画像

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

表 1 酵素耐性評価



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

D アミノ酸を利用した大環状ヘキサデカペプチドの合理構築

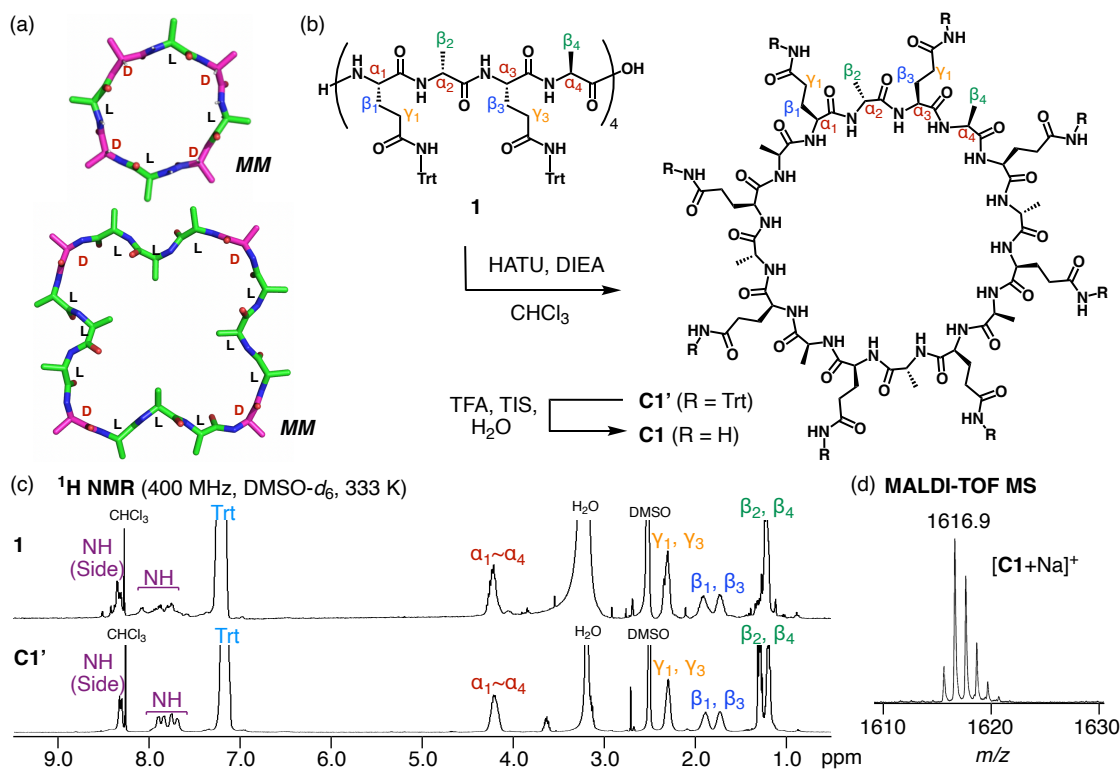
○照岡大岳¹・吉沢道人¹・澤田知久^{1,2} (¹東工大化生研、²JST さきがけ)

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

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

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

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



オリゴアルギニン付与により生じる細胞毒性を軽減する方法

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

Methods to reduce cytotoxicity caused by oligoarginine conjugation

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

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

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

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

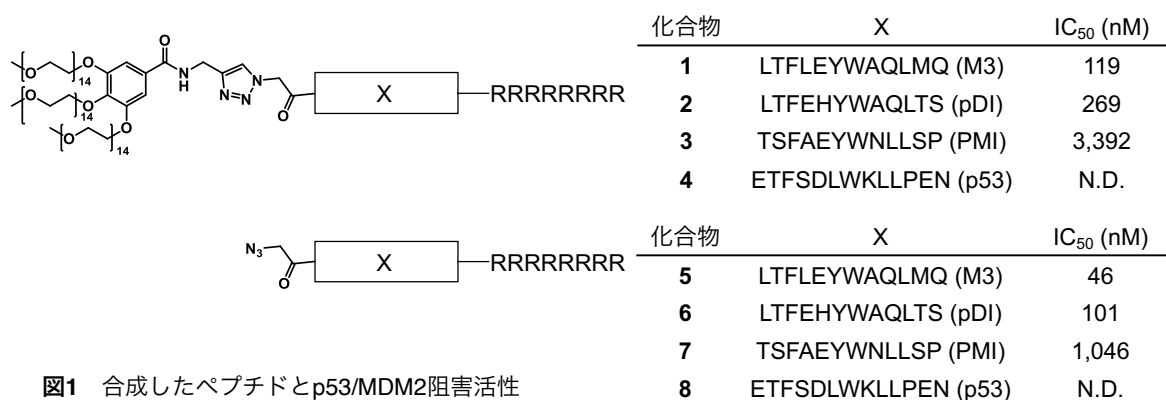


図1 合成したペプチドとp53/MDM2阻害活性

浸透圧応答的な YK ペプチド融合 sfGFP の細胞内液滴形成

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

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

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

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

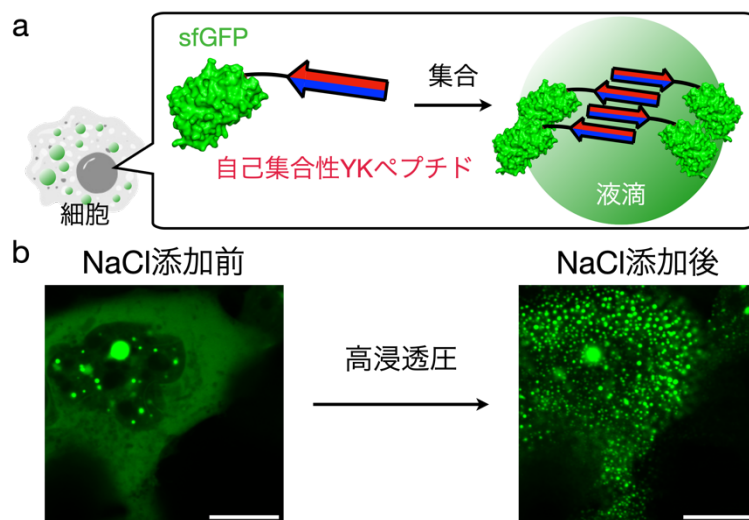


図 1. 浸透圧変化に応じた YK ペプチド融合蛋白質の細胞内液滴の形成

(a) 自己集合性ペプチド YK 融合 sfGFP による液滴形成

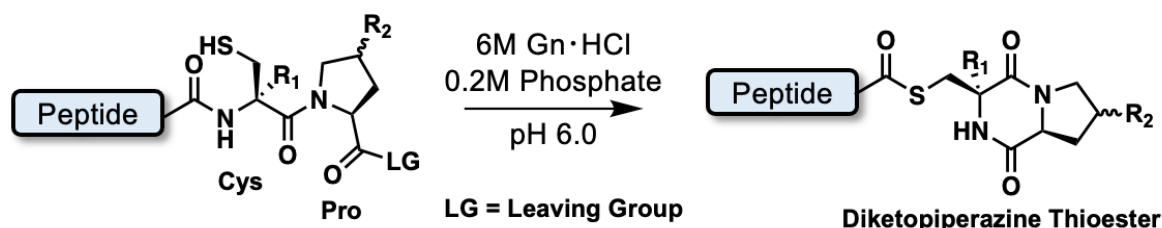
(b) 高浸透圧に応じた NES-YK11-sfGFP の液滴形成. NaCl を osmolyte として添加した 700 mOsm/L D-MEM 培地の添加前では、NES-YK11-sfGFP は細胞質で分散状態であるが、添加後 1 min で多くの液滴が形成した。(scale bar 10 μ m)

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

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

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

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



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

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

分割インテインを用いた標的タンパク質結合ペプチドの探索

○信澤佳奈、渡辺雄太郎、高橋剛（群馬大院理工）

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

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

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

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

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

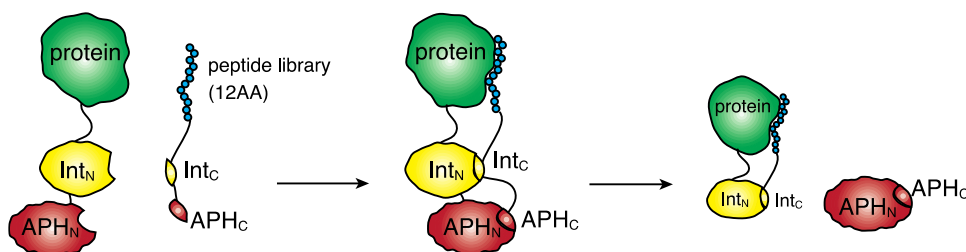


図 タンパク質-ペプチド間相互作用に依存した PTS 反応

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

分割インテインを用いた特定のペプチド配列を認識するタンパク質の探索

○清水もも花・信澤佳奈・高橋剛（群馬大院理工）

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

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

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

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

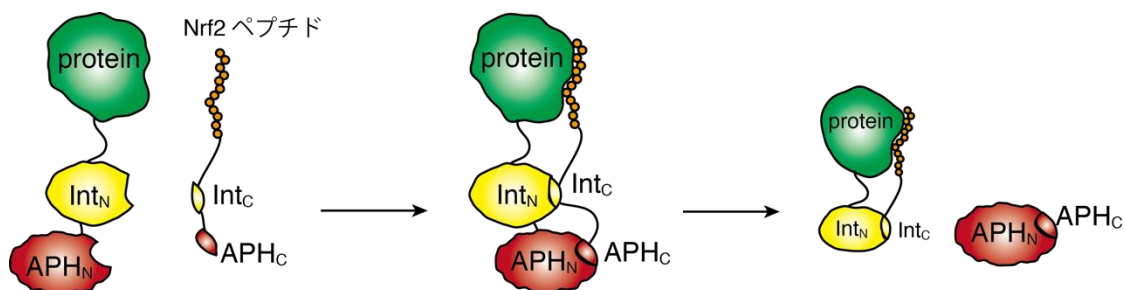


図 分割インテインと分割 APH を用いた Nrf2 ペプチドに結合するタンパク質の探索の模式図

1. Hagiwara, H., Fujii, E., Iwabuchi, T., Takahashi, T. (2024) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **97**, uoac019.

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

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

(¹群馬大理工、²群馬大院理工、³東京都医総研、⁴理研)

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

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

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

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

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

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

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

ナノポアライブラリの構築および測定・解析手法の確立

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

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

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

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

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

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

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

細胞認識部位含有ペプチドによる金ナノロッドの修飾と

疎水環境による抗ガン剤の担持性能評価

○山岡湖ノ波¹・今井崇人¹・浅野昌弘²・富崎欣也¹ (龍谷大先端理工)

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

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

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

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

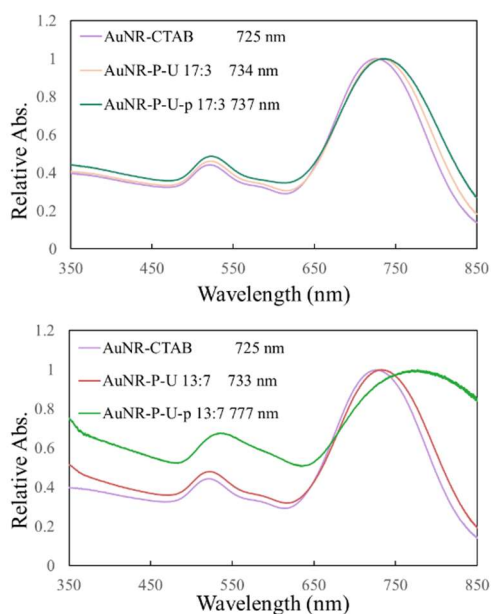


Fig. 1. 各複合体の UV-vis 吸収スペクトル

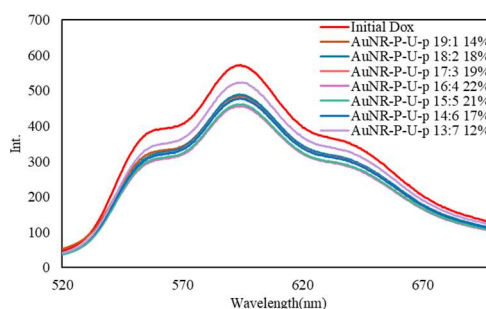


Fig. 2. 蛍光スペクトル

肝細胞ガン標的ペプチドで修飾した金ナノロッドによるフォトサーマル効果の検証

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

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

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

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

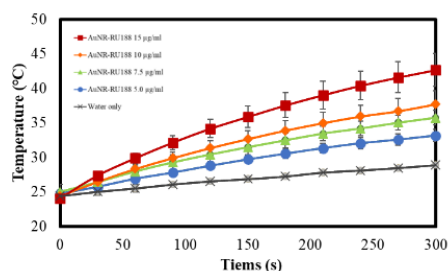


Fig 1 .AuNR-P-RU188の照射実験

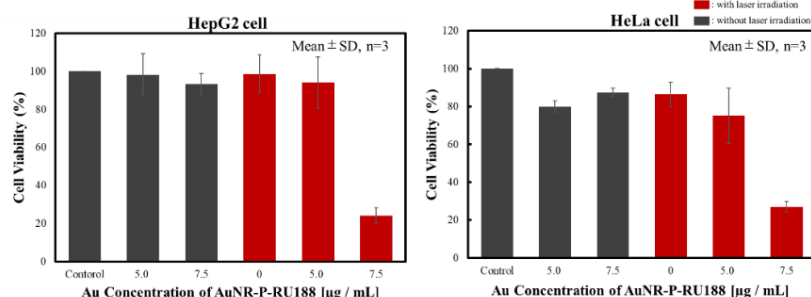


Fig 2 .AuNR-P-RU188の細胞毒性評価

また、808 nm NIR を $2\text{W}/\text{cm}^2$ の強度で 5 分間照射した。金ナノロッド-ペプチド複合体溶液は 5 分間の照射で最大 43°C まで上昇した(Fig 1)。

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

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

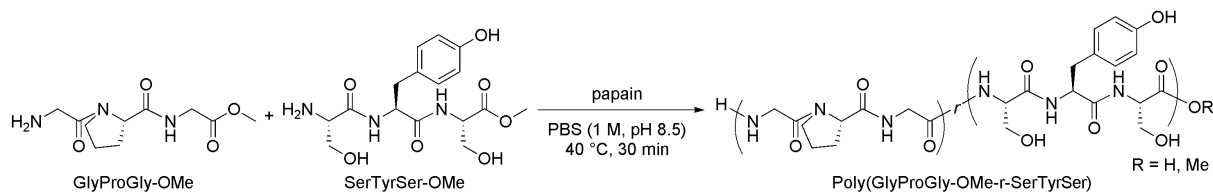
ジチロシン架橋によるレジリン様ポリペプチドの化学酵素合成

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

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

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

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



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

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

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

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

MTS 誘導体を用いたがん選択的なペプチドの合成と特性評価

(¹ 龍谷大先端理工,² 龍谷大農) ○齋田颯心¹、山崎正幸²、富崎欣也¹

Synthesis and characterization of a mitochondria transfer signal peptide derivative.

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

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

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

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

Fig. 1 ミトコンドリア移行シグナルペプチド誘導体のアミノ酸配列

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

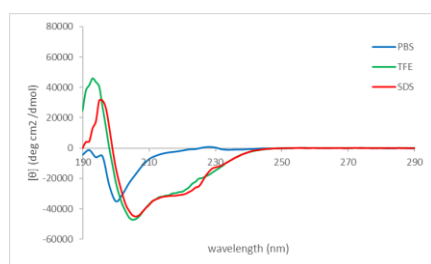


Fig. 2 MTS Δ C-pA の CD スペクトル

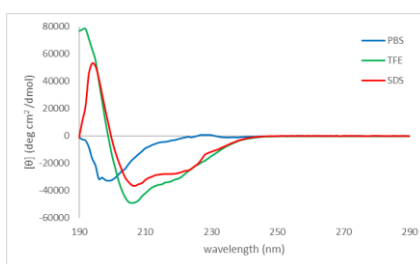


Fig. 3 MTS Δ N-pA の CD スペクトル

電気化学発光による脂質二分子膜に対する抗菌ペプチド作用の評価

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

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

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

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

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

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

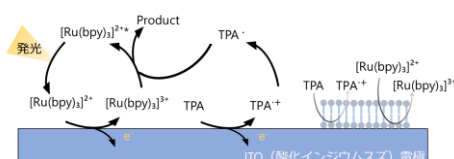


Fig. 1 ECLの発光原理

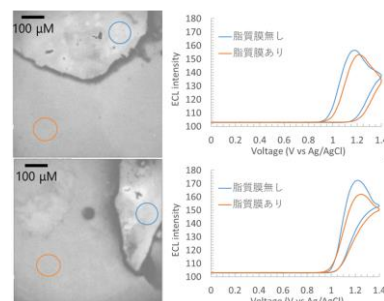


Fig. 2 DOPC (上)、DOPC/コレステロール (下) のECL画像及び強度

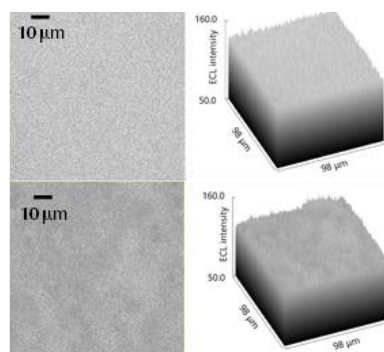


Fig. 3 メリチン添加前(上)と15分後(下)のDOPCのECL画像およびECL強度プロット

赤血球ゴーストを反応場とした光水素生成反応の制御

○坂本大芽・越山友美（立命館大院生命科）

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

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

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

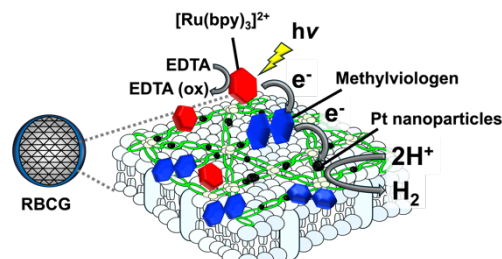


Fig. 1. Photocatalytic hydrogen evolution reaction using Pt@RBCG or Pt•Ru@RBCG.

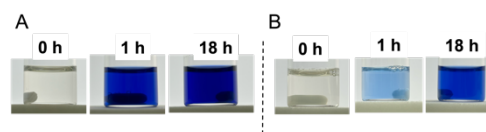


Fig. 2. Images of (A) Pt@RBCG / $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ / MV / EDTA suspension and (B) Pt•Ru@RBCG / MV / EDTA suspension under light irradiation at 0, 1, and 18 h.

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

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

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

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

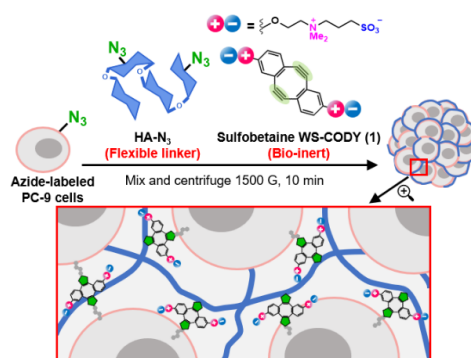


Fig.1 Schematic representation of cell aggregate formation.

【結果】まず、代謝的にアジド基を導入した難接着性肺がん由来細胞の PC-9 細胞株をモデル細胞とし、HA-N₃ (アジド修飾率: 18%) と 1 のハイドロゲル形成における最適濃度を検討した。その結果、0.0025 w/v% の HA-N₃ と 100 μM の 1 が最適濃度であり、10 分間の遠心処理により細胞凝集体の作製に成功した。細胞凝集体の培養を行ったところ、培養5日後まで形態を維持した。これは、HA-N₃ の柔軟かつ多数のアジド基により細胞表面のクリック反応効率が向上したことによると考えられる。培養96時間以降の細胞凝集体は凝集体の周辺部で分散を示した (Fig. 2a)。

そこで凝集構造の分散に影響を与える遺伝子の変動を調べるため、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、「細胞遊走」や「細胞接着」に関連する遺伝子である *HYAL1*、*ICAM-1*、*CEACAM5* および *RHOB* の mRNA 量の変動が確認された (Fig. 2b)。この結果より、HA-N₃ を介した細胞凝集は細胞—マトリックス相互作用に関連する細胞応答を誘導することが示唆された^[3]。

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

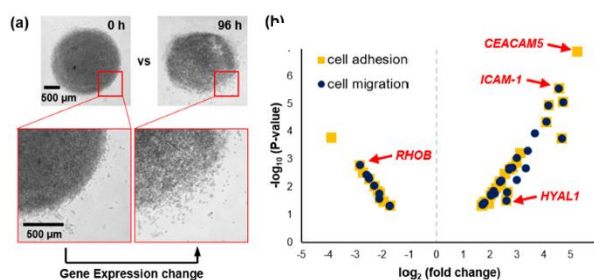


Fig.2 (a) Representative images depicting cell migration from the aggregates at 96 hours. (b) Volcano plots of genes related to "cell migration" and "cell adhesion" of cell aggregates after 96h of culture, using cell aggregates immediately after preparation as control.

ナノ構造脂質キャリアを用いた ^{19}F MRI 造影剤の開発研究

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

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

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

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

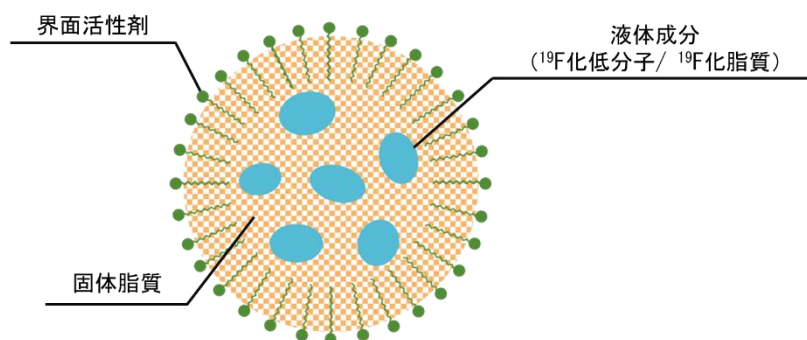


図. ナノ構造脂質キャリア型 ^{19}F MRI 造影剤のデザイン

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

酸素非依存的に DNA を光分解する光増感剤の応用に関する研究

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

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

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

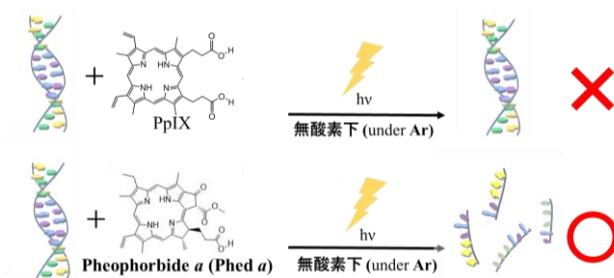


Figure 1. Schematic representation of oxygen-dependent photodegradation of DNA by ProtoporphyrinIX (top) and oxygen-independent photodegradation of DNA by Pheophorbide *a* (bottom).

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

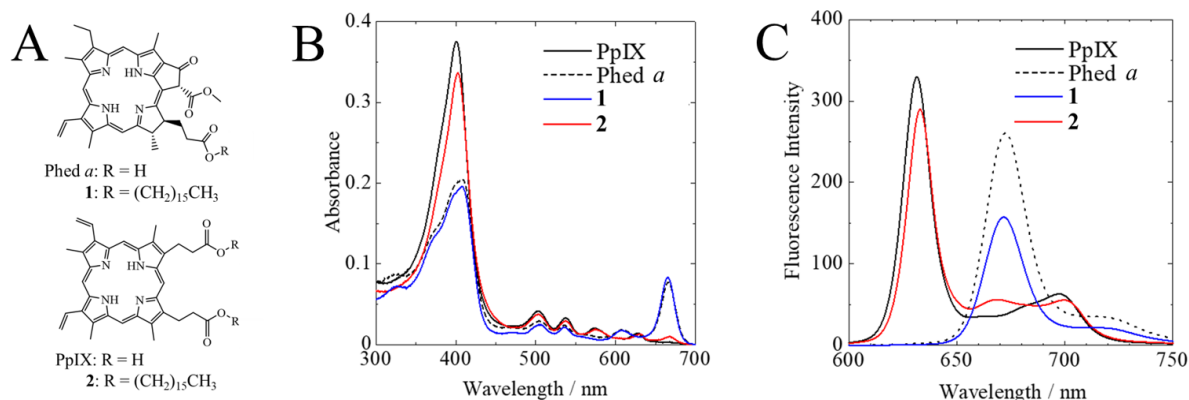


Figure 2. Chemical structures of Phed *a*, 1, PpIX, and 2 (A). Absorption (B) and fluorescence spectra (C) of 2 μM Phed *a* (dotted line), 1 (blue), PpIX (black), and 2 (red) in MeOH at 25 $^{\circ}\text{C}$.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

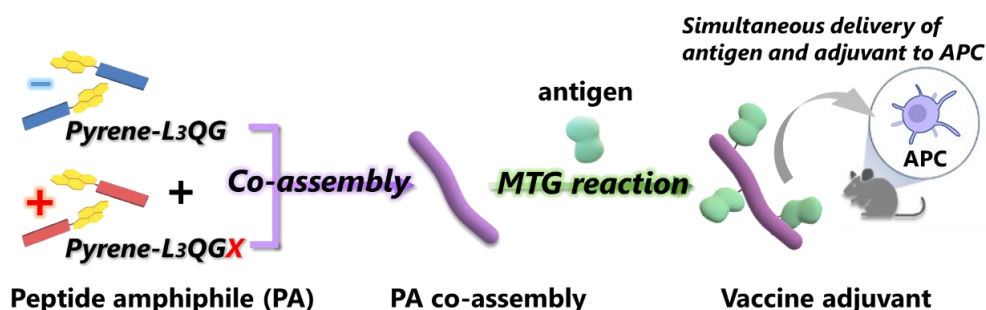


Fig. 1 Conceptual diagram of this study.

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

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

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

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

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

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

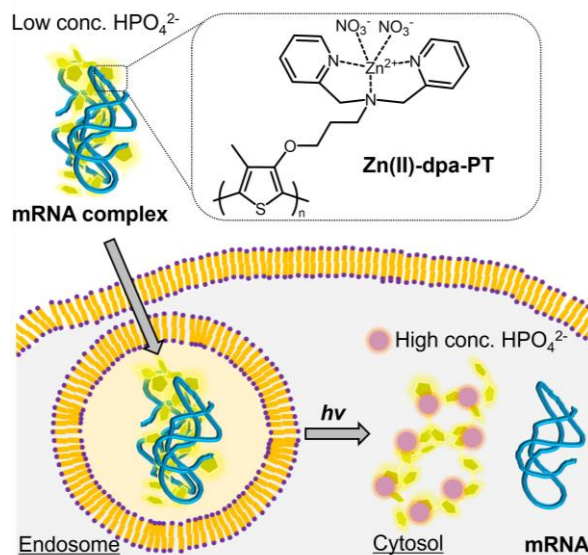


Figure 1. The conceptual scheme of cytosolic mRNA delivery by photochemical internalization and phosphate-triggered release.

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

光誘導電荷分離分子搭載ナノディスクによる細胞膜電位の制御

○高木勇杜¹・山田りおん²・作田絵里²・沼田朋大³・村上達也^{1,4}

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

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

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

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

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

1. T. Numata, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 134, 14, 6092–6095 (2012)

2. T. Numata, *et al.*, Cell. Physiol. Biochem. 54, 5, 899–916 (2020)

3. S. Kurihara, *et al.*, J. Membr. Sci. 93, 1, 69–78 (1994)

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

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

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

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

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

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

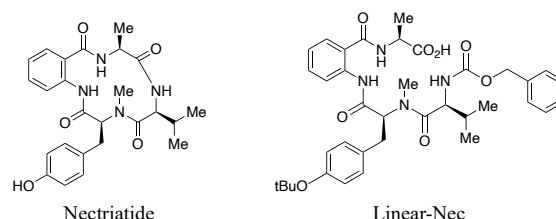


Fig. 1 Nectriatide および linear-Nec の構造

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

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

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

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

簡便かつ迅速な Zn 置換クロロフィル誘導体の調製方法の開発

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

¹筑波大・物質工学域、²筑波大・化学域、³クロロフィル研究所

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

ここから本文を書き始めてください。このテンプレートに直接上書きできます。

講演予稿は口頭・ポスター発表ともに **A4 用紙 1 ページ**です。

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

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

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

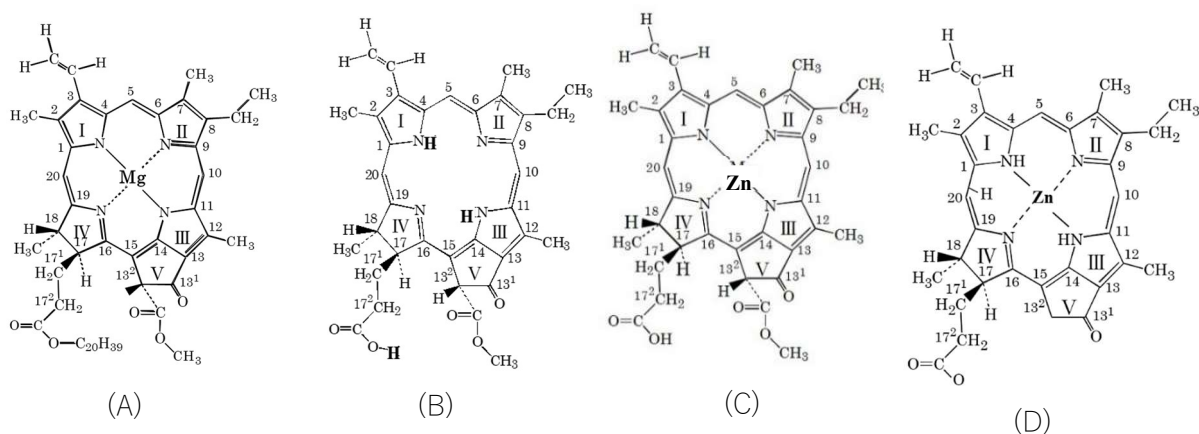


Figure 1 Chl *a* (A)、Phde *a* (B)、Zn-Chlide *a* (C)および Zn-pyroChlide *a* (D)の構造式

血小板が結合した血中循環がん細胞の 3D イメージング解析

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

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

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

【目的】

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

【方法および結果】

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

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

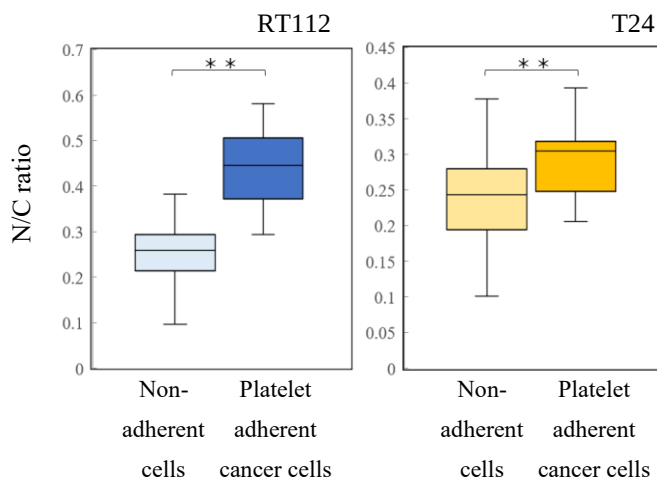


Fig. 1 Relationship between platelet adhesion to cancer cells and nucleus-cytoplasmic ratio.

(**): $p < 0.01$

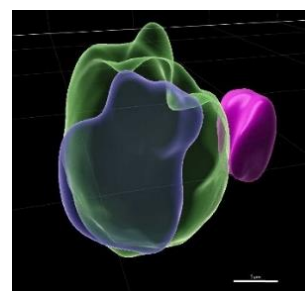


Fig. 2 3D image of platelet adhered CTC. Blue: nucleus, Green: cytoplasm, Red: platelet. Scale bar: 10 μ m

光増感色素固定化基板の作製と間葉系幹細胞への影響評価

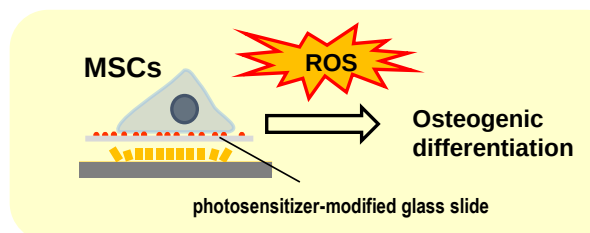
○原正之・森英樹（大阪公立大学大学院理学研究科生物化学専攻）

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

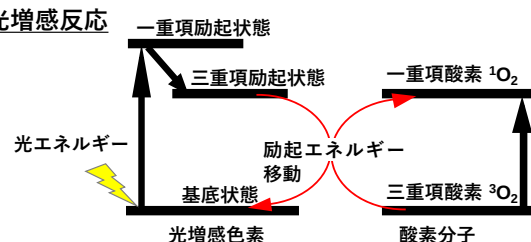
高レベルの活性酸素種（ROS）はDNA損傷を介して細胞周期を停止させ、細胞傷害性を示すが、低レベルのROSは、幹細胞などの分化において情報伝達シグナルとして作用する例も報告されている。低レベルのROSが細胞に与える影響を調べるため、EDC/NHSを用いて光増感色素の一種 hematoporphyrin（HP）を表面に化学的に固定化したガラス基板（HP基板）を作製して、可視光照射時の活性酸素種（ROS）が発生を確認した。このHP基板表面から生じるROSの微弱な酸化ストレス刺激によって、分化誘導因子の添加なしに間葉系幹細胞に骨分化が誘導されるか否かを検討した。

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

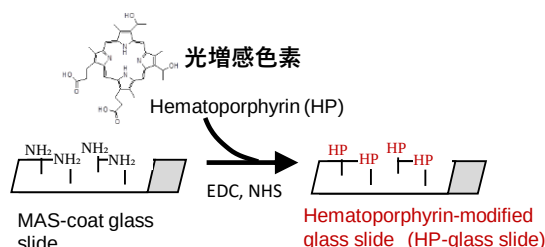
さらに、細胞膜透過性で過酸化水素消去能を持つ PEG-catalase を事前に培地に添加することによって、骨芽細胞への分化は抑制された。以上の実験結果などから、HP基板による間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化は、光増感色素から発生したROS刺激にตอบสนองして、2次的に細胞内で発生した過酸化水素シグナルを介して生じたと考えた。



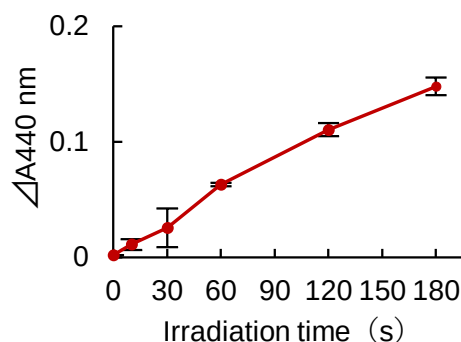
光増感反応



光増感色素固定化基板の作製



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



交流電場による細菌の Swarming 運動促進効果

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

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

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

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

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

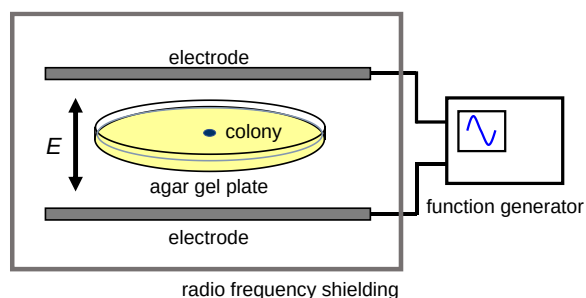


Fig. 1 Apparatus for applying ACEF to enhance cell motility on agar gel plate.

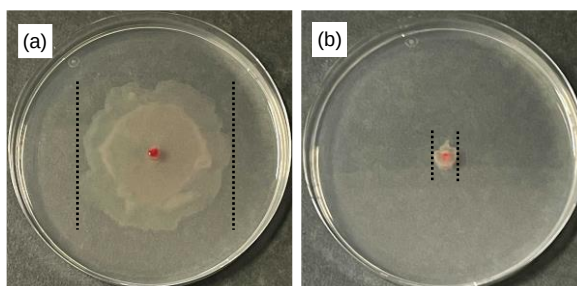


Fig. 2. Cell motility of serrawettin W1-producing *S. marcescens* on agar gel plate (a) with or (b) without ACEF [12 MHz, 9 h, 25 °C].

電子移動反応を駆使した可視光応答ケージド基の開発

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

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

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

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

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

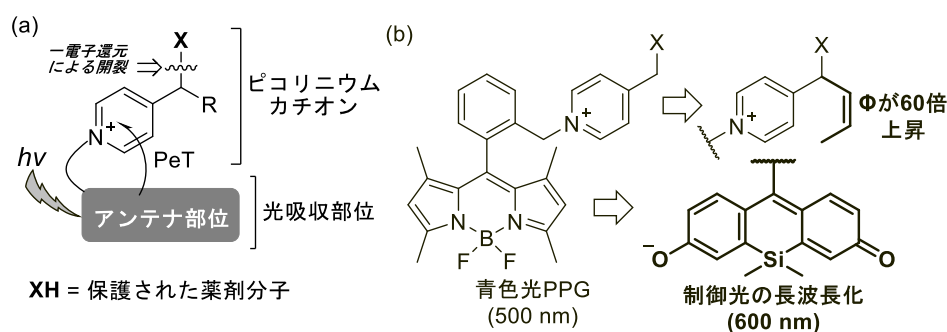


図 1 PeT 駆動型 PPG の設計 (a) と開発した PPG の構造 (b)

副作用の低減と腫瘍特異的な高活性化を目指した

二重特異性抗体の開発

加藤有紀¹・○金津 尊¹・熊谷 泉¹・浅野竜太郎¹ (¹農工大院工)

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

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

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

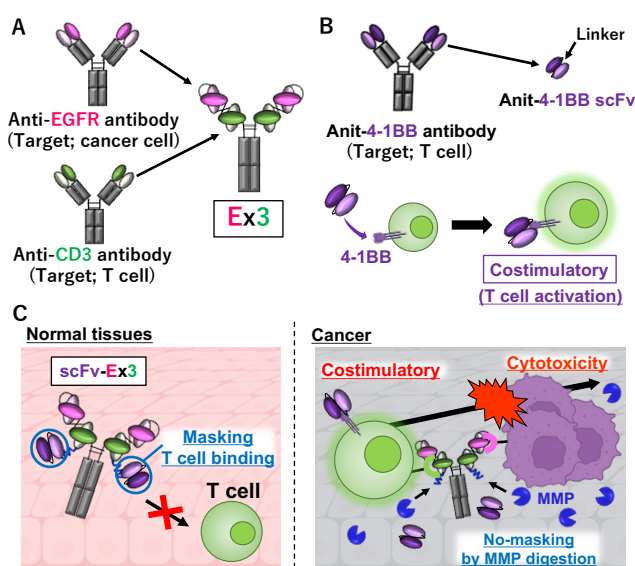


Figure 1. Schema of Ex3 (A) and scFv (B), and mode of action of scFv-Ex3 (C)

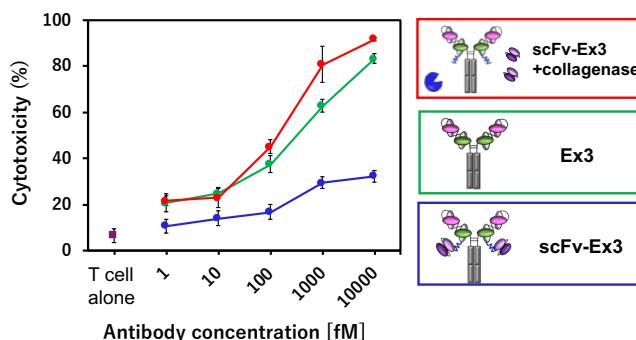


Figure 2. Cytotoxicity test

イソプレノイドを配位結合で捕捉するホスト分子の開発

○菅原孝太郎¹・中村貴志² (¹筑波大院数理物質、²筑波大数理物質)

Development of a Host Molecule that Captures Isoprenoids by Coordination Bonds (Degree Programs in Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba¹, Institute of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba²)
SUGAWARA, Kohtaro¹; NAKAMURA, Takashi²

イソプレノイドとは、イソプレン (C₅) を構成要素とする天然化合物群であり、自然界において普遍的に存在する。これまでに数多くのイソプレノイドが報告されており、その生合成前駆体は C=C 二重結合を持つ直鎖の炭化水素またはその二リン酸である¹⁾。生体内では、酵素がこの直鎖前駆体の立体配座を三次元的に固定化することにより、位置・立体選択的な反応が進行して様々なイソプレノイドが合成されている。非酵素的手法でイソプレノイドを選択的に合成することを目指すうえで、ゲスト分子を精密にフォールディングできるホスト分子の開発が重要となると考えられる。今日では、ゲスト分子の認識様式として水素結合や疎水効果などを利用した人工ホスト分子が報告されている。

当研究グループでは、内孔に配位サイトを集積した環状多核錯体が多点での配位結合でジカルボン酸やジアミンを認識することを報告している^{2,3)}。本研究では、イソプレノイドを金属との配位結合で捕捉するホスト分子を開発した。配位結合の利用によって、水素結合や疎水効果を用いるよりも結合エネルギーや選択性に優れたホスト分子となり、さらに金属を活用した選択的基質変換が実現できると期待した。ONO 型 3 座キレート sap (salicylidene-aminophenol) の環状 4 量体配位子 H₈C₄ を合成し、続いて C=C 二重結合と配位結合を形成できるパラジウムとの錯形成により、環状 4 核パラジウム錯体 [C₄Pd₄L₄] (L: 交換可能な配位子 (MeOH など)) を合成した (Figure 1)。

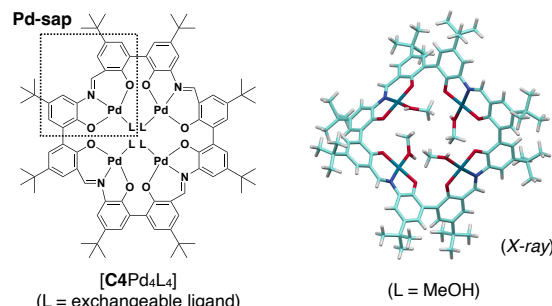


Figure 1. The structure of [C₄Pd₄L₄].

[C₄Pd₄L₄] の分子認識能を探索するために、ゲスト分子としてステロイド生合成の前駆体であり、6 つの C=C 二重結合を有するトリテルペン (C₃₀) のスクアレンを [C₄Pd₄L₄] と反応させた。その結果、1 分子のスクアレンが 1 つの環状 4 核パラジウム錯体に配位結合で捕捉されたホストゲスト錯体 [C₄Pd₄(squalene)] が生成した。また、ROESY 解析によって [C₄Pd₄(squalene)] の構造を同定し、スクアレンの 1,3,4,6 番目の二重結合が Pd に配位していることが判明した (Figure 2)。

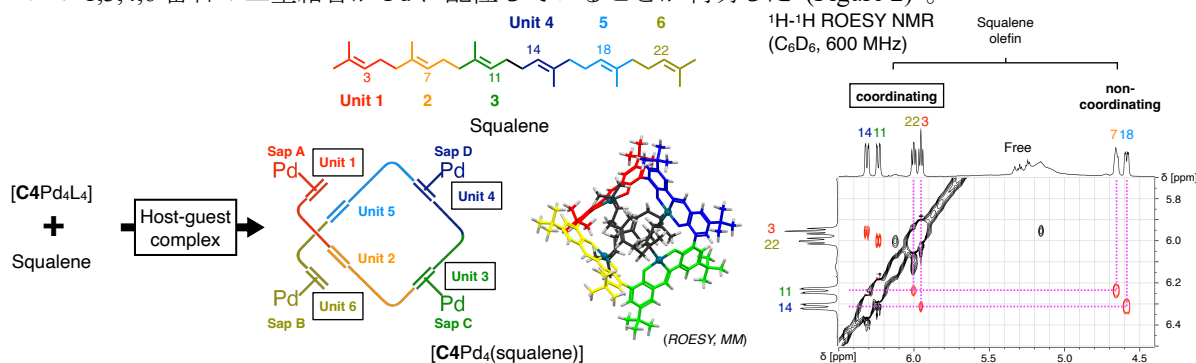


Figure 2. The structure of host-guest complex [C₄Pd₄(squalene)] and its ¹H-¹H ROESY spectrum (C₆D₆, 600MHz).

1) D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2017**, 17, 11570.

2) T. Nakamura, Y. Kaneko, E. Nishibori, T. Nabeshima, *Nat. Commun.* **2017**, 8, 129.

3) T. Nakamura, S. Watanabe, *Inorg. Chem.* **2023**, 62, 12886.

ミトコンドリアにおけるタンパク質合成を検出する

蛍光プローブの開発

○炭谷峻、佐々木栄太、大野久史、花岡健二郎（慶應大院薬）

Development of fluorescence probes for sensing protein synthesis in mitochondria (Grad. Sch. of Pharm. Sci., Keio Univ.) SUMITANI, Shun; SASAKI, Eita; OHNO, Hisashi; HANAOKA, Kenjiro

【背景・目的】ミトコンドリアは電子伝達系と酸化的リン酸化を通じて ATP を産生し、細胞のエネルギー代謝において重要な役割を担っており、その機能障害は筋疾患や神経変性疾患などの原因となる。ミトコンドリアは独自の DNA を有しており、それに由来する 13 種類のタンパク質の合成を検出することは、ミトコンドリアの機能を理解する上で重要であり、疾患の発症メカニズムを解明することにつながると考えられる。そこで本研究では、アミノアシル tRNA の 3' 末端に類似した構造をもつ puromycin を用いて、ミトコンドリア内のタンパク質合成を選択的に検出する蛍光プローブを開発することを目的とした。

【方法】ミトコンドリア局在性蛍光色素である Rhodamine B 及び 2'-Me Rhodamine B と、リボソーム内で翻訳途中のペプチド鎖の C 末端に共有結合する puromycin とを、親水・疎水性及び長さの異なる様々なリンカーを介して結合させた 6 種類の蛍光プローブをデザイン・合成した（図 1）。次に、生細胞におけるミトコンドリア局在性を評価するために、本プローブを HeLa 細胞へと添加し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて蛍光イメージングを行った。さらに、翻訳途中のペプチド鎖に対する本プローブの結合能を評価するために、再構成型無細胞翻訳系に本プローブを適用し、SDS-PAGE を用いて伸長ペプチド鎖を解析した。

【結果・考察】蛍光イメージングの結果より、Rhodamine B を用いたプローブはいずれも生細胞においてミトコンドリアに局在せず、リソソームと推測される顆粒状のオルガネラに局在した。一方、2'-Me Rhodamine B を用いたプローブは期待通りにミトコンドリアに局在した。Rhodamine B の 2' 位カルボキシ基をメチル基に替えた 2'-Me Rhodamine B を用いたことで、プローブの疎水性と正電荷が増大し、ミトコンドリアへ局在するようになったと推測された。一方、再構成型無細胞翻訳系を用いた実験では、翻訳途中の様々な長さのペプチド鎖に結合したプローブ由来の蛍光が全てのプローブにおいて観察され、翻訳途中のペプチド鎖に対する本プローブの結合能は、リンカーの親水・疎水性や長さに依らないことが示された。

【結論・今後の予定】2'-Me Rhodamine B と Puromycin を組み合わせたことで、ミトコンドリアへ局在する Puromycin 結合型蛍光プローブの開発に成功した。また、再構成型無細胞翻訳系において、本プローブがリボソーム内で翻訳途中のペプチド鎖に結合可能であることを示した。今後は、本プローブを正常細胞及びミトコンドリア病モデル細胞へと適用し、生細胞のミトコンドリア内で合成されるタンパク質の検出と解析を行う予定である。

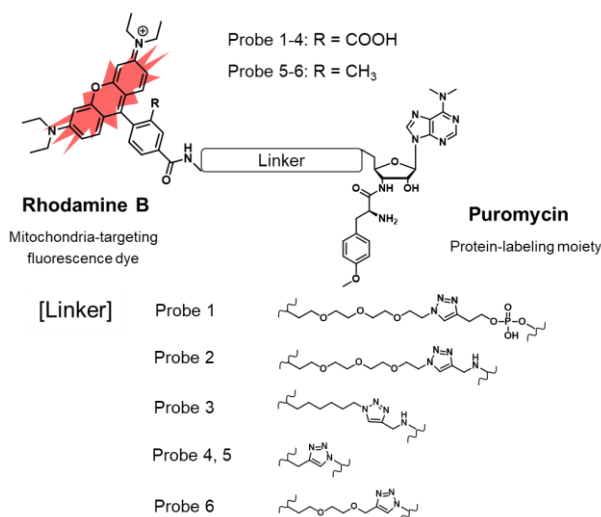


図 1：蛍光プローブの分子設計

リン酸レセプターの分子認識における水素結合および水分子の役割

○高柳駿斗¹・中畑雅樹²・石井良樹³・渡辺豪^{3,4}・中村貴志⁵ (¹筑波大院数理物質、²阪大院理、³北里大未来工、⁴KISTEC、⁵筑波大数理物質)

Roles of Hydrogen Bonds and Water Molecules in the Molecular Recognition by a Phosphate Receptor

(Degree Programs in Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba¹, Graduate School of Science, Osaka University², School of Frontier Engineering, Kitasato University³, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology⁴, Institute of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba⁵) TAKAYANAGI, Hayato¹; NAKAHATA, Masaki²; ISHII, Yoshiki³; WATANABE, Go^{3,4}; NAKAMURA, Takashi⁵

リン酸化された分子の認識は多くの生体内での化学反応に関わっており、リン酸選択的な人工ホスト分子の創出とその認識機構の解明は重要な課題である。*N*-メチルピリジニウム基をもつアミドシクロデキストリン誘導体 **1**⁷⁺は、水中においてフェニルリン酸などのアニオンを認識する¹⁾。本研究では、NOESY や ITC 測定、MD 計算などの手法を用いて、アニオンの性質に応じた認識様式の違いを明らかにした²⁾。

まず、疎水基の異なる2つのリン酸イオンとして、フェニルリン酸およびアダマンチルリン酸を用いて、**1**(OTf)₇ との 1:1 複合体の NOESY 解析と水分子存在下での MD 計算を行った。その結果、フェニルリン酸はリン酸エステル R-O-P の酸素原子がアミド N-H による水素結合に関与することで **1**⁷⁺ の内孔のやや上方 (ピリジニウムアミド基に近い側) に位置することがわかった。一方で、アダマンチルリン酸は末端の -PO₃²⁻ がアミドと水素結合を形成してやや下方 (CD のメトキシ基に近い側) に位置していた (Figure 1)。また、温度可変 ITC 測定を行った結果、フェニルリン酸では配置エントロピーが包接において重要な役割を果たし、一方でアダマンチルリン酸では疎水効果が包接における主たる駆動力となっていることがわかった。

アニオン認識能を種々のアニオンを用いて検討したところ、リン酸と疎水基の両方をもつアニオンが大きな結合定数を示した。一方、リン酸と疎水基の両方または片方が欠けたアニオンは、結合定数が小さいか包接されなかった (Figure 2)。以上より、**1**⁷⁺ のアニオン認識の選択性は、シクロデキストリン内孔の疎水効果と、アミド N-H プロトンによる水素結合の両方の寄与によって説明できることがわかった。

1) T. Nakamura, H. Takayanagi, M. Nakahata, G. Watanabe, *The 17th Symposium on Biorelevant Chemistry*, 10B-03, 2023.

2) T. Nakamura, H. Takayanagi, M. Nakahata, T. Okubayashi, H. Baba, Y. Ishii, G. Watanabe, D. Tanabe, T. Nabeshima, *submitted*.

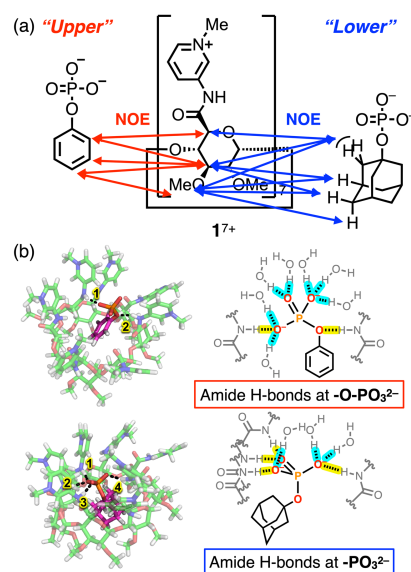


Figure 1. (a) NOE correlations between **1**⁷⁺ and phosphates. (b) Hydrogen bonding in a snapshot of MD simulation.

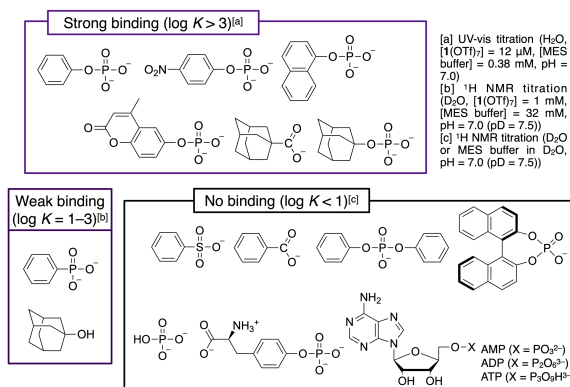


Figure 2. Structures of anions and categorization in terms of binding constant K [M⁻¹] with **1**(OTf)₇.

金属連結ペプチド鎖による編み込みシートの力学物性調査

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

Physical property analysis of knitted metal-peptide nanosheets (Lab. for Chem. & Life Sci., Tokyo Tech¹, JST PRESTO²) HOBŌ, Ryuta¹; YOSHIZAWA, Michito¹; SAWADA, Tomohisa^{1,2}

布や竹籠に代表されるように、編み込み・織り込みはマクロスケールにおいて柔軟な材料からしなやかで強靱な構造を形成する重要な手法である。ナノスケールにおいても、分子の編み込み・織り込み構造の構築と力学物性の解明が期待されているが、未だその報告例は限られる¹。当研究室では、ペプチドと金属イオンを用いて、様々な高次な絡まり構造をもつトポロジー分子や細孔性結晶を構築してきた²。本研究では、その合成法を用いて二次元層状編み込み構造を構築し、編み込み型の違いによる力学物性の変化について原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて調査した。

まず、配列異性体である二種類のトリペプチド PPA および APP 配列からなる配位子 **1PPA** および **1APP** を合成した (図 1a)。そのアルコール溶液と銀イオン水溶液をゆっくりと混合させることで、単結晶 **2PPA** と **2APP** を得た (図 1b)。X 線構造解析により、両者は銀イオンとトリペプチド配位子からなる一次元配位ポリマー鎖が編み込まれた層状構造であり、異なる編み込み層状構造を持つことを明らかにした (図 1c)。続いて、単層の剥離条件の検討と AFM 観察を行った。**2PPA** はメタノール中で 150 W の超音波を 20 分間照射することでナノシートに剥離された。また、**2APP** は水中で 100 W の超音波を 20 分間照射することで剥離された。得られたナノシートの分散液をマイカ基板にキャストし、風乾後 AFM 測定を行うと、**2PPA**、**2APP** のナノシートがそれぞれ観察された (図 1d)。**2PPA** および **2APP** のナノシートは高さ約 1.5 nm および約 2.0 nm であり、それぞれ編み込みシート 1 層分と 2 層分に相当した。各ナノシートのヤング率を測定したところ、**2PPA** と **2APP** のナノシートはそれぞれ約 720 MPa および約 260 MPa であった。以上、本研究では金属連結ペプチド鎖によって二次元編み込み構造を構築し、編み込み型の違いによってシートの力学物性が変化することを明らかにした。

[1] O. M. Yaghi, *et al.*, *Science* **2016**, 351, 365. [2] T. Sawada, *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2021**, 94, 2342.

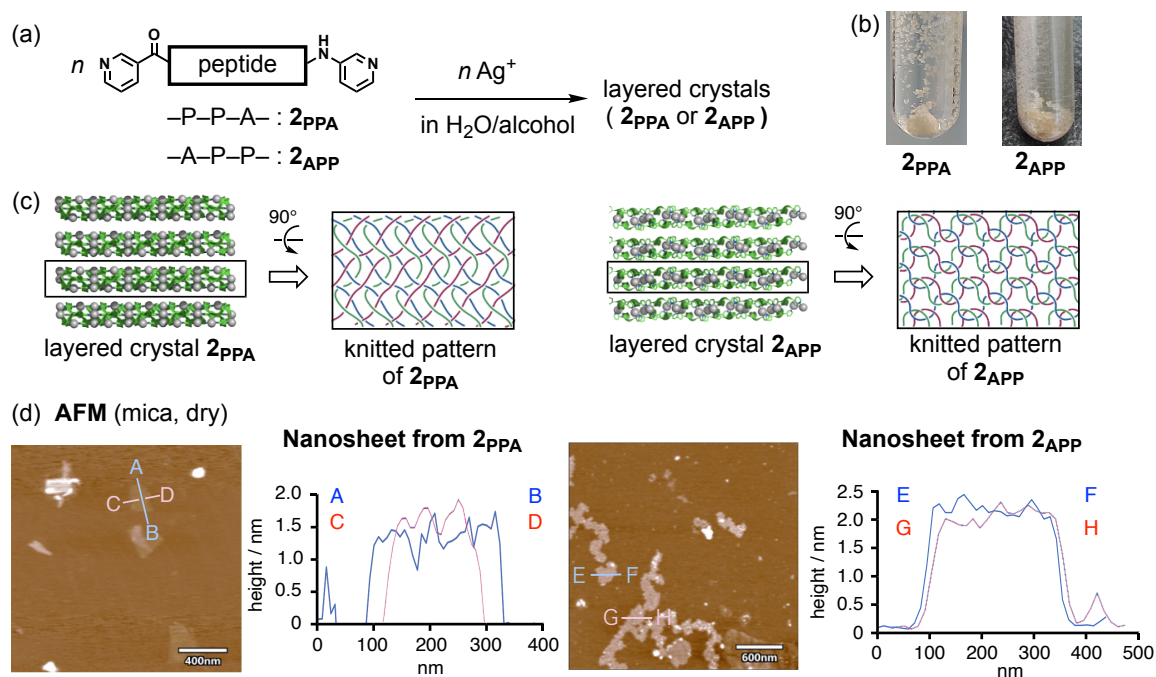


Figure 1. (a) Complexation, (b) crystal photographs, (c) crystal structures and (d) AFM data of **2PPA** and **2APP**.

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

○三木康輝¹・三木康嗣¹・麻植雅裕¹・鈴木叶瑛¹・Mu Huiying¹・湯川博²・大江
浩一¹ (¹京大院工、²名大未来社会)

Dual-Responsive Near-Infrared Turn-on Fluorescent Probe for Cancer Stem Cell-Specific Visualization
(Graduate School of Engineering, Kyoto Univ.¹, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya Univ.²)

MIKI Koki¹・MIKI Koji¹・OE Masahiro¹・SUZUKI Kanae¹・MU Huiying¹・YUKAWA Hiroshi²・OHE Kouichi¹

がん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSCs) はがん組織中に存在する一部の未分化細胞群であり、がんの開始、進行、転移、および再発に密接に関連している^[1]。アルデヒド脱水素酵素 1A1 (Aldehyde Dehydrogenase 1A1: ALDH1A1) は、がん組織の CSCs と正常組織の体性幹細胞 (Normal Somatic Stem Cells: NSCs) の両方に発現している細胞内バイオマーカーの一つである^[2]。ALDH1A1 の活性を可視化するためのいくつかの turn-on 型蛍光プローブが開発されているが、CSCs と NSCs を識別することは困難である^[3]。本研究では、ヘミシアニン色素を ALDH1A1 および β -ガラクトシダーゼ応答性基質で修飾したデュアル応答性蛍光プローブ **CHO_ β gal** を開発した^[4]。**CHO_ β gal** の酵素に対するデュアル応答性は、蛍光強度の時間依存的変化を測定することによって確認した (Figure 1a)。ALDH1A1 応答性 turn-on 型蛍光プローブ **C5S-A**^[3b]を使用した *in vitro* 細胞染色では、CSCs と NSCs の両方が可視化された。一方、**CHO_ β gal** の場合、がん細胞中の CSCs のみを高コントラストかつ特異的に可視化し、正常細胞中の NSCs と識別できることがわかった (Figure 1b)。切除した組織切片の **CHO_ β gal** 染色では、NSCs が存在する場合でも、がん組織中の CSCs のみが明瞭に可視化された (Figure 1c)。

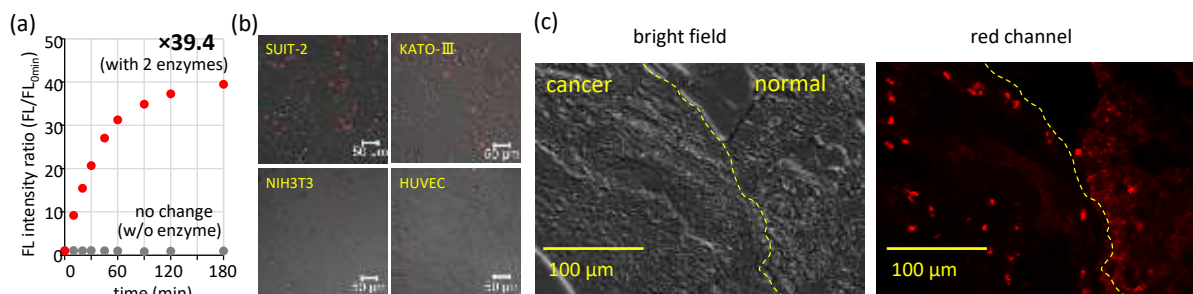


Figure 1. (a) Time-dependent fluorescence intensity change of **CHO_βgal** (20 μM) at 710 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 660$ nm) treated with ALDH1A1 (200 nM) and β -galactosidase (20 U/mL). (b) Representative confocal laser scanning microscopy images of SUIT-2, KATO-III, NIH3T3, and HUVEC cells stained by **CHO_βgal**. (c) Slice of the boundary region between cancer and adipose tissues stained by **CHO_βgal**.

[1] Q. Gao, Y. Zhan, L. Sun, W. Zhu, *Stem Cell Rev. Rep.* **2023**, 19, 2141.

[2] (a) X. Xu, S. Chai, P. Wang, C. Zhang, Y. Yang, Y. Yang, K. Wang, *Cancer Lett.* **2015**, 369, 50. (b) H. Tomita, K. Tanaka, T. Tanaka, A. Hara, *Oncotarget* **2016**, 7, 11018.

[3] (a) J. Han, J. S. Kim, J. H. Kim, E. Jung, K. Min, P. Jangili, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2020**, 49, 7856. (b) M. Oe, K. Miki, Y. Ueda, Y. Mori, A. Okamoto, Y. Funakoshi, H. Minami, K. Ohe, *ACS Sens.* **2021**, 6, 3320.

[4] K. Miki, M. Oe, K. Suzuki, K. Miki, H. Mu, Y. Kato, M. Iwatake, H. Yukawa, Y. Baba, Y. Ueda, Y. Mori, K. Ohe, *J. Mater. Chem. B* **2024**, in press. <https://doi.org/10.1039/D4TB00897A>.

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

○山元紗代子・Huiying Mu・三木康嗣・大江浩一（京大院工）

Fluorogenic probes based on meso-vinyl-BODIPY for discrimination of different thiols (Graduate School of Engineering, Kyoto University) YAMAMOTO, Sayoko; MU, Huiying; MIKI, Koji; OHE, Kouichi

蛍光イメージングは、細胞の構造や生物学的プロセスを観察するために利用される技術であり、時間分解能が高く、生体への負の影響が少ないメリットがある。Dipyrromethene boron difluoride (BODIPY) は高い蛍光量子収率と生体内環境において優れた安定性を示す蛍光色素の一種であり、蛍光プローブとして広く活用されている。生体内にはアニオン部位をもつチオール分子がいくつか存在しており、それらは多くの代謝反応や化学反応に関わっていることが知られている。我々は BODIPY 骨格を基に、生体内に存在する様々なチオールと反応することで蛍光を発する meso-vinyl-BODIPY (VB) の開発に成功している (Figure 1a) ¹。しかしながら、特定のチオールに対する選択性がなく、反応性を調整できないという課題が残されている。そこで、本研究では VB の側鎖に電子供与/求引基を導入することで、ビニル基の反応性を調整した (Figure 1b)。さらに、側鎖末端に生体内チオールがもつアニオン部位と静電相互作用するカチオン部位を組み込むことで生体内の異なるチオールに選択的に応答する turn-on 型蛍光プローブを合成した。本発表では、合成したプローブ分子の光物性と細胞イメージングの詳細に関して説明する。

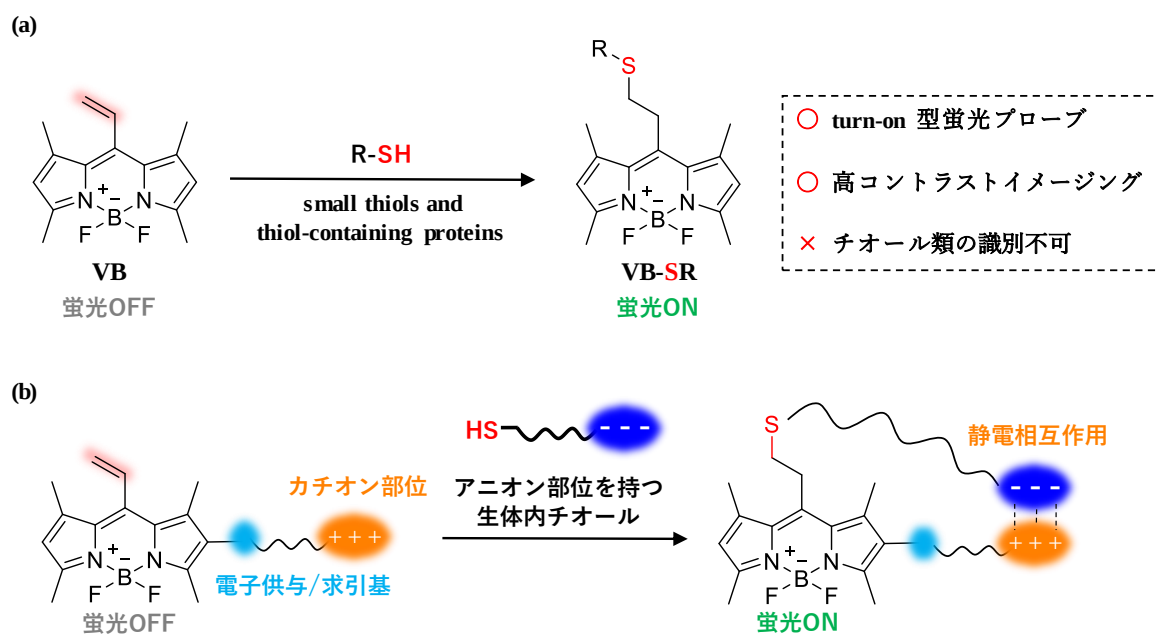


Figure 1. (a) Fluorescence turn-on property of vinyl-BODIPY (VB) exhibited by the addition of small thiols and thiol-containing proteins. (b) Strategy of molecular design of new thiol-selective fluorogenic probes.

[1] Mu, H. Miki, K. Ohe, K. et al. *Chem. Commun.* **2021**, 57, 1818–1821.

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

○河合寛太¹・辻美恵子¹・平山祐¹ (¹岐阜薬科大学)

***In situ* Fe(II) probe synthesis by intramolecular imine trap strategy for precise labile iron detection** (Gifu Pharmaceutical University¹) KAWAI, Kanta¹; TSUJI, Mieko¹; HIRAYAMA, Tasuku¹

細胞内では各小器官や小胞、細胞膜上で二価鉄の授受・貯蔵が行われていると考えられ、こうした二価鉄の輸送・代謝ネットワークを解明するには、高い位置特異性と検出感度を兼ね備えた可視化分子が必要である。しかし、既報の細胞小器官選択的鉄検出プローブの場合、標的部位外でプローブが応答し、その後標的部への局在化が起こる可能性があることから、二価鉄の真の局在位置を決定することが困難であった。そのような背景から、高い位置決定精度を持つ二価鉄イメージング法実現のため、標的部位でのみ応答能を持つような蛍光プローブが求められている。

そこで、ごく最近Kimらによって報告されたRetro-Cope型クリック反応(*J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143, 5616)を応用した*in situ* プローブ合成戦略

の開発に着手した。当研究室ではこれまで、*N*-オキシド化学を利用した二価鉄蛍光プローブを多種開発してきたが、本戦略はヒドロキシルアミン(HA)構造を有する蛍光団と環状アルキンとのRetro-Cope反応により、細胞内の標的部位で、*N*-オキシド型プローブを*in situ*合成し、狙った場所でのみ二価鉄検出反応が起こるという新手法である。これまでに数種類のヒドロキシルアミンプローブ(HAR)を合成し、Retro-Cope反応性や生じる*N*-オキシド化合物の二価鉄応答性などを評価した。また細胞内において二価鉄濃度の変動を捉えることにも成功している。

しかしながら、エナミン*N*-オキシド型プローブは二価鉄との反応後エナミンとなり、速やかに加水分解されることから、時間とともに標的部位から遊離する様子が観測された(図1)。微小環境下における二価鉄変動を評価するためには、プローブ自体が細胞内で動かないことが望ましい。そこで分子内でイミン中間体を捕捉することで二価鉄反応後の加水分解を抑制する戦略を考案した。過去に確立したヒドロキシルアミン誘導体合成法を基に、分子内イミンを捕捉する求核性官能基を導入したHAR-4を合成した。得られたHAR-4を環状アルキンとさせたところ、Retro-Cope反応が進行し、目的の構造を有する*N*-オキシド化合物が得られた。さらに、当該*N*-オキシド化合物に二価鉄を添加し、HPLCにより反応物を解析したところ、*N*-オキシド化合物由来のピークの減少とともに、生成するイミンと分子内環化した化合物のピークが新たに生成した。また、Retro-Cope反応生成物である*N*-オキシド化合物に二価鉄を添加し、蛍光測定を実施したところ、1時間後で約4倍の蛍光強度の上昇が確認された(図2)。次に、*In situ* プローブ合成戦略をHalo tag導入細胞へと応用したところ、HAR-2を上回る二価鉄応答性を示し、分子内環化戦略の有用性を示すことに成功した

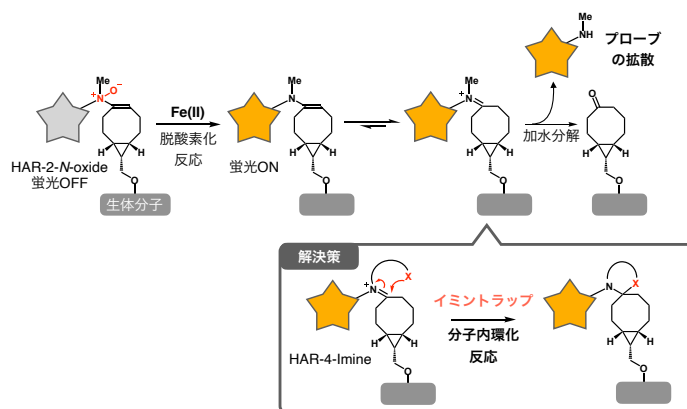


図 1. *in situ* プローブ合成戦略の概要と課題

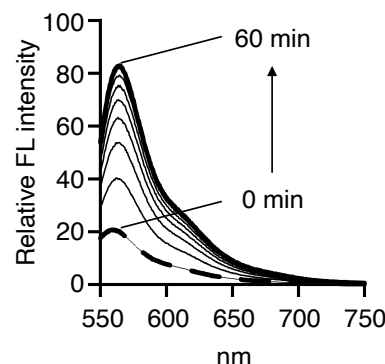


図 2. HAR-4-*N*-オキシド化合物の Fe(II) に対する蛍光応答

ルミノール化学発光を利用したヒト赤血球の脆弱性評価

○中田三智¹・湯川修弘²・白上 努¹ (¹宮崎大工、²宮崎大医)

Evaluation of fragile erythrocytes by chemiluminescence from the forensic luminol reaction (Faculty of Engineering, Univ. of Miyazaki¹, Faculty of Medicine, Univ. of Miyazaki²) NAKATA, Misato¹; YUKAWA, Nobuhiro², SHIRAGAMI, Tsutomu¹

血液のヘム鉄と反応して化学発光を誘起するルミノール反応は、鑑識作業等に活用される良く知られた化学発光反応である。我々は、ヒト血液において正常な赤血球と赤血球膜が損傷した脆弱赤血球との間で、ルミノール発光が観測されるまでに要する時間（保持時間：RetentionTime; RT）が異なることを見いだしている（図1）。このことは、赤血球の脆弱性の程度をRTによって評価できる可能性があることを意味している。一方、貧血等の赤血球異常を診断するために、臨床検査では「赤血球浸透圧抵抗試験」が行われる。これは、赤血球を含む生理食塩水を調製し、NaCl濃度を低下させて、どの濃度で溶血現象が起こるかを捉えることで脆弱性を評価する試験である。本研究では、異なるRTを示す赤血球に対して、赤血球浸透圧抵抗試験を行い、両者の相関関係について調査することで、RTの差によっても赤血球の脆弱性が評価できるかどうかを検討した。

血液は市販されているヒトの血液を用いた。RTの異なる赤血球は、血液を12日間放置して自然劣化させる、並びに光照射によって膜を光損傷させることで準備した。浸透圧抵抗試験は、既存のパルパート法を用いて行った。

図2に示すように4種類の異なるRTを持つ赤血球に対して、浸透圧抵抗試験を行った。正常赤血球（RT=180秒）では、NaCl濃度が5g/Lより下回ると溶血した（図3）。この結果は、従来正常赤血球で報告されている結果と同じである。RT=12秒の赤血球では、NaCl濃度が8g/Lより下回るあたりから溶血が観測され、非常に脆弱な赤血球であることがわかった。また、4時間光照射した赤血球（RT=23秒）の浸透圧抵抗試験では、若干の脆弱性を示したが、2時間光照射した赤血球（RT=138秒）の浸透圧抵抗試験では、脆弱性は全く示さなかった。以上の結果は、RTの差と赤血球の脆弱性の程度との間に相関があることを明確に示している。また、RT=138秒の赤血球では、浸透圧抵抗試験では正常領域と判断できるが、正常赤血球のRTよりも短縮化されていることから、ルミノール発光のRTを利用した方が赤血球の軽微な脆弱性も見分けて評価できることを示唆している。

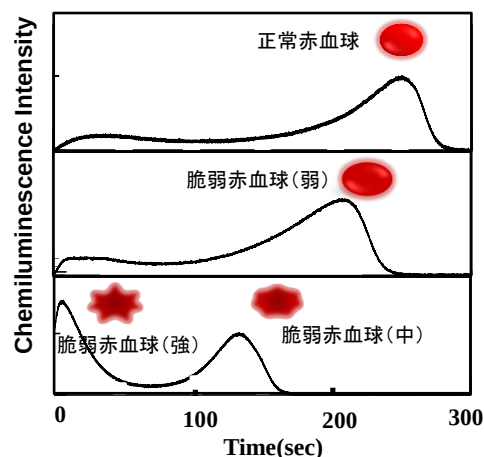


図1. 赤血球の脆弱化と化学発光のRTとの関係

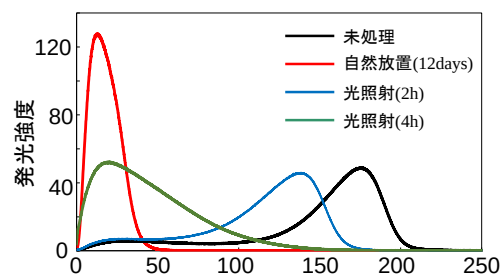


図2. 種々の履歴を持つ赤血球のルミノール発光のRT

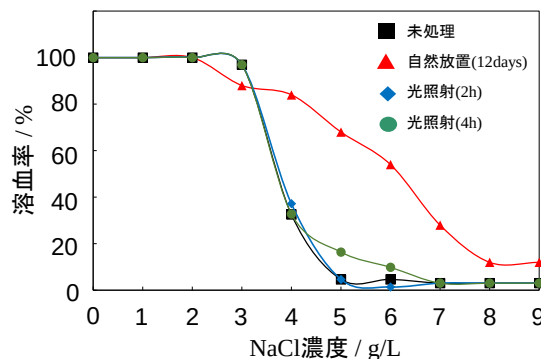


図3. 各NaCl濃度に対する溶血率（浸透圧抵抗試験）

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

○谷田部浩行¹・齋藤雄太郎¹・高草木洋一^{2,3}・齋藤圭太²・山本和俊⁴・Murali C. Krishna⁴・山東信介¹ (1東大院工、²量子科学技術研究開発機構、³千葉大院融合理工、⁴米国国立衛生研究所)

Cancer diagnosis based on in vivo multiplexed analysis of aminopeptidase activities using hyperpolarized MRI molecular probes (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo¹, National Institutes for Quantum Science and Technology², Graduate School of Science, Chiba University³, National Institutes of Health, USA⁴) YATABE Hiroyuki¹; SAITO Yutaro¹; TAKAKUSAGI Yoichi^{2, 3}; SAITO Keita²; YAMAMOTO Kazutoshi⁴; Murali C. Krishna⁴; SANDO Shinsuke¹

アミノペプチダーゼ (AP) は、ペプチドやタンパク質を N 末端アミノ酸残基特異的に切断する酵素群である。本研究では、レニン-アンジオテンシン系 (RA 系) に属する 4 種類の AP (APN、APA、APB、ロイシン AP (LAP)) に着目した。RA 系において、APA はアンジオテンシン II (Ang II) を Ang III に代謝し、Ang III はさらに、APN、APB、LAP によって Ang IV へと代謝される。これらのホルモンペプチドは、それぞれ受容体に作用することで、血管機能の調節や細胞増殖を制御している (図 1A)。よって血管新生を必須とする腫瘍をはじめとする様々な疾患において、RA 系 AP 活性バランスの異常が認められている。RA 系 AP 活性の多重解析は、このバランス異常を捉えることで、がんや腎疾患などの診断を可能にする有用なアプローチである¹。しかし、これまでの RA 系 AP 活性の多重解析は、患者から採取した血液や尿を用いた間接的な診断に留まっていた。よって生体内 RA 系 AP 活性の疾患部位での直接的な多重検出およびイメージングが強く望まれている。

我々は、核磁気共鳴イメージング (NMR/MRI) とその低感度を克服する動的核偏極法 (DNP) に着目した²。DNP-MRI は、生体透過性が高い分子イメージング手法であり、化学シフトの違いによって複数の化学種を同時に検出することができる。これまでに、我々は生体内 APN 活性を検出・可視化できる DNP-MRI 分子プローブ Ala-[1-¹³C]Gly-*d*₂-NMe₂の開発に成功している³。この分子プローブは、精密な分子設計によって、DNP-MRI 分子プローブが生体内で機能するための様々な物理化学的条件を満たしている。そこで、この分子プローブを基盤として構造展開することにより、物理化学的条件を損なうことなく、酵素反応性と化学シフトを変化させた一連の DNP-MRI 分子プローブ群を開発した (図 1B)。開発した分子プローブ群を核偏極し、健常マウスに投与したところ、複数の生体内 RA 系 AP 活性の同時検出およびイメージングに成功した。さらに、開発した分子プローブ群を担がんマウスに投与することで、腫瘍中の RA 系 AP 活性の直接的な多重検出を行った。その結果、AP 活性の多重解析は、単一の AP 活性の検出に比べ、より正確な腫瘍診断につながることを示唆された。

[1] M. P. Carrera. *et al.*, *Anticancer Res.* 26, 1011–1014 (2006). [2] J. H. Ardenkjær-Larsen, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 10158–10163 (2003), [3] Y. Saito, *et al.*, *Sci. Adv.* 8, eabj2667 (2022).

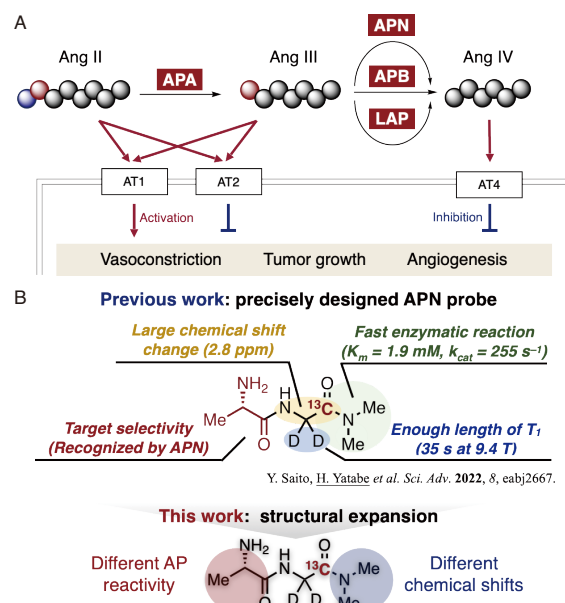


図 1A. レニンアンジオテンシン系に関わるアミノペプチダーゼの生理学的役割。図 1B. 本研究の分子プローブ群の設計戦略。

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

○濱田悠太¹・廣瀬敏晃¹・道垣内龍男²、建部 徹²、河田陽一²、川田善正¹、
小野篤史¹ (¹ 静大院工、² 浜松ホトニクス)

Super-resolution Infrared Absorption Spectroscopic Imaging of Amyloid Fibrils for Elucidating Protein Aggregation Processes (Graduate School of Engineering, Shizuoka Univ.¹, Hamamatsu Photonics K.K.²)
HAMADA Yuta¹; HIROSE Toshiaki¹, DOUGAKIUCHI Tatsuo², TAKEBE Gen², KAWADA Yoichi²,
KAWATA Yoshimasa¹, ONO Atsushi¹

タンパク質二次構造は、生体内のアミノ酸配列に基づく折りたたみ（フォールディング）により三次元立体構造を形成し機能を発現する。フォールディング過程における誤ったプロセス（ミスフォールディング）により、不溶性のアミロイド線維が形成される。アミロイド線維の体内沈着は、アルツハイマー病などの神経変性疾患を引き起こす要因となる[1]。患者数は年々増加傾向にあるのに対し、アミロイド線維の形成過程は未解明である。疾患の発症メカニズム解明および早期発見に向けて、アミロイド線維形成過程の微視的観察が求められる。我々は、ミスフォールディングによりアミロイド線維を形成するインスリンタンパク質に注目した。インスリンの構造は単純であり、機能が明確であることからフォールディング研究にて広く用いられる。これまでインスリンは、X線結晶構造解析や核磁気共鳴法によりタンパク質全体の構造が明らかになっている。これらの解析から、インスリンモノマーはオリゴマーの中間状態を経て三次構造に折りたたまれることが解明された[2]。フォールディング過程の中間状態におけるインスリンは、 α ヘリックスや β シートのようなタンパク質二次構造で構成されている。これらの二次構造は、タンパク質立体構造の安定性や機能の発現に重要な役割を果たす。本研究では、フォールディング過程解明のため、近接場赤外吸収分光法を用いてアミロイド線維の超解像イメージを取得した。近接場赤外吸収分光法（図1(a)）は、試料表面に近接したプローブ先端からの散乱光を検出することにより、試料の分子振動由来の局所的な光吸収を計測する手法である[3]。この手法は、タンパク質を非標識かつ非侵襲にてイメージングする。近年ウイルスや神経細胞など生体試料のイメージングに広く応用されている[4]。

本研究では、中赤外レーザー（ λ : $\sim 6\ \mu\text{m}$ ）を光源とした近接場走査型光学顕微鏡を構築し、アミロイド線維を分光観察した。アミロイド線維はインスリンの熱凝集により作製した。加熱時間の増大に伴う凝集状態をFT-IRにより評価したところ、時間経過とともにインスリンの凝集が促進され、タンパク質二次構造が α ヘリックス（ $1660\ \text{cm}^{-1}$ ）から β シート（ $1635\ \text{cm}^{-1}$ ）へと変性する様子が観測された（図1(b)）。図1(c)は、120分加熱により作製したアミロイド線維のAFM像、および波数 $1635\ \text{cm}^{-1}$ 、 $1660\ \text{cm}^{-1}$ における近接場赤外吸収像である。ナノスケールのアミロイド線維に対し、分光観察により官能基の振動モードに起因する赤外吸収差を観測し、回折限界を遥かに超えた空間分解能 $30\ \text{nm}$ にて超解像イメージングを実証した。これらの結果は、アミロイド線維の構造解析における近接場赤外吸収分光法の重要性を示す結果である。

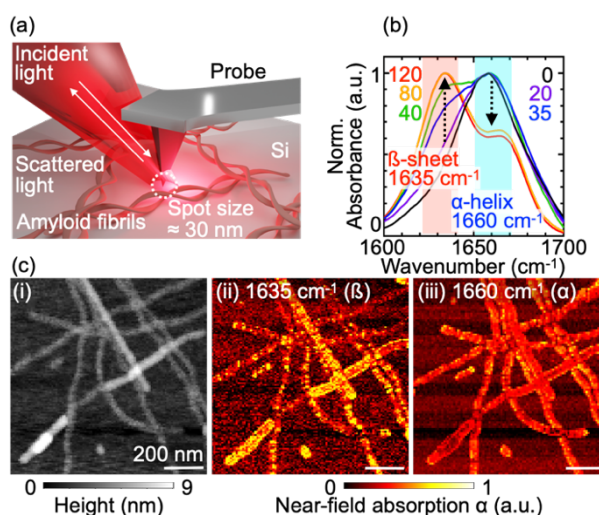


Fig.1 (a) Near-field infrared absorption spectroscopy imaging. (b) FT-IR spectra of amyloid fibrils. (c) Near-field imaging of amyloid fibrils. (i) AFM image. (ii, iii) Near-field absorption image.

- [1] G. Merlini *et al.*, N. Engl. J. Med. **349**, 583 (2003). [2] Hua QX, *et al.*, J. Biol. Chem. **277**, 43443 (2002)
[3] B. Knoll *et al.*, Nature **399**, 134 (1999). [4] R.O.Freitas *et al.*, Cells **10**, 2559 (2021).

大豆根粒菌のラマン分光解析を通じた大豆の窒素固定活性予測

○諏訪駿之介^{1,2}・安藤正浩^{2,3}・柏木康熙¹・京谷拓磨¹・長谷川健人^{1,2}・Habibi Safiullahr⁴・大津直子⁴・竹山春子^{1,2,3,5} (早大院・先進理工¹, 産総研・早大 CBB-D-01L², 早大ナノ・ライフ創新研³, 農工大院・農⁴, 早大・先進生命動態研⁵)

Prediction of Nitrogen Fixation Activity in Soybean Nodules Using Raman Spectroscopy (Graduate school of Advanced Science and Engineering, Waseda University¹, Waseda University Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory², Research organization for Nano and Life Innovation³, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology⁴, Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda Research Institute for Science and Engineering, Waseda University⁵) SUWA, Shunnosuke^{1,2}; ANDO, Masahiro^{2,3}; KASHIWAGI, Koki¹; KYOTANI, Takuma¹; HASEGAWA, Kento^{1,2}; Habibi Safiullahr⁴; OTSU Naoko⁴; TAKEYAMA, Haruko^{1,2,3,5};

ダイズは根に根粒と呼ばれるこぶ状の器官を形成し、その内部には根粒菌が生息している。植物体は根粒菌に炭素源を供給する一方で、根粒菌は窒素固定によって大気中の N_2 を NH_4^+ に変換し、植物体に供給する。植物は大気中の窒素を直接利用できないため、根粒菌による窒素固定がダイズの生育、収量に与える影響は大きい。根粒菌による窒素固定の分子生物学的メカニズムの解明が精力的に行われている。しかしながら、共生状態の根粒菌内の生体分子の包括的な解析事例は少ない。

本研究では非破壊、ラベルフリーで対象の分子成分の解析が可能なラマン分光法を用いて、根粒菌のシングルセル解析を行い、窒素固定活性に寄与するような細胞内成分を探索した。初めに、ダイズを実験室内で栽培した。経時的(栽培 30, 45, 87 日)に根から根粒を採取し、アセチレン還元活性を測定し、窒素固定活性を評価した。同時に、根粒から根粒菌懸濁液を調整し、ラマン分光法を用いて 1 細胞レベル (計 828 細胞) での生体分子情報を取得した。得られたラマンスペクトルを多変量スペクトル分解(MCR-ALS¹⁾)で解析し、細胞内の分子プロファイルを取得した。さらに、ランダムフォレスト回帰で窒素固定活性と根粒菌の分子プロファイルとの相関解析を行い、窒素固定に寄与する生体分子を特定した。

ダイズの窒素固定活性は栽培時期、そして根粒の大きさ依存的に変化していることが確認された。ラマン分光測定と MCR-ALS 解析では様々な生体分子が検出された

(Fig. 1)。ポリヒドロキシ酪酸(Polyhydroxybutyrate, PHB)は生体ポリマーとして知られており、栽培条件間で特に強い変動が見られた。ランダムフォレスト回帰では、根粒菌の生体分子プロファイルから窒素固定を高精度に予測できた($R^2 > 0.70$)。この予測では PHB のプロファイルが最も重要な特徴量であると判定され、共生窒素固定における PHB の強い関与が示唆された。今後 PHB の細胞内動態について詳細に解析することで、根粒菌の窒素固定のメカニズムをさらに深く解明できると期待される。本研究は内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業 (JPJ009237、管理法人:生研支援センター) によって実施されました。

1) Ando, Hamaguchi, *Journal of Biomedical Optics*, 19, 011016 (2013)

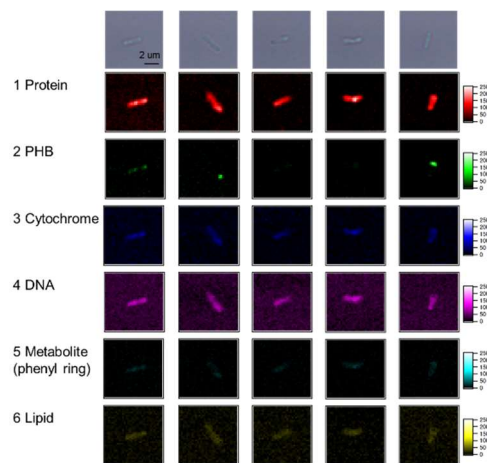


Fig. 1 根粒菌のシングルセルラマンイメージ

シュードノットアプタマーを用いたストレス検出バイオセンサの開発

○森田葵¹・内田里奈¹・上島理乃¹・光永靖²・鳥澤眞介²・小林靖尚²・
才木常正³・高村映一郎¹・坂元博昭¹ (¹福井大学、²近畿大学、³兵庫県立
工業技術センター)

Development of a stress detection biosensor using pseudoknot aptamer. (University of Fukui,¹ Kindai University², Hyogo Prefectural Institute of Technology.³) MORITA, Aoi¹; UCHIDA, Rina¹; UEJIMA, Rino¹; MITSUNAGA, Yasushi²; TORISAWA, Shinsuke²; KOBAYASHI, Yasuhisa²; SAIKI, Tsunemasa³; TAKAMURA, Eiichiro¹; SAKAMOTO, Hiroaki¹

日常生活でのストレスレベルの POCT(Point of Care Testing)は、心身の健康維持において非常に重要である。現行のストレス診断方法は、問診、脳波(EEG)、心電図(ECG)、体温および自己問診票である。このような方法は煩雑であり、大型装置を用いるため個人での使用や POCT には適していない。また、個人のストレスレベルを間接的に測定しているため、特異性に欠けるという問題点がある。そこで、ストレスの指標となるバイオマーカーとしてコルチゾールが注目を集めている。そこで本研究では高感度、短時間で検出可能で、小型化が容易、低コストなどの利点がある電気化学的手法を用いた POCT 可能なストレス検出バイオセンサの構築を目的とした。

コルチゾール検出のために、シュードノット構造を持つアプタマーを分子認識素子として用い、金電極上に Au-S 結合を介して固定化し、末端にメディエーターとしてフェロセンを修飾した電極を作製した。ここでシュードノット構造とは、少なくとも2つのステムループ構造を含む核酸の二次構造で、一方にステムの片側が他方のステムの間に位置している構造である。電極表面において、アプタマーがコルチゾールと特異的に結合した際、アプタマーの高次構造が変化しメディエーターが電極表面に接近し、電流値が増加する。一方で、コルチゾール濃度を薄くすると、メディエーターは元の構造に戻り電流値は減少する。この電流値変化をシグナルとすることでコルチゾールの検出が可能となる(Fig.1)。シュードノットアプタマーを固定化した金電極をセンサ電極とし、3電極系により、CV(Cyclic Voltammetry)と i-t(Chronoamperometry i-t)を用いて電流値の増加が見られた。これはセンサ表面へ固定化されたアプタマーがコルチゾールを認識し構造変化を起こし、メディエーターであるフェロセン分子が電極近傍に接近したことが示唆される。また、バッファーを添加することでコルチゾール濃度を下げていくと電流値の減少が確認された。これは、化学平衡に基づきコルチゾールがアプタマーから解離することで、元のシュードノット構造に戻りフェロセンが電極近傍から離れたことで電流値が減少したと考えられる。以上の結果から、コルチゾールレベルの増減が測定可能であることが示唆された。

今後、標的以外のタンパク質を添加した際でもコルチゾールにのみ特異的に反応するかと電極の安定性評価をする。最終的には血中のコルチゾール濃度変化を測定し、ストレスの POCT に応用できるのではないかと考える。

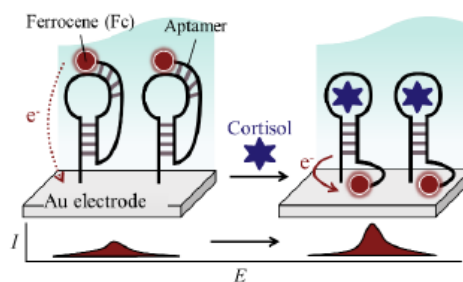


Fig.1 Detection principle of cortisol sensor

喉頭がんスマート監視を目指した miRNA 画像検査技術の構築

○柳原愛璃¹、渡部結衣¹、神田真穂¹、中居桃花¹、Han-Sheng Chuang²、

長谷川達人¹、坂元知里³、高村映一郎¹、坂元博昭¹

(¹ 福井大学、² National Cheng Kung University、³ 福井工業高等専門学校)

Smart diagnosis and monitoring of early-stage oral cancer based on image analysis (University of Fukui¹, National Cheng Kung University², National Institute of Technology, Fukui College) Airi Yanagihara¹, Yui Watanabe¹, Maho Koda¹, Momoka Nakai¹, Han-Sheng Chuang², Tatsuhito Hasegawa¹, Chisato Sakamoto³, Eiichiro Takamura¹, Hiroaki Sakamoto¹

喉頭がんは、がん死亡者数第4位である。現状、喉頭がんの発見はステージ3~4が多く、早期診断技術が求められる。早期発見には、簡便な検査に加え、長期的なモニタリングおよびそのデータ収集・診断が必要である。現在行われているMRI診断や内視鏡検査、CT検査は正確ながん検査として優れているが、簡易検査とは言い難く、長期的なモニタリングやデータ収集には適していない。

そこで、本研究では、腫瘍から生産されるmiRNAを標的とした簡易検査技術の確立を目的とした。喉頭がんから生産されるmiRNA-9 (miR-9; 5'-UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA-3') は血中や唾液中に含まれるため、患者から血液や唾液を採取し、miR-9を検出・定量することによってがん診断が可能になる。

本研究では、粒子表面の半面が金、半面が蛍光でコーティングされたJanus粒子を作製し、金表面上で標的miR-9を特異的に補足し、その回転ブラウン運動変化を画像解析により計測することで、標的miR-9の有無を識別する新規検査技術を企図した。Stokes-Einstein-Debye (SED)の関係式より、溶液の温度と液体の粘度が制御されている場合、粒子の回転拡散度は粒径の3乗に反比例する。したがって粒径が小さな粒子は拡散度が大きく、粒径が大きな粒子は拡散度が小さくなる。Janus粒子を用いた場合、拡散度は粒子の回転運動を行うことで得られる点滅信号の経過時間ごとの相関強度から相関時間が算出される。溶液中の粒子の回転速度の変動が相関している時間を表す相関時間は、回転拡散係数に反比例することが報告されている。このことから粒径の小さな粒子は相関時間が小さく、粒径の大きな粒子は相関時間が大きくなるため、粒子の相関時間から、Janus粒子と標的バイオマーカーの複合体が形成した際の粒径変化を検出することが可能である。一方で、本研究で標的とするmiR-9はオリゴ核酸であるため、たとえJanus粒子表面で捕捉できたとしても、粒径変化としては小さく画像による識別が困難であることが予想される。

そこで、本研究ではJanus粒子サイズの拡大を図ることで、画像解析における相関時間の増大させるためにローリングサークル増幅(RCA: Rolling Circle Amplification)を導入した(図1)。miR-9とmiR-9の一部相補的な配列をもつpadlockDNAとで環状DNAを形成し、ヤス粒子表面のpDNAによって捕捉した後、phi29 DNAポリメラーゼにより、環状DNAを鋳型としてpDNAを伸長する。その結果、Janus粒子表面上で、標的RNA-RCA環状DNAの増幅産物により粒子サイズの拡大、回転ブラウン運動に伴う相関時間の増大が可能となる。miR-9を含むサンプルにおいて、相関時間の増加が確認された。これは、Janus粒子表面での標的miRNA-9の補足、および、RCAのよる粒径拡大が生じたいことが示唆される。

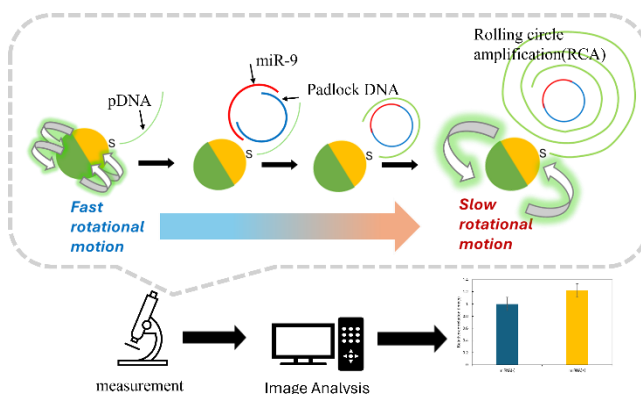


図1 喉頭がん由来miR-9のJanus粒子による補足とRCA増幅による画像検査技術

DNA アプタマー標識ビーズの蛍光イメージングに基づく多成分生体分子検出

○三尾玲緒斗・西原達哉・田邊一仁（青学大院理工）

Multiplex biomolecular analysis based on the fluorescence imaging of DNA aptamer-labeled beads (Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) MIO, Reoto; NISHIHARA, Tatsuya; TANABE, Kazuhito

DNA アプタマーは一本鎖の DNA から構成され、抗体と同様に立体構造に依存した標的との結合が可能である。SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法¹⁾の報告を契機に、様々な DNA アプタマーの取得法が考案されており、低分子から細胞に結合するものまで多種多様な種類の DNA アプタマーが取得されている。また、得られた DNA アプタマーに対して、蛍光基を修飾し、標的の認識に伴う蛍光特性の変化を読み出すことにより、標的分子のセンシングも可能である。そのため、様々な種類の DNA アプタマーを用いることで、多成分の生体分子を同時に解析可能になると期待される。しかしながら、蛍光法を用いる場合、蛍光波長の重なりから、同時解析する場合に、利用可能な蛍光色素が限られる。

以上を踏まえ、本研究では多成分の生体分子の同時解析を可能にする新たな方法論の構築に取り組んだ (Figure 1)。まず、解析対象分子を認識する DNA アプタマーを標識したビーズを、対象分子の数だけ作成する。次に、得られた DNA アプタマー標識ビーズカクテルに対して、サンプルを加える。本ビーズに標識する DNA アプタマーは、標的の認識に伴い二重鎖が解け、ビーズから遊離するように設計されている。そのため、蛍光顕微鏡を用い、ビーズごとの FAM 由来の蛍光量の減少から標的分子の定量が実現する。多成分解析にあたり、ビーズごとに標識された DNA アプタマーの識別が必要となる。そこで、ビーズごとに、異なる量の Cy5 の標識を検討した。各ビーズから得られる Cy5 の蛍光量、およびビーズ自体のサイズ情報から、ビーズ上の DNA アプタマーを識別可能となる。サンプルを加え、一定時間を経過した後、蛍光顕微鏡で観察し、各ビーズに含まれる FAM、及び Cy5 蛍光強度を読み出すことで、多成分解析が実現すると考えた。

本研究戦略の実現可能性を検証するにあたり、がんのエネルギー代謝と関連する乳酸、およびグルコースの同時検出に取り組んだ。既報の乳酸、およびグルコースに対する DNA アプタマー²⁾に対して FAM を標識し、DNA 標識ビーズをそれぞれ作成した。乳酸、およびグルコースを含む条件で、それぞれ直交的に認識が生じ、各ビーズから得られる FAM の蛍光強度の減少が確かめられた。また、Cy5 の蛍光標識量の制御にも成功しており、ビーズサイズ、および Cy5 の蛍光強度の違いから、10 成分以上のビーズの識別可能性が示唆された。本発表では、これらの詳細について報告する。

本研究戦略の実現可能性を検証するにあたり、がんのエネルギー代謝と関連する乳酸、およびグルコースの同時検出に取り組んだ。既報の乳酸、およびグルコースに対する DNA アプタマー²⁾に対して FAM を標識し、DNA 標識ビーズをそれぞれ作成した。乳酸、およびグルコースを含む条件で、それぞれ直交的に認識が生じ、各ビーズから得られる FAM の蛍光強度の減少が確かめられた。また、Cy5 の蛍光標識量の制御にも成功しており、ビーズサイズ、および Cy5 の蛍光強度の違いから、10 成分以上のビーズの識別可能性が示唆された。本発表では、これらの詳細について報告する。

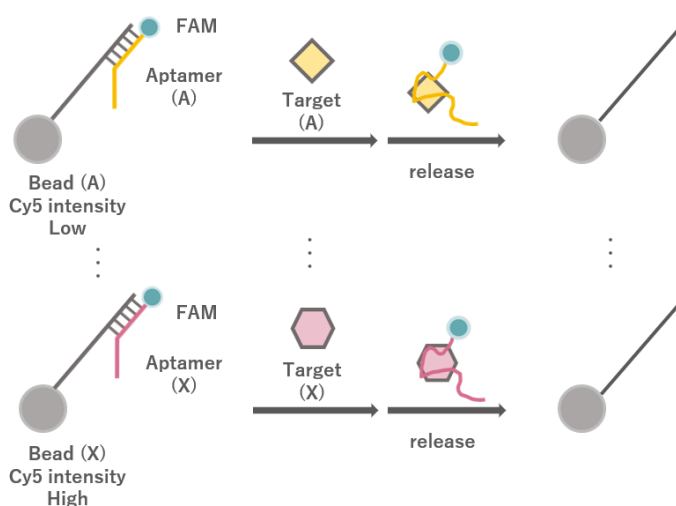


Figure1. Multiplex biomolecular analysis using DNA aptamer labeled beads

1) A. D. Ellington, and J. W. Szostak, *Nature*, **346**, 818-822 (1990).

2) P. J. Huang, and J. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **62**, e202212879 (2023).

ヒト腸管モデルにおけるアルカリホスファターゼ活性の

定量評価に向けた多孔膜電極デバイス

○谷和佳奈¹・宇田川喜信¹・阿部博弥^{1,2}・伊野浩介¹・珠玖仁¹(¹東北大学工学研究科、²東北大学学際科学フロンティア研究所)

Porous Membrane Electrode Device for Quantitative Evaluation of Alkaline Phosphatase Activity in a Human Intestinal Model (Graduate School of engineering, Tohoku University¹, Frontier Research Institute for Interdisciplinary Sciences, Tohoku University²) TANI, Wakana¹; UTAGAWA, Yoshinobu¹; ABE, Hiroya^{1,2}; INO, Kosuke¹; SHIKU, Hitoshi¹

薬剤開発において動物実験が用いられてきたが、ヒトとの生物学的な違いや、倫理的な問題を抱えている。そこで、ヒト培養細胞を用いた薬剤評価が注目されている。生体模倣システム (MPS) は、生体内の環境をより正確に再現し、幅広い条件の検討を効率的に実施できるため、研究が進められている。多孔膜上に細胞を培養することで、細胞層のバリア機能や薬剤透過性を評価することができ、一般的に経上皮電気抵抗 (TEER) 計測で細胞のバリア機能が評価される。しかし、デバイス内で代謝活性を評価できるシステムは少ない。本研究では、デバイス上に培養した細胞の電気化学的評価を見据えて、バイオマーカーとして使える可能性があるアルカリホスファターゼ (ALP) の定量評価を行った。

ALP は、リポ多糖類 (LPS) のリン酸結合を除去して解毒できる脱リン酸化酵素であり、*p*-aminophenyl phosphate (PAPP) を基質として、電気化学計測が可能な *p*-aminophenol (PAP) を産生する (Fig. 1)。ALP が 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 mU/mL となるように、PAPP を含む Tris-HCl 緩衝液 (pH=9.0) で調整し、その混合溶液をインキュベータ内で 30 分反応させた後電気化学測定を行った。またポリカーボネート多孔膜に金を無電解メッキした多孔膜電極 (ハインツテック株式会社) の上に、ヒト腸管モデルで一般的に使用される Caco-2 を 2 日間培養した。それを PAPP を含む Tris-HCl 緩衝液で 3 分間処理し、電気化学測定を行った。

-0.1~0.3 V でのアンペリメトリーにより ALP の活性測定を行った。その結果、濃度が大きくなるほど電流も増加した (Fig. 2(a))。これより、この測定法で ALP の活性を測れることが分かった。また、Caco-2 を 2 日間培養したデバイスで同様に ALP 活性を測定した結果、Caco-2 を培養していないデバイスよりも電流の増加が見られた (Fig. 2(b))。ここからデバイス上の細胞の ALP 活性を検出できたことを確認した。ALP の活性を測る際に PAP 等の細胞に有毒な物質が生成される。従来の吸光度測定では 30~60 min の処理が必要となるが、今回の電気化学測定は、反応場の近傍に電極があるため 3 min の処理で計測可能であり、細胞への毒性が軽減される可能性があるシステムを開発できた。

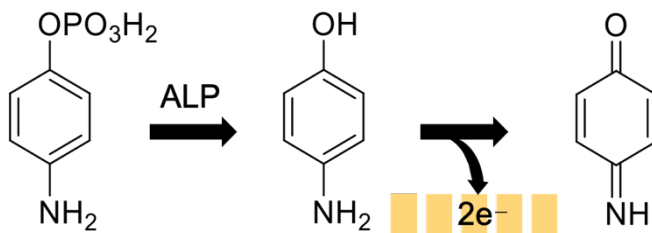


Fig. 1 ALP 活性測定の機構

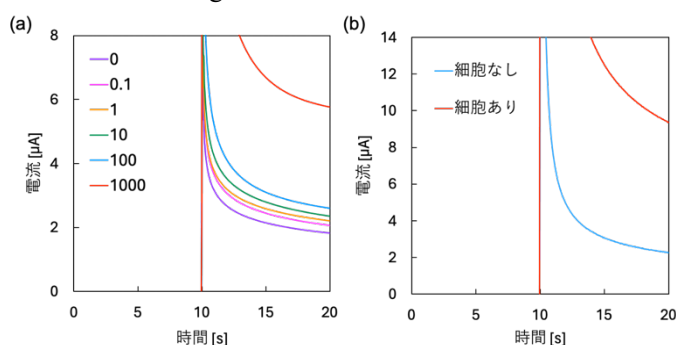


Fig. 2 (a) ALP、(b)細胞のアンペロメトリー測定

システイン付加型人工インスリンレセプタによるインスリンの EIS 測定

○野原一真¹, 佐藤嘉哉², 有田栄次², 矢口喜明², 池田丈¹, 石田文典¹,

廣田隆一¹, 黒田章夫¹, 舟橋久景¹ (広島大¹, テルモ株式会社²)

EIS Measurement of Insulin Using a Cysteine-Modified Artificial Insulin Receptor

Kazuma Nohara¹, Hiroya Sato², Eiji Arita², Yoshiaki Yaguchi², Takeshi Ikeda¹, Takenori Ishida¹, Ryuichi Hirota¹, Akio Kuroda¹, Funabashi Hisakage¹ (Hiroshima Univ.,¹ Terumo Corp.)²)

[目的]インスリンは血糖値調節のための重要な因子であり、血中濃度の測定が望まれる。しかし、現在普及している測定法は糖尿病患者等が手軽に行えるものではない。そこで我々は、ポータブル電気化学バイオセンサの開発を目指して、インスリン測定用人工タンパク質レセプタの開発を行っている。本研究では、金-チオール間共有 (Au-S) 結合を利用して電極表面へ固定可能な人工レセプタを開発し、それを利用したインスリン電気化学測定系の確立を目指した。

[方法]インスリン認識部位として、天然インスリン受容体のインスリン認識部位である α CT セグメントと L1CR ドメインを利用した⁽¹⁾。これら二つの部位をリンカーでつないだ人工レセプタ^{(2), (3)}の N 末端側に Antifouling ペプチド配列 (Af)⁽⁴⁾ とシステイン (Cys) を付加した人工レセプタ Cys-Af- α L を新たに作製した (Fig. 1)。また、 α CT セグメントに変異を加え、インスリン認識能を欠損させた Mut-Cys-Af- α L も作製した。人工レセプタは、N 末端 Cys 残基のチオール基を利用して、Au-S 結合により金電極表面へ自己集積させた。この人工レセプタ修飾電極のインスリンに対する電気化学的応答を、電気化学インピーダンス分光法 (EIS) を用いて評価した (Fig. 2)。EIS 測定は、5 mM [Fe(CN)₆]^{3-/4-} の存在下、緩衝液中で行った。得られた応答を解析し、ナイキストプロットから電荷移動抵抗 R_{ct} を求めた。

[結果・考察]Cys-Af- α L 修飾電極のインピーダンス応答は、インスリン濃度が高くなるにつれて、 R_{ct} が大きくなった。一方、Mut-Cys- α L 修飾電極はインスリンに対してほとんどインピーダンス応答を示さなかった。このことから Cys-Af- α L 修飾電極における R_{ct} の上昇は、Cys-Af- α L がインスリンを認識・構造変化を起こした結果、界面電荷移動をより阻害したためと考えられる。以上のことから、Cys-Af- α L 修飾電極を用いた EIS 測定によってインスリンが電気化学的に測定可能であることが示された。

References

(1) Menting JG *et.al.*, *Nature*, 493, p241 (2013), (2) Shigeto H *et. al.*, *Analyst*, 144, p3765 (2019), (3) Murai Y, *et.al.*, *Electrochemistry*, 92, 022006 (2024), (4) Nowinski AK *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, p6000 (2012)

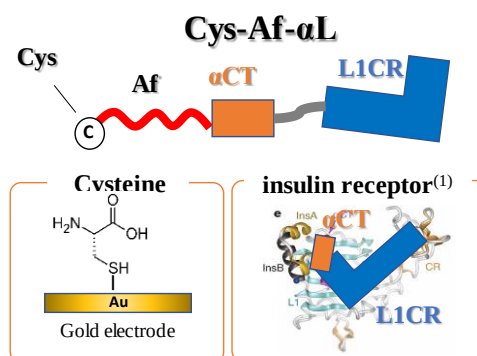


Figure 1. The artificial insulin receptor in this research

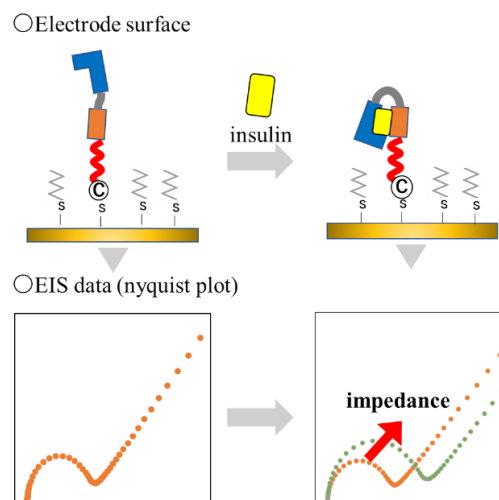


Figure 2. The principle of insulin measurement

ヒト直交性のあるキシロシダーゼを増感酵素とする

沈着型蛍光性基質の開発

○黒田 晃大¹・古賀 郎寛¹・宮崎 裕之¹・金子 諒右²・新居 輝樹²・岸村 顕広^{2,3}・森 健²・片山 佳樹^{2,3} (¹ 九大院システム生命、² 九大院工、³ 九大分子システム科学センター)

Development of a fluorescent substrate which deposits on cells in response to human orthogonal xylosidase.
(Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu Univ.¹, Graduate School of Engineering, Kyusyu Univ.², Center for Molecular Systems, Kyushu Univ.³) KURODA, Akihiro¹; KOGA, Akihiro¹; MIYAZAKI, Yuji¹; KANEKO, Ryosuke²; NII, Teruki²; KISHIMURA, Akihiro^{2,3}; MORI, Takeshi²; KATAYAMA, Yoshiki^{2,3}

【緒言】 バイオ分析において、酵素増感法は抗原タンパク質の検出に広く用いられている。この手法では酵素反応により検出シグナルを増強可能であるため、通常の蛍光抗体法では検出困難である低発現量のタンパク質も分析できる。これまでに当研究室では、従来の増感酵素に代わるヒト直交性酵群 (Human Orthogonal Enzymes: HOEs) をこれまでに提案してきた¹。HOEs はヒト細胞に存在しないため、従来の酵素で問題となるバックグラウンドシグナルの抑制が可能である。さらに、互いに交差反応せず、同一の条件で高い反応性を示すことから同時に使用できる。本研究では、HOE を用いて細胞表面上の抗原タンパク質を検出するための基質である HOE-QS (HOE-reactive-Quinone methide Substrate) を開発した。HOE-QS は、HOE と酵素反応することでキノンメチド構造を有する化合物に変化し、これにより標的タンパク質の特異的な染色が可能になる。また、我々が開発した基質と異なり、キノンメチド部を蛍光部から分離することで様々な蛍光基を容易に導入できるようにした。本発表では、HOE の一種、キシロシダーゼ (Xyl) に応答して細胞の染色を可能とする染色基質 HOE-QS-X (図 1) について報告する。

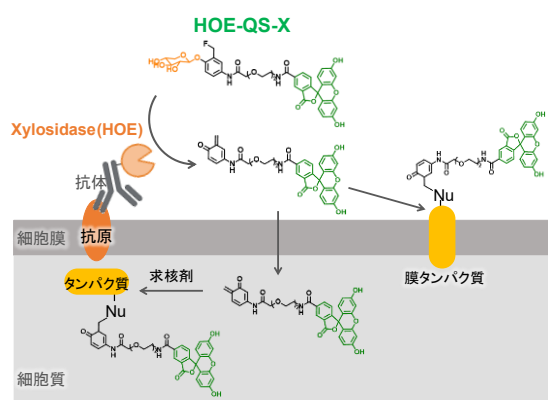


図 1 HOE-QS による細胞染色

【実験】 キシロースを出発物質として計 11 段階の反応で、HOE-QS-X を合成した。目的物は質量分析法及び核磁気共鳴分光法にて同定した。HOE-QS-X を PC9 細胞上に発現している抗原タンパク質 CD44 の検出に適用した。ビオチン化した Xyl 及び抗 CD44 抗体をストレプトアビジンで架橋し、これによってヒト細胞上の CD44 を標識した。HOE-QS-X を添加し 37 °C で反応させた後、フローサイトメトリー (FCM) と蛍光顕微鏡を用いて細胞染色を評価した。

【結果と考察】 FCM と蛍光顕微鏡観察により、HOE-QS-X と Xyl を用いたヒト細胞上 CD44 に応答した染色に成功した (図 2)。以上の結果より、HOE-QS-X は Xyl に応答して細胞を染色できる有用なプローブであることが示唆された。今後は、HOE の一種、ラムノシダーゼとその HOE-QS 基質を併用することで細胞や組織の多色増感検出へと応用する。

アイソタイプコントロール

細胞染色

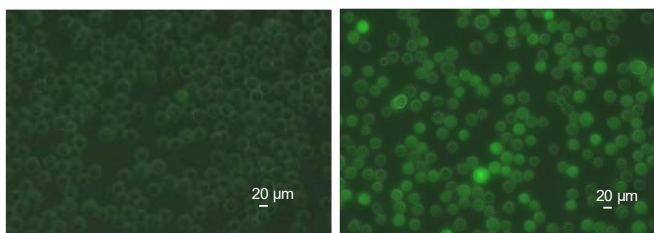


図 2 蛍光顕微鏡観察の結果

1. R.Kaneko, et al. Chem. Lett. 50, 8, 1493-1495 (2021)

「ヒト直交性酵素」を用いた微小液滴内での抗原タンパク質の超高度検出

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

Highly sensitive detection of antigen proteins in microdroplets using human orthogonal enzymes (Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University¹, Graduate School of Engineering, Kyushu University², On-chip Biotechnologies Co., Ltd.³) KAGUMA, Ryosei¹; KANEKO, Ryosuke²; KOGA Akihiro¹; FUJIMURA Yuu³; NII Teruki²; KISHIMURA Akihiro²; MORI Takeshi²; KATAYAMA Yoshiki²

微小液滴に基づくマイクロ流路システムは、生物試料のハイスループットな解析に有用である。用途の一つとして、1細胞レベルで、哺乳類細胞の分離・同定が期待されている。すなわち、酵素-抗体複合体を用いることで、ヒト細胞に発現する抗原タンパク質を検出し、細胞種の同定が可能である(図1)。原理的には数個のコピー数しかない抗原タンパク質を検出できるため、超精密な細胞の同定ができる可能性がある。しかし、これまで用いられてきた増感酵素(β -ガラクトシダーゼなど)は、ヒト細胞に同一の活性が内在するため、これを失活させる操作が必要であり、これは細胞死を導いてしまう。一方、我々のグループは、ヒト細胞に活性が存在しない増感酵素「ヒト直交性酵素」を複数同定し、これにより、生細胞の複数の抗原を同時に多色で検出できることを示してきた。¹本研究は、これらの酵素を微小液滴に適用することにより、数個しかないコピー数の抗原によって、ヒト細胞の分離・同定を達成することを目指した。

ヒト直交性酵素として *Enterobacter asburiae* 由来の β -キシロシダーゼ、蛍光性基質としてフルオレセイン β -D-キシロピラノシドを用い、water-in-oil 液滴中での酵素反応性を評価した。フッ素系の油相を用い、On-chip Droplet Generator により、酵素と蛍光性基質を内包した液滴(直径 40 μ m)を作製した。この液滴をインキュベートし、酵素反応を促進させることで、蛍光シグナル強度の変化を評価した。

液滴中に 0.1 nM の酵素と 10 μ M の蛍光性基質を内包されたとき、蛍光シグナルの時間依存的な増加を確認した。このとき、1つの液滴に 2,000 分子の β -キシロシダーゼが存在することになる。したがって、少なくとも 2,000 コピーの低発現の抗原を検出できることが示唆された。



図1 細胞膜タンパク質に基づいた一細胞分析

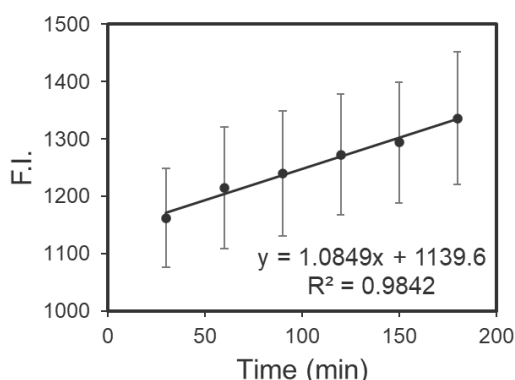


図2 微小液滴における蛍光強度の経時変化

1. R. Kaneko, *et al.*, BUNSEKI KAGAKU. 71, 3, 101–107 (2022)

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

○重松怜志・波多野浩也・石田文典・池田丈・廣田隆一・黒田章夫・舟橋久景（広島大学）

Direct detection of target nucleic acids on a solid surface by spraying DNA-nano-tweezers biosensing molecule.
(Hiroshima University) SHIGEMATSU, Reiji; HATANO, Hiroya; ISHIDA, Takenori; IKEDA, Takeshi; HIROTA, Ryuichi; KURODA, Akio; FUNABASHI, Hisakage

COVID-19 のパンデミックにより、ウイルスや病原体などを検出する簡便な方法の開発が多数行われるようになった。これらの方法のほとんどは、サンプリングによって標的を採取し、水溶液中に抽出してから、種々のアッセイ法によって検出を行う。したがって、接触感染などによる感染拡大が懸念される、固体表面上の標的を検出する場合には、固体表面上の標的を拭き取り、それを水溶液中に抽出する必要がある。しかし、拭き取り作業は、単に操作が煩雑であるというだけでなく、固体表面上のどの位置にどの程度の量が存在したか、など標的に関する多くの重要な情報が失われてしまう。したがって、固体表面上の標的を直接検出する新しい方法を開発することが重要である。そこで本研究では、「標的を認識したときにのみ検出しやすいシグナルを産生するバイオセンシング分子」をスプレー噴霧し、イメージングにより固体表面上の標的を直接検出する新しいアッセイ法を提案する。

本研究では、当研究室で開発した DNA ナノ・ピンセット構造体バイオセンシング分子 (DNA-NT) を利用する⁽¹⁾⁽²⁾。DNA-NT は、標的核酸を認識すると、開いた状態から閉じた状態へと構造を変化させ、ヘミンを補酵素としてペルオキシダーゼ活性を示す (Figure 1)。そこで、この DNA-NT を固体表面へスプレー噴霧

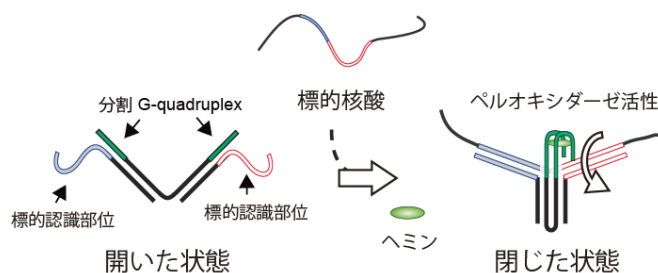


Figure 1. DNA-NT の原理

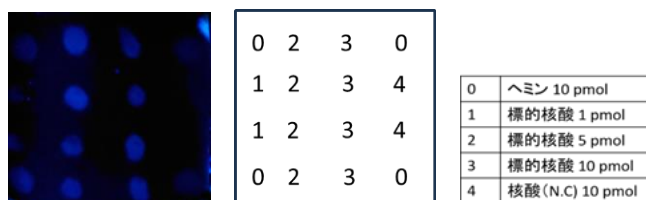


Figure 2. スマートフォンによって撮影した、DNA-NT スプレー後の発光イメージ

すれば、標的核酸が存在する箇所だけ DNA-NT がペルオキシダーゼ活性を示すと期待される。標的核酸、ポジティブコントロールとしてルミノールの発光反応を触媒する高濃度ヘミン、ネガティブコントロールとして今回用いる DNA-NT が認識しない核酸を濾紙上にスポットし、乾燥させた。DNA-NT とヘミンをエアークンプレッサーによって噴霧した。10 分後、エアークンプレッサーによってルミノール溶液をさらに噴霧し、直ちに暗箱内でスマートフォンを用いて写真撮影を行った。その結果、標的核酸をスポットした場所からルミノール発光が観察され、ネガティブコントロールの核酸をスポットした場所からは発光が観察されなかった (Figure 2)。以上の結果から、DNA-NT、シグナル産生基質をスプレーの後、スマートフォンを用いて撮影することによって、固体表面上の標的をイメージングにより直接検出する新しいアッセイ法のプラットフォーム開発に成功した。

- 1) K. Nakatsuka, *et. al.*, *Biosensors and Bioelectronics*, **74**, 222-226 (2015)
- 2) H. Funabashi, *et. al.*, *Sensors and Materials*, **34**, 3093-3100 (2022)

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¹、真辺 諄²、門場 啓一郎²、藤野 公茂¹、林 剛介¹、森信 暁雄²、岩井 一宏³、村上 裕¹
(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¹ (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¹、クリストファー ヴァヴリッカ¹、清田 洋正² (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¹、水嶋 真吾¹、竹内 優紀乃¹、林 剛介¹、村上 裕^{1,2} (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¹、藤原 綱大¹、真島 剛史¹、小林 直也¹、金井 賢一¹、松井 貴輝¹、別所 康全¹、廣田 俊¹ (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¹、蓑島 維文¹、菊地 和也^{1,2} (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¹、藤野 公茂¹、園田 凌吾¹、三城 恵美²、加納 圭子²、村上 裕^{1,3} (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¹、堂浦 智裕¹、清中 茂樹¹ (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_{2A} 受容体選択的な活性化
*鈴木 啓文¹、松葉 佑弥¹、堂浦 智裕¹、清中 茂樹¹ (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¹、幡野 明彦¹ (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¹、南畑 孝介¹、石川 聖人²、吉本 将悟³、堀 克敏³、神谷 典穂^{1,4} (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¹、伊藤 海兎¹、渡邊 愛梨¹、深田 梨沙子¹、田代 有輝¹、金岡 英徳²、清中 茂樹¹ (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¹、曾我 恭平¹、Hansel Adriel²、柴田 晃大¹、藤原 孝彰²、南後 恵理子^{2,3}、清中 茂樹¹
(1. 名古屋大学工学研究科、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¹、池田 優乃²、林 理恵¹、田中 祐圭³、吉田 亘^{1,2} (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¹、黒田 直希¹、荒川 貴博²、須磨岡 淳²、吉田 亘¹ (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¹、八塚 研治¹、渡邊 愛梨¹、深田 梨沙子¹、田代 優輝¹、金岡 英徳²、清中 茂樹¹ (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¹、堂浦 智裕¹、山崎 友照²、藤永 雅之²、張 明栄²、掛川 渉³、清中 茂樹¹ (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¹、杉本 梨緒¹、南畑 孝介²、吉本 将悟³、堀 克敏³、神谷 典穂^{2,4}、石川 聖人¹ (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¹、横江 優来¹、吉本 将悟²、堀 克敏²、石川 聖人¹ (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¹、笠原 彰友²、山次 健三² (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究院)
- [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¹、山口 将平¹、真島 剛史¹、小林 直也¹、段 練²、藤木 涼²、Kowit Hengphasatporn²、重田 育照²、緒方 英明³、一二三 恵美⁴、宇田 泰三⁵、廣田 俊¹ (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 Lin¹, Hui Yang², Eiji Nakata¹, Takashi Morii^{1,3} (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¹、Longo Liam¹、松浦 友亮¹ (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¹、古賀 大晴¹、大川 優生¹、伊藤 智之³、南畑 孝介¹、梅津 光央³、神谷 典穂^{1,2} (1. 九州大学大学院工学研究院、2. 九州大学未来化学創造センター、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^{1,2}、西山 健太郎¹、鎌田 春彦^{1,2}、大野 浩章^{1,2} (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¹、村田 武士²、安田 賢司²、福永 圭佑³、松浦 友亮³ (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¹、中根 啓太¹、菊池 智子¹、安田 早緒理¹、池ノ上 達哉²、佐藤 伸一^{1,3}、*友重 秀介¹、石川 稔¹ (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¹、荒井 堅太^{2,1} (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^{1,2}、木野 晴揮¹、樺村 青央空¹、濁川 清美^{1,2} (1. 広島大学大学院医系科学研究科、2. 広島大学薬学部)

[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¹、湯沢 哲至¹、ヴァヴリッカ クリストファー¹ (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¹、西岡 栞李²、田井 章博³、二木 史朗¹、*今西 未来¹ (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¹、Mehdi Davari²、小野田 晃¹ (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¹、中田 栄司²、森井 孝^{2,3}、桑原 淳¹ (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¹ (1. 東京農工大学工学府)

[2P-35] ONOO⁻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¹、朱 浩¹、松葉 恭一¹、浜地 格^{1,2} (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¹、高橋 泰人¹、齊藤 知恵子²、吉川 雅英²、水上 進¹ (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¹、赤川 絵里¹、澤田 真希¹、武田 康太²、藤井 敏司³、養王田 正文¹、中村 暢文¹ (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^{1,2}、後藤 祐平^{2,3}、杉山 博紀^{2,4}、築地 真也⁵、青木 一洋^{2,3} (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¹、平原 令偉¹、莫 峻凌¹、藤本 健造¹ (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¹、小山田 知輝²、影近 弘之² (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¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹ (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¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹ (1. 名古屋大学)
- [2P-43] Histidine-Cd²⁺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¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹ (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¹、稲葉 央¹、遠藤 玉樹²、建石 寿枝²、杉本 直己²、松浦 和則¹ (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¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (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¹、金森 功史¹、河添 好孝²、杜 瑶瑶¹、吉田 七唯¹、湯浅 英哉¹ (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 HAILILI¹, Fujimoto Kenzo¹ (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¹、沖田 ひかり¹、村山 恵司¹、浅沼 浩之¹ (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¹、田口 真彦²、林 重彦¹ (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¹、永谷 恵梨佳¹、星野 秀和²、笠原 勇矢^{2,3}、小比賀 聡^{3,4}、柴原 正靖¹ (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¹、三瓶 悠¹、松崎 有修¹、駒野 淳²、柴田 淳史³、山本 剛史¹、堂野 主税⁴、和田 健彦⁵、山吉 麻子^{1,6} (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^{1,2}、奥田 修二郎³、凌 一葦³、建石 寿枝^{1,2}、杉本 直己² (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¹、前原 大悟¹、西原 達哉¹、田邊 一仁¹ (1. 青山学院大学大学院理工学研究科)
- [2P-54] 液-液相分離における DNAトポロジーの効果
*千田 隆誠¹、田立 ののか²、文屋 諒太郎²、田代 竜³、大吉 崇文^{1,2,4,5} (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¹、中村 光伸¹、高田 忠雄¹ (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¹ (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¹、小畑 健太郎¹、松原 一稀¹、松尾 和哉¹、和久 友則¹、小堀 哲生¹ (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 Asif¹, Eiji Nakata^{1,2}, Peng Lin^{1,2}, Morii Takashi³ (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^{1,2}、PATHAK Soumitra^{1,2}、百武 篤也³、池袋 一典⁴ (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¹、勝田 陽介^{1,2}、木田 朋輝¹、佐藤 慎一^{1,2}、北村 裕介¹、井原 敏博¹ (1. 熊本大学大学院先端科学研究部、2. 株式会社StapleBio)

- [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¹、小野 高広¹、上田 卓見^{2,3}、竹内 恒³、森本 淳平¹、山東 信介¹ (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¹、藤本 和久¹、長門石 暁²、津本 浩平²、阪本 知樹³、山置 佑大³、永田 崇³、片平 正人³、柴田 奈津希⁴、大吉 崇文^{4,5,6} (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¹、山崎 正幸²、富崎 欣也¹ (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¹、日高 由梨¹、池田 拓未¹、大洞 光司¹、林 高史¹ (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¹、富崎 欣也¹ (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¹、笠原 彰友²、山次 健三² (1. 千葉大学薬学部、2. 千葉大学大学院薬学研究院)

- [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¹、稲葉 央¹、角五 彰²、松浦 和則¹ (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¹、稲葉 央¹、角五 彰²、松浦 和則¹ (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¹、佐藤 智典¹、松原 輝彦¹、鈴木 寧々¹ (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¹、小澤 英知¹、林 剛介¹、村上 裕^{1,2} (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¹、沼田 圭司^{1,2,3} (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^{1,2}、角田 達彦³、野本 悌吾³、藤井 七彩³、池本 光志⁴、宮前 友策¹ (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¹、小田井 柊也¹、MO Junling¹、藤本 健造¹ (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¹、若林 里衣¹、神谷 典穂¹、後藤 雅宏¹ (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¹、越山 友美¹ (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¹ (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¹、佐藤 史也¹、エルナンデス パニアグア リリアナ アレハンドラ¹、稲垣 奈都子²、伊藤 大知²、吉野 大輔¹、寺 正行¹ (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¹、金森 功史¹、飛田 飛田健司¹、能城 地洋¹、小倉 俊一郎¹、湯浅 英哉¹ (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¹、若林 里衣¹、後藤 雅宏^{1,2}、神谷 典穂^{1,2} (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 Tan¹, Rie Wakabayashi¹, Noriho Kamiya^{1,2}, Masahiro Goto^{1,2} (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 晃一¹、南出 悠貴¹、橋本 毬亜¹、田中 喜基¹、真野 祐樹¹、葛谷 明紀¹ (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¹、小林 茉穂¹、関 篤也¹、小寺 南渡¹、加藤 紀弘¹、奈須野 恵理¹ (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¹、筒井 啓太¹、吉川 優¹、築地 真也¹ (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¹、森 英樹¹、原 正之¹ (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¹、古田 寿昭¹ (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¹、古田 寿昭¹、佐藤 創¹ (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¹、河合 靖¹ (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リタキサンの開発
*天満 裕太¹、幡野 明彦² (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^{1,2}、岩井 悠馬¹ (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¹、牛島 成実²、奈須野 恵理²、加藤 紀弘² (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_{2A}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¹、堂浦 智裕¹、清中 茂樹¹ (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¹、針尾 紗彩¹、寺井 琢也¹、キャンベル ロバート¹ (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¹、西村 賢宣¹ (1. 筑波大学)
- [2P-94] An efficient affinity maturation method for antibody-like proteins by using CRISPR/dCas9 system
*MingYao Yan¹, Ryusei Matsuo², Tomoshige FUJINO¹, Gosuke HAYASHI¹, Hiroshi MURAKAMI^{1,2} (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 憲二¹、丹羽 史佳¹、上原 亜久理¹、上村 英大¹ (1. 東京工科大学応用生物学部)
- [2P-96] シ⁺ヘ⁺フ⁺チト⁺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¹、Elhelaly Abdelazim²、明田 悠希¹、兵藤 文紀²、松尾 政之²、大澤 毅¹、小松 徹³、浦

野 泰照^{3,4}、齋藤 雄太郎¹、山東 信介¹ (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¹、川井 麻那歌¹、鈴木 寧々¹、佐藤 智典¹、松原 輝彦¹ (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¹、*徐 千茗²、平賀 健太郎³、早出 広司⁴、津川 若子¹、池袋 一典¹、浅野 竜太郎¹ (1. 東京農工大学大学院工学府、2. 東京農工大学工学部、3. 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^{1,2}、川畑 まどか¹、藤田 和弘²、平間 正博¹、*円谷 健¹ (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¹、尾台 俊亮¹、伊藤 栄紘¹、蒲池 利章¹ (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^{1,2}、民谷 栄一^{1,2} (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^{1,2}、Liao Hao-Xiang²、Li Menglu^{1,2}、藤田 克昌^{2,1} (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¹、金子 諒右²、立石 宙也¹、古賀 朗寛¹、細川 尊夏¹、加隈 綾晟¹、谷戸 謙太¹、山中 皓太¹、新居 輝樹²、岸村 顕広^{2,3}、森 健²、片山 佳樹^{2,3} (1. 九州大学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¹、成住 凌¹、北村 裕介¹、勝田 陽介¹、井原 敏博¹ (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¹ (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¹、三枝 拓^{1,2} (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¹、三枝 拓^{1,2} (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¹ (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¹、石原 大馳¹ (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¹、真辺 諄²、門場 啓一郎²、藤野 公茂¹、林 剛介¹、森信暁雄²、岩井 一宏³、村上 裕¹ (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)

Development of highly sensitive monobodies targeting the HOIP-PUB domain (Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Nagoya University¹, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Graduate School of Medicine, Kyoto University², Department of Molecular and Cellular Physiology Graduate School of Medicine Kyoto University.³) Kiyose Sakai¹, Atsushi Manabe², Keiichiro Kadoba², Tomoshige Fujino¹, Gosuke Hayashi¹, Akio Morinobu², Kazuhiro Iwai³, Hiroshi Murakami¹

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- κ B シグナル伝達の重要な制御因子である¹。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^{1,2}。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 monobody³を開発した (図 1)。

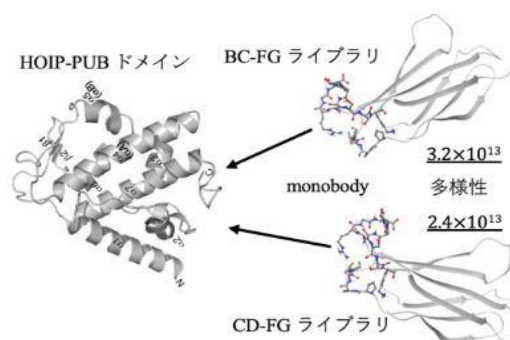


図1:HOIP-PUBドメインに対するmonobodyの選択

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⁴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⁵。

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手法の提案

○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う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エステラーゼの選択

○ニランジニ アラガッパン¹・ヴァヴリッククリストファー¹・清田 洋正² (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)

Automated Docking-Based Selection of Carboxylesterase for Deprotection of Novel Sialic Acid Analogues as Antiviral Prodrugs (TUAT Dept. Biotechnol. Life Sci.¹, Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ. ²)
NIRANNJHEENI Alagappan¹; VAVRICKA Christopher John¹; KIYOTA Hiromasa¹

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.

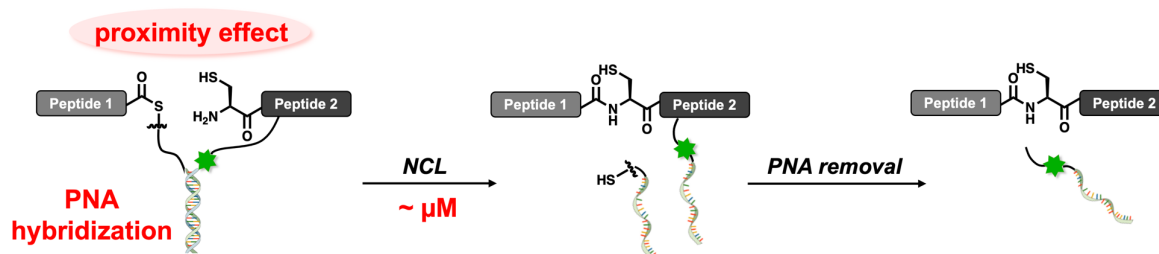
PNA 足場ペプチド連結反応を用いたタンパク質化学合成

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

PNA hybridization-assisted peptide ligation for chemical protein synthesis (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.¹, Institute of nano-life-systems, Nagoya Univ.²) SUZUKI Sae¹; MIZUSHIMA Shingo¹; TAKEUCHI Yukino¹; HAYASHI Gosuke¹; MURAKAMI Hiroshi^{1,2}

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¹。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²。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 (~μM) 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 (~μM) 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^{3,4} 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.

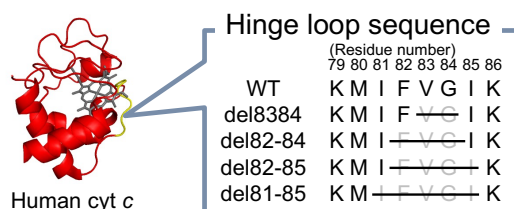


Figure 1. 本研究で用いた変異体ヒト cyt *c* のヒンジループ近傍のアミノ酸配列。

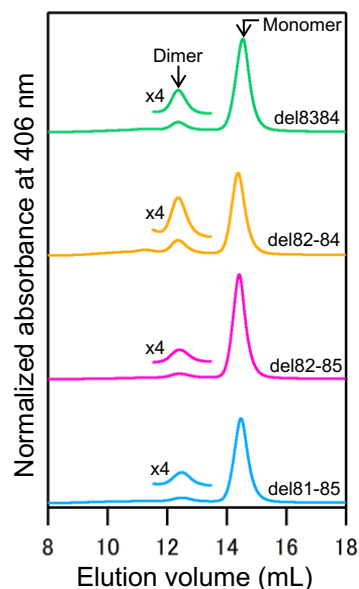


Figure 2. Cyt *c* 変異体を 37°C、120 時間静置した後の SEC 溶出曲線。

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

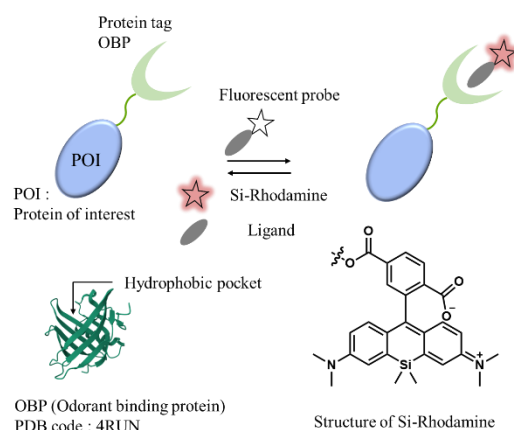
○大谷奈々¹・蓑島維文¹・菊地和也^{1,2} (¹阪大院工、²阪大免フロ)

Development of Reversible Protein Labeling Probe with Red fluorescence (Graduate School of Engineering, Osaka Univ.¹, Immunology Frontier Research Center, Osaka Univ.²) OTANI, Nana¹; MINOSHIMA, Masafumi²; KIKUCHI, Kazuya^{1,2}

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⁽¹⁾。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⁽²⁾。

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⁽³⁾。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⁽⁴⁾。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⁽⁵⁾。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¹・藤野公茂¹・園田凌吾¹・三城恵美²・加納圭子²・村上裕^{1,3} (¹ 名大院工、² 名大 ITbM、³ 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 University¹, Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University², Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University³)
HIGASHINAGATA, Taito¹; FUJINO, Tomoshige¹; SONODA, Ryogo¹; MISHIRO, Emi²; KANO, Keiko²; MURAKAMI, Hiroshi^{1,3}

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^{Ser}_{GAG}, tRNA^{Leu}_{GGA} 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^{Ser}, tRNA^{Leu} を除去し、IVT により調製したキメラ tRNA^{Ser}_{GAG}, tRNA^{Leu}_{GGA} 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。

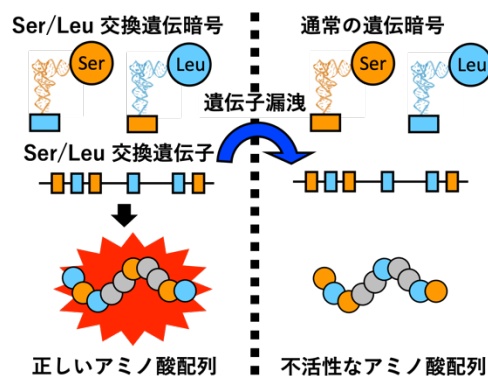


図1 Ser/Leu交換翻訳の原理

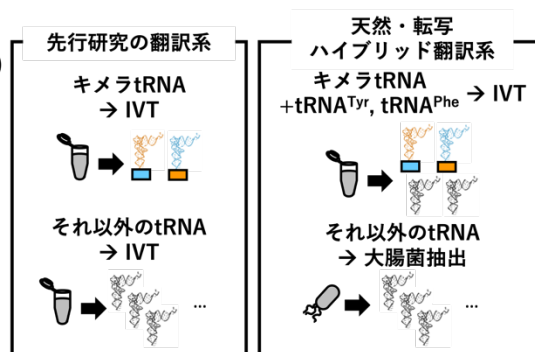


図2 天然・転写ハイブリッドtRNAを用いた遺伝暗号構築

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¹。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。

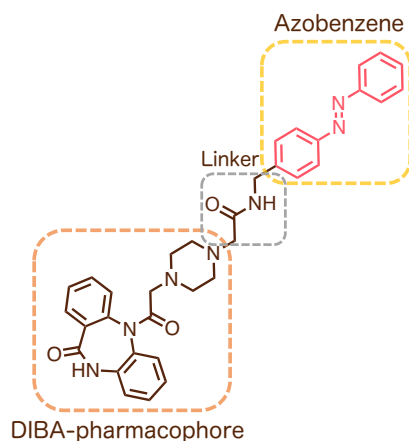


Figure 1. 光応答性リガンドの設計

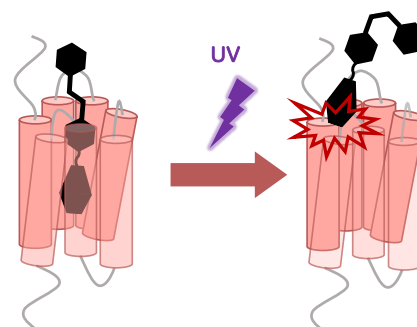


Figure 2. ムスカリン受容体の光制御

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_{2A} 受容体選択的な光活性化

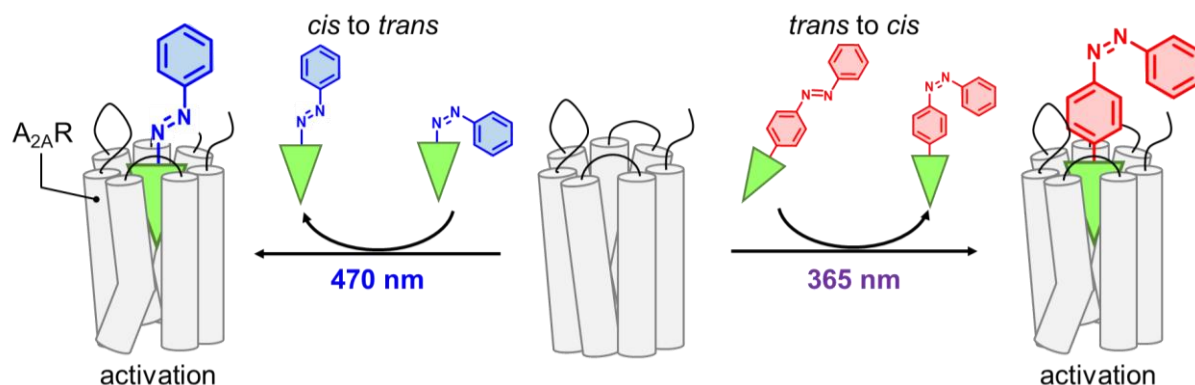
○鈴木啓文・松葉佑弥・堂浦智裕・清中茂樹（名大院工）

Photoactivation of Adenosine A_{2A} 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、A₁R、A_{2A}R、A_{2B}R、A₃R 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_{2A}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_{2A}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_{2A}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_{2A}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_{2A}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_{2A}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_{2A}R を光活性化可能かつ A_{2A}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_{2A}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_{2A}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_{2A}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_{2A}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_{2A}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。

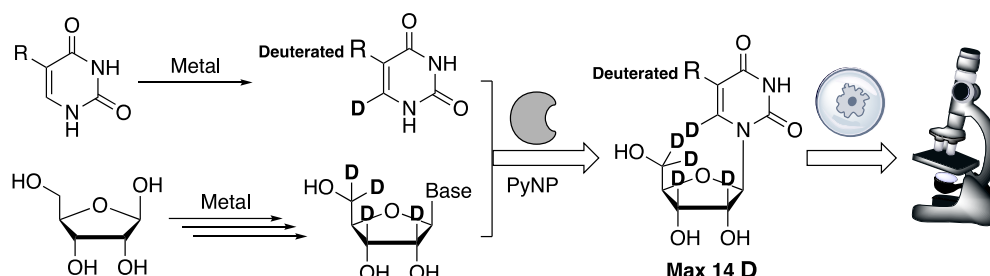


図1 金属イオンによる重水素化と酵素による塩基部位交換反応による重水素を最大 14 個有するヌクレオシドの合成

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¹・南畑孝介¹・石川聖人²・吉本将悟³・堀克敏³・神谷典穂^{1,4}

(¹ 九大院工、² 長浜バイオ大、³ 名大院工、⁴ 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 University¹, Faculty of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology², Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University³, Division of Biotechnology, Center for Future Chemistry, Kyushu University⁴) NAGATANI, Ayasa¹; MINAMIHATA, Kosuke¹; ISHIKAWA Masahito²; YOSHIMOTO, Shogo³; HORI, Katsutoshi³; KAMIYA Noriho^{1,4}

【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 μ M SC-Cstalk-SC に対して 10 μ 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。

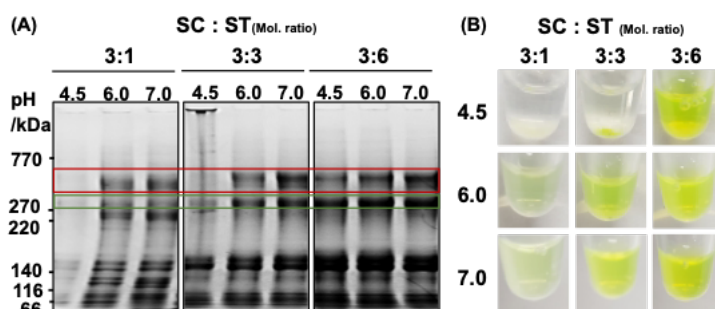


Fig. 1 SC-Cstalk-SC と ST-muGFP-ST を各濃度比で反応させたサンプルの (A) SDS-PAGE 電気泳動結果, (B) 溶液画像

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¹・伊藤海児¹・渡邊愛梨¹・深田梨沙子¹・田代有輝¹・金岡英徳²・清中茂樹¹ (¹名古屋大院工、²愛知工業大工)

A method for proteomics analysis of DNA damage foci using split protein probes (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Faculty of Engineering, Aichi Institute of Technology²) YATSUZUKA, Kenji¹; ITO, Kaiji¹; WATANABE, Airi¹; FUKATA, Risako¹; TASHIRO, Yuki¹; KANEOKA, Hidenori²; KIYONAKA, Shigeki¹

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。

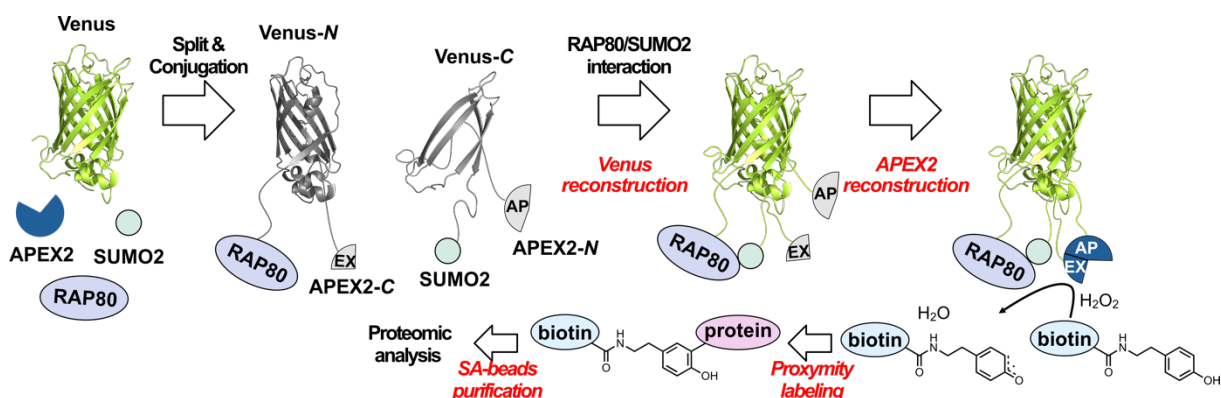


Fig. 1 : スプリットタンパク質プローブによる RAP80-SUMO 相互作用検出と近接ラベル化

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¹・曾我恭平¹・Hansel Adriel²・柴田晃大¹・藤原孝彰²・南後恵理子^{2, 3}・
清中茂樹¹(¹名大院工、²東北大多元研、³理研 Spring-8)

Development of fluorescent labeling ligand of AMPA receptor for rapid and reversible visualization

(Grad. Sch. Eng. Nagoya Univ.¹, IMRAM Tohoku Univ.², Riken Spring-8³) Nakagawa, Mayu¹, Soga, Kyohei¹, Hansel Adriel², Shibata, Akihiro¹, Fujiwara, Takaaki², Nango, Eriko^{2, 3}, Kiyonaka, Shigeki¹

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。

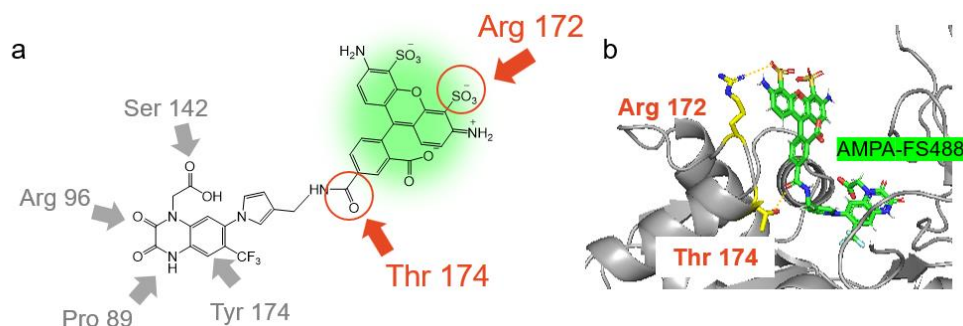


Fig. (a) Structure of AMPA-FS488. (b) Fig. 3-3 Cocrystal structure of S1S2J and AMPA-FS488.

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¹・池田優乃²・林理恵¹・田中祐圭³・吉田亘^{1,2} (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 Technology¹, School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology,² Department of Chemical Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology.³) SHOJI, Yuto¹; IKEDA, Yuno²; RIN, Rie¹; TANAKA, Masayoshi³; YOSHIDA, Wataru^{1,2}

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。本研究室ではこれまでに 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¹⁻⁵。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 OD₆₀₀ = 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¹・黒田直希¹・荒川貴博²・須磨岡淳²・吉田亘¹ (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 Technology¹, Graduate School of Sustainable Engineering, Tokyo University of Technology²) HAYAKAWA, Takaaki¹; KURODA, Naoki¹; ARAKAWA, Takahiro²; SUMAOKA, Jun²; YOSHIDA, Wataru¹

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¹⁻⁵。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、OD₆₀₀ = 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¹・八塚研治¹・渡邊愛梨¹・深田梨沙子¹・田代有輝¹・金岡英徳²・清中茂樹¹ (¹名大院工、²愛工大工)

Visualization and analysis of DNA repair foci using a specific fluorescent protein probe (Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Faculty of Engineering, Aichi Institute of Technology²) ITO, Kaiji¹; YATSUZUKA, Kenji¹; WATANABE, Airi¹; FUKATA, Risako¹; TASHIRO, Yuki¹; KANEOKA, Hidenori²; KIYONAKA, Shigeki¹

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。

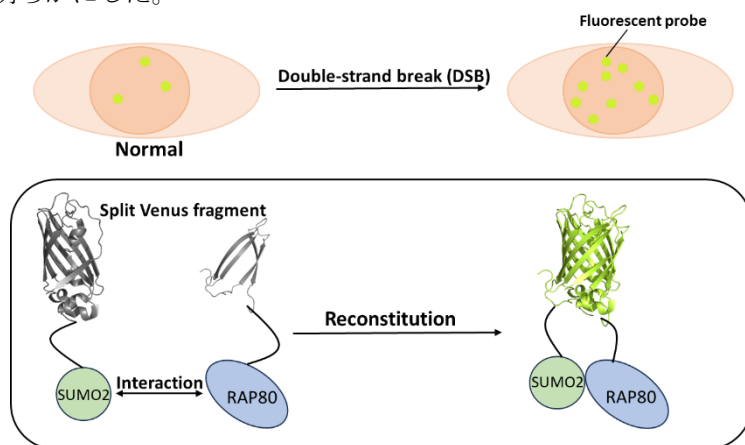


Fig. 1 DNA 修復 foci 選択的に可視化する SUMO-SIM 相互作用に基づいた蛍光タンパク質プローブ

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¹・堂浦智裕¹・山崎友照²・藤永雅之²・張 明栄²・掛川渉³・清中 茂樹¹
(¹名大院工、²量子科学技術研究開発機構、³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 Univ¹, National Institutes for Quantum Science and Technology², Keio University School of Medicine³) KONDO, Takumi¹; DOURA, Tomohiro¹; YAMASAKI, Tomoteru²; FUJINAGA, Masayuki²; ZHANG, Ming-Rong²; KAKEGAWA, Wataru³; KIYONAKA, Shigeki¹

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。

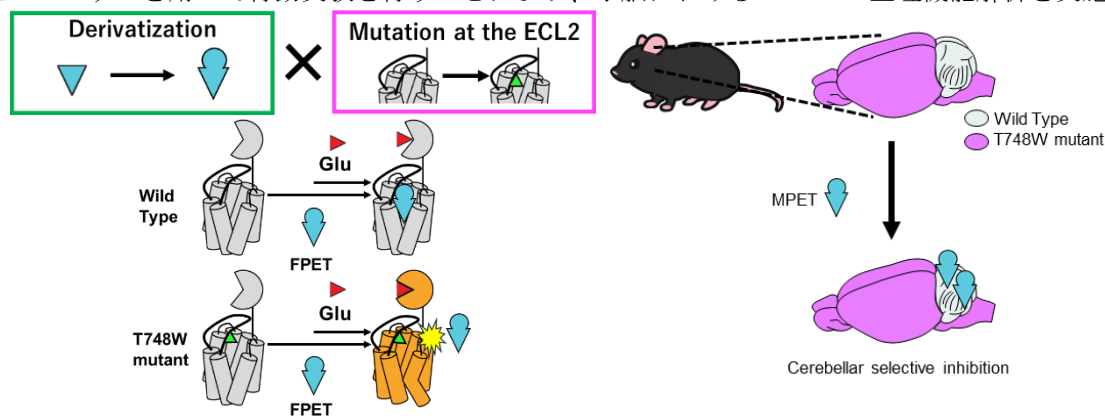


Fig. 1 eLEC による mGlu1 制御(左)と動物個体による細胞種選択的な mGlu1 制御(右)

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¹・杉本梨緒¹・南畑孝介²・吉本将悟³・堀克敏³・神谷典穂^{2,4}・石川聖人¹

(長浜バイオ大院¹、九大院工²、名大院工³、九大未来化学創造センター⁴)

Design and construction of polymerizable bacterionanofiber proteins (Grad. Sch. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. Technol.¹, Grad. Sch. Eng., Kyushu Univ.², Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.³, CFC, Kyushu Univ.⁴) YOKOE, Yuki¹; SUGIMOTO, Rio¹; MINAMIHATA, Kosuke²; YOSHIMOTO, Shogo³; HORI, Katsutoshi³; KAMIYA, Noriho⁴; ISHIKAWA, Masahito¹

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¹。AtaA は強靱性と柔軟性といった力学的特性を有しており²、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³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

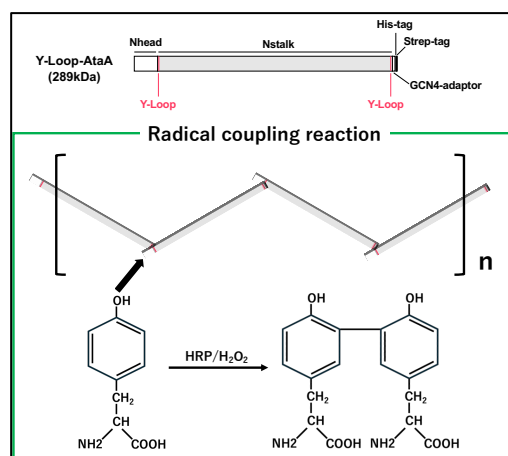


図 1. Y-Loop-AtaA とその重合反応の模式図

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¹・横江 優来¹・吉本 将悟²・堀 克敏²・石川 聖人¹ (¹長浜バイオ
院バイオ、²名大院工)

Programmable cohesive liposomes for bottom-up creation of artificial cellular biofilms (Graduate School of Bioscience, Nagahama Inst. Bio-Sci. Technol.¹, Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.²) SUGIMOTO Rio¹; YOKOE Yuki¹; YOSHIMOTO Shogo²; HORI Katsutoshi²; ISHIKAWA Masahito¹

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¹。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²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。

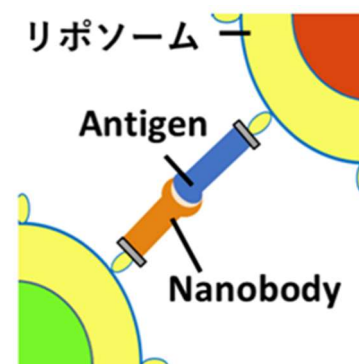


図 1 抗原抗体反応によるリポソーム凝集のイメージ図

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。

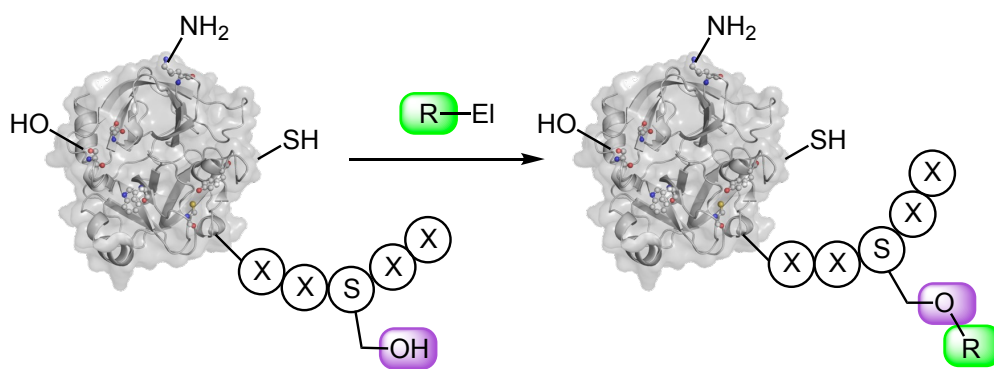


図1 本研究の目的：化学・位置選択的なタンパク質のセリン修飾

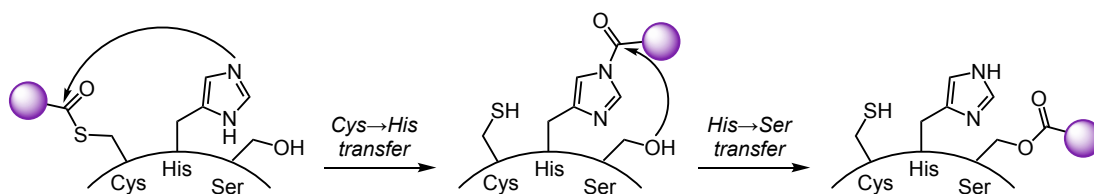


図2 システイン-ヒスチジン-セリン間の多段階アシルトランスファー

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¹、山口 将平¹、真島 剛史¹、小林 直也¹、段 練²、藤木 涼²、Kowit Hengphasatporn²、重田 育照²、緒方 英明³、一二三 恵美⁴、宇田 泰三⁵、廣田 俊¹ (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)

Search of oligomerizable antibody light chains through 3D domain-swapping and effect of copper for the oligomerization (Grad. Sch. Sci. Tech., NAIST¹, Cent. Comp. Sci., Univ. Tsukuba², Grad. Sch. Sci., Univ. Hyogo³, Inst. Res. Mgmt., Oita Univ⁴, Nano-tech Lab., ISIT⁵) SAKAI, Takahiro¹, YAMAGUCHI, Shohei¹, MASHIMA, Tsuyoshi¹, KOBAYASHI, Naoya¹, DUAN, Lian², FUJIKI, Ryo², KOWIT, Hengphasatporn², SHIGETA, Yasuteru², OGATA, Hideaki³, HIFUMI, Emi⁴, UDA, Taizo⁵, HIROTA, Shun¹

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_L) 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)¹。本研究では、V_L (#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_L 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_L 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_L 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_L 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_L 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_L 多量体は 2 量体であることが明らかになった。P1V_L 2 量体の X 線結晶構造では、P1V_L 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).

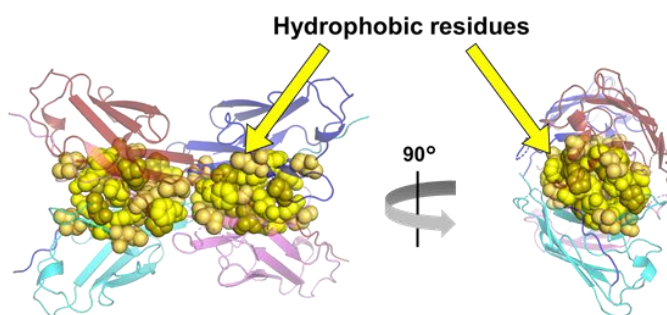


Figure 1. Tetrameric structure of V_L (#4).

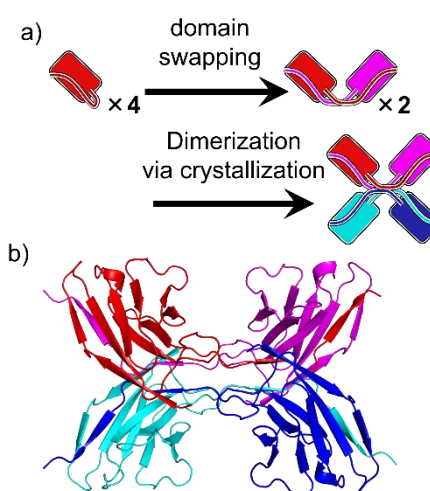


Figure 2. a) Tetramerization mechanism of P1V_L, b) Crystal structure of P1V_L (Resolution: 2.0 Å).

DNA 折り紙コンパートメント内の人工代謝経路

OLin Peng¹・Yang Hui²・中田 栄司¹・森井 孝^{1,3} (¹京都大学エネルギー理工学研、
²京都大学大学院エネルギー科学研究科、³京都光華女子大学)

Artificial metabolic pathways in DNA origami-based compartments (¹Institute of Advanced Energy, Kyoto Univ., ²Graduate School of Energy Science, Kyoto Univ., ³ Department of Health and Nutrition, Kyoto Koka Women's Univ.) LIN, Peng;¹ YANG, Hui;² NAKATA, Eiji;¹ MORII, Takashi^{1,3}

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.^{1,2} 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).³ 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.⁴ 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 H₂O₂, 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.

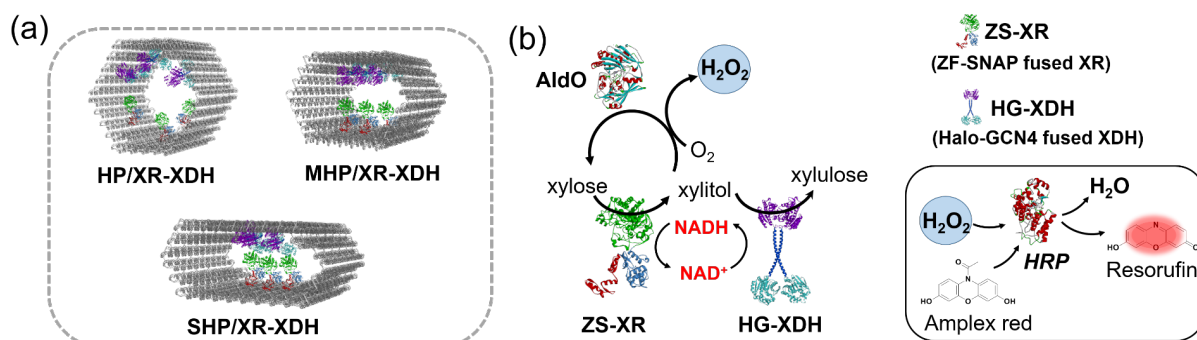


Figure1. (a) Scheme of the DNA scaffold of HP, MHP and SHP encapsulated with enzymes. (b) The cascade reaction of XR and XDH, and the competitive reaction of alditol oxidase (AldO).

- 1) P. W. K. Rothemund, *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。

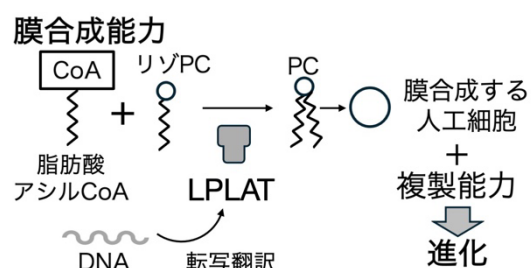


図 1. 本研究の概要

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¹・古賀大晴¹・大川優生¹・伊藤 智之³・南畑孝介¹・梅津 光央³・神谷典穂^{1,2} (¹九州大学大学院工学研究院、²九州大学未来化学創造センター、³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 (¹Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, Graduate School of Engineering,) ORITA, Kensei¹; KOGA, Taisei¹; OKAWA, Yui¹; ITO, Tomoyuki³; MINAMIHATA, Kousuke¹; UMETSU, Mitsuo³; KAMIYA, Norihiro^{1,2}

【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¹⁾。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))。

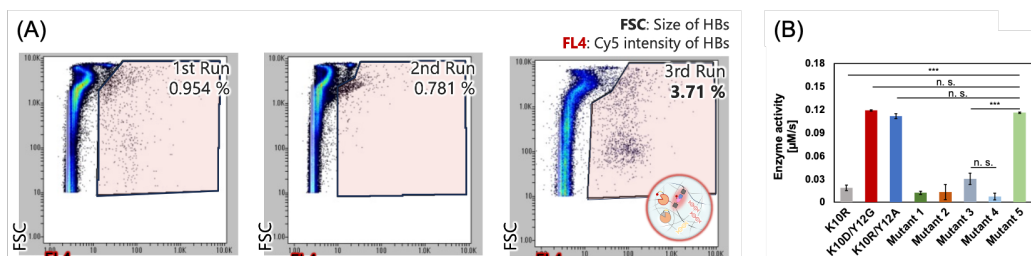


Fig. 1 (A) Results of cell sorting in each round (B) Assessment of the activity of novel mutants.

【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^{1,2}・西山健太郎¹・鎌田春彦^{1,2}・大野浩章^{1,2}

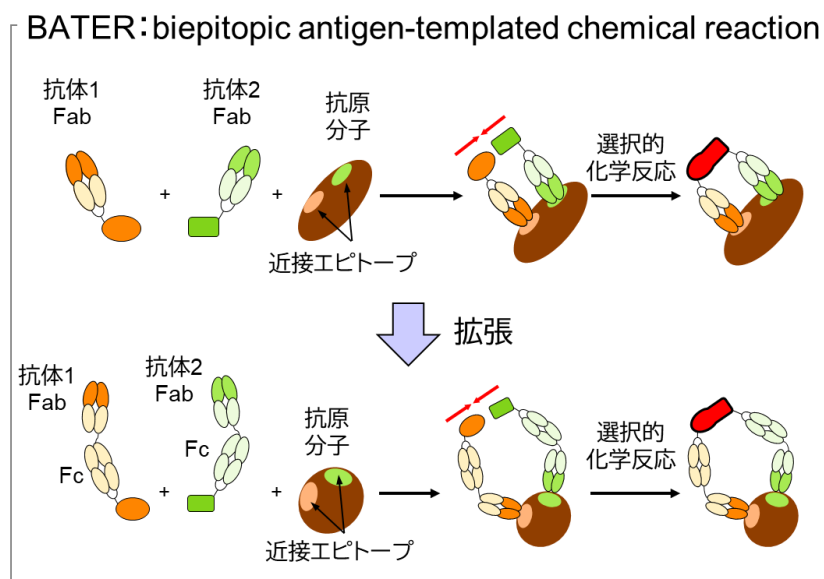
(¹京大院薬、²医薬健栄研)

Influence of the linker on biepitopic antigen-templated chemical reactions (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Univ.¹, NIBIOHN²) AKIBA, Hiroki^{1,2}; NISHIYAMA, Kentaro¹; KAMADA, Haruhiko^{1,2}; OHNO, Hiroaki^{1,2}

テンプレート反応は鋳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鋳型分子とする、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^[1]。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^[1]。

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.

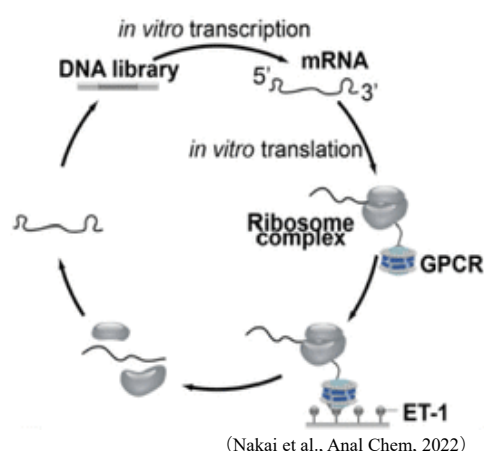


リボソームディスプレイ法によるエンドセリン受容体 B 型の熱安定性変異体の探索

○西垣 遥¹・村田 武士²・安田 賢司²・福永 圭佑³・松浦 友亮³ (¹ 東工大 大学院、生命理工、² 千葉大院、理学部、³ 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 Technology¹, Graduate School of Science, Chiba University², Earth Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology³) NISHIGAKI, Haruka¹; MURATA, Takeshi²; YASUDA, Kenji²; FUKUNAGA, Keisuke³; MATSUURA, Tomoaki³

【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 ヲ所が 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 β の凝集性変化

樋口凜¹・中根啓太¹・菊池智子¹・安田早緒理¹・池之上達哉²・佐藤伸一^{1,3}・○
友重秀介¹・石川稔¹ (¹東北大院生命、²東大院理、³東北大学際研)

Pseudo-glycosylation of Amyloid β by Laccase-catalyzed Tyrosine Click Reaction Alters Its Aggregation Property (Grad. Sch. Life Sci., Tohoku Univ.¹, Grad. Sch. Sci, Univ. Tokyo², FRIS, Tohoku Univ.³) HIGUCHI, Rin¹; NAKANE, Keita¹; KIKUCHI, Tomoko¹; YASUDA, Saori¹; IKENOUE, Tatsuya²; SATO, Shinichi^{1,3}; TOMOSHIGE, Shusuke¹; ISHIKAWA, Minoru¹

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 β ($A\beta$) やタウが該当し、これら凝集性タンパク質は β 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¹。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)²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。

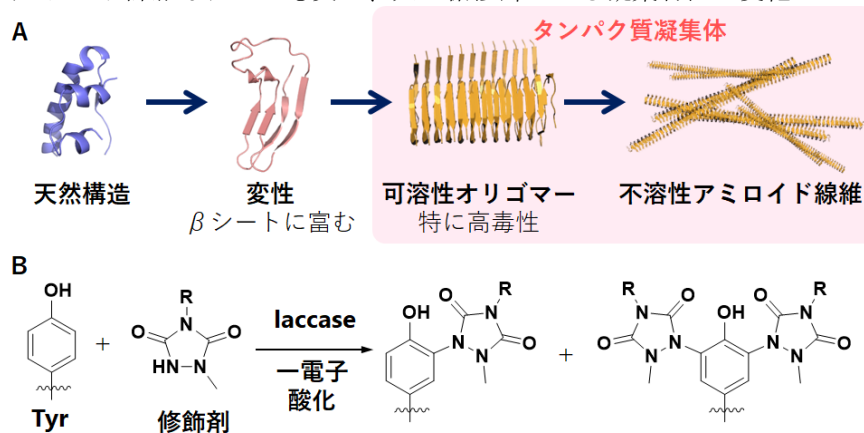


図. A) タンパク質の凝集過程. B) laccase を用いた糖修飾. R に種々の糖構造を導入した.

[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¹・荒井 堅太^{1,2}（東海大理化¹，東海大先進生命研²）

Acceleration of oxidative protein folding by polystyrene-based resin-supported chalcogenide compounds

(¹Department of Chemistry, School of Science, Tokai Univ., ² Institute of Advanced Biosciences, Tokai Univ.)

NISHIZAWA Yuya¹; ARAI Kenta^{1,2}

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。

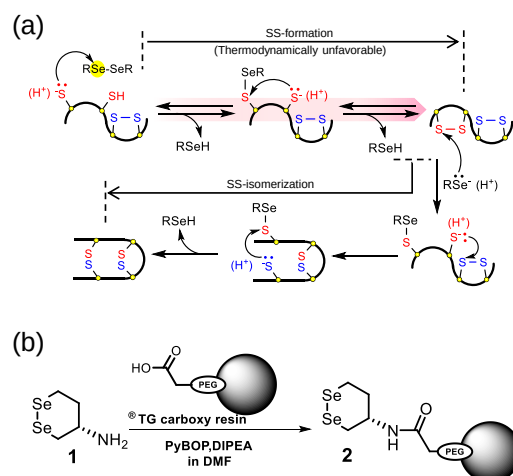


図 1: (a) PDI 様触媒メカニズムによって促進される蛋白質の坂のフォールディング (b) 樹脂担持型ジセレニド化合物 **2** の合成。

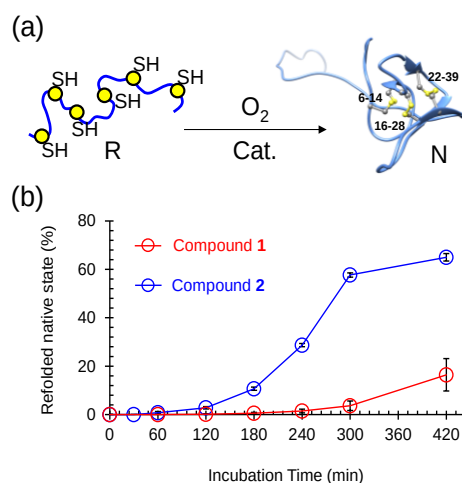


図 2: (a) ヒルジン還元体の段階的な酸化的フォールディング。(b) ヒルジン R 体の酸化的フォールディングにおける N 体の生成速度の比較。

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

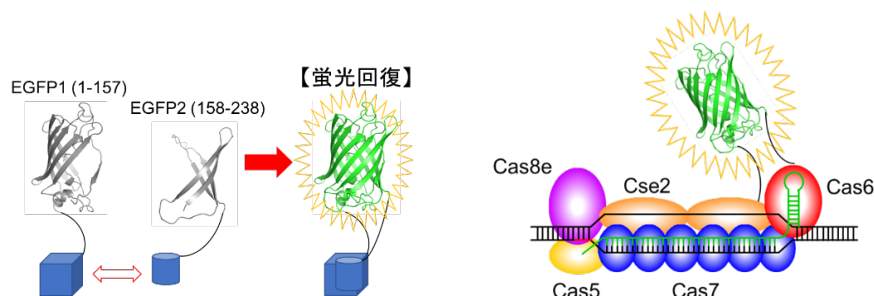
木野晴揮¹・楳村青央空¹・濁川清美^{1,2}・○野村渉^{1,2} (¹広島大院医系科学、²広島大薬)

Analysis of Assembly Mechanisms of Multi-subunit Type CRISPR-Cas System and its Applications
(Graduate School of Biomed. Health Sci., Hiroshima Univ.¹, School of Pharmaceutical Sci., Hiroshima Univ.²)
KINO, Haruki¹; Umemura, Aozora¹; Nigorikawa, Kiyomi^{1,2}; NOMURA, Wataru^{1,2}

【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¹・湯沢 哲至¹・ヴァヴリッカ クリストファー¹ (¹ 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.¹)

SHIOURA Noriyuki¹; YUZAWA Satoshi¹; VAVRICKA Christopher John¹

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¹, 西岡 葉李², 田井 章博², 二木史朗¹, ○今西未来¹ (¹京大化研、²徳大院創生化学、³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.¹, Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Tokushima Univ.² Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima Univ.³) TANAKA, Kamui¹; NISHIOKA, Shiori²; TAI, Akihiro³; FUTAKI, Shiroh¹; IMANISHI, Miki¹

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 N⁶-メチルアデノシン (m⁶A) 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 N⁶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、m⁶A 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 m⁶A 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。

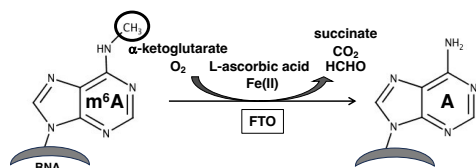


図 1. FTO による m⁶A 脱メチル化

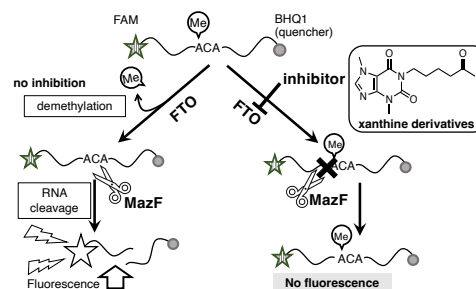


図 2. FTO 阻害剤スクリーニング系

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¹・Mehdi Davari²・小野田 晃¹ (¹北大院地球環境科学、²ライプニッツ植物科学研究所)

Engineering of the active site of chitosanase hydrolyzing hetero β -1,4-glycosidic linkage between GlcN and GlcNAc (¹Faculty of Env. Earth Science, Hokkaido University, ²Leibniz Institute of Plant Biochemistry)
KOJIMA Mariko¹; DAVARI Mehdi²; ONODA Akira¹

【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 β -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。

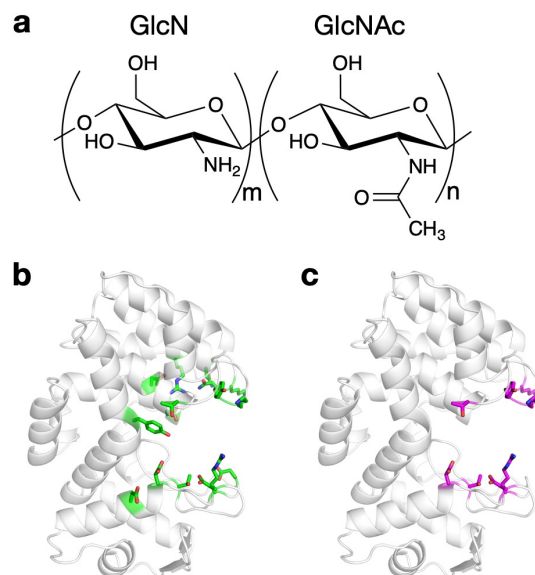


図 1. (a) キトサンの化学構造. (b) MD シミュレーションによって検出されたキトサナーゼ内の基質結合に関与する残基 (PDB ID: 1QGI). (c) *In silico* スクリーニングにより選定された 8 箇所の変異箇所.

[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¹・中田栄司²・森井孝^{2,3}・桑原淳¹ (¹同志社女大薬、²京大エネ研、³京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.¹, Inst. Adv. Energy, Kyoto Univ.², Dept. health and Nutr., Kyoto Koka Women's Univ.) TAJIMA, Shunsuke¹; NAKATA, Eiji²; MORII, Takashi^{2,3}; KUWAHARA, Jun¹

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^{1,2}、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³ (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^{4,5}。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。

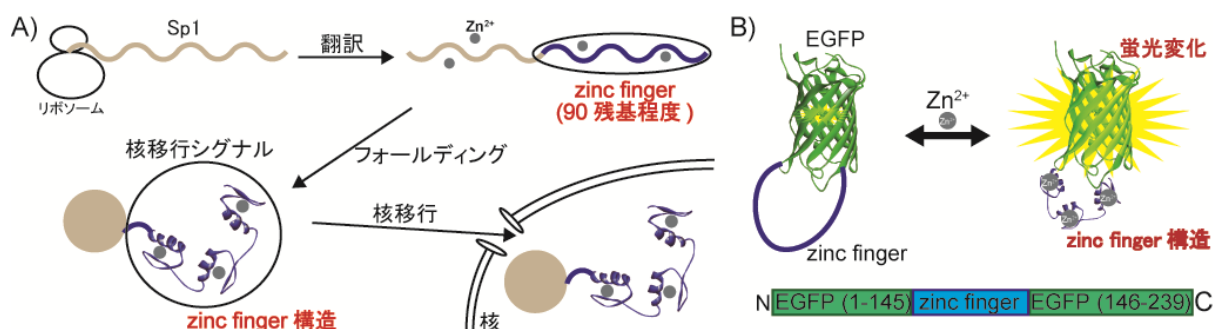


図 1 (A) Sp1 の予想される核移行経路。(B) Zinc finger バイオセンサーの模式図

- 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¹・武田康太²・五十嵐圭日子³・中村暢文¹(¹東京農工大院工、²産総研化学プロセス、³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.¹, Chem. Proc. Technol. Res. Inst., AIST², Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. of Tokyo.³) ICHIKAWA, Akiha¹; TAKEDA, Kota²; IGARASHI, Kiyohiko³; NAKAMURA, Nobuhumi¹

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 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 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¹。近年、 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、アフィニティーク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、 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 U mg^{-1} であった。一方で、PQQ のみ添加した場合や、PQQ と La^{3+} どちらも添

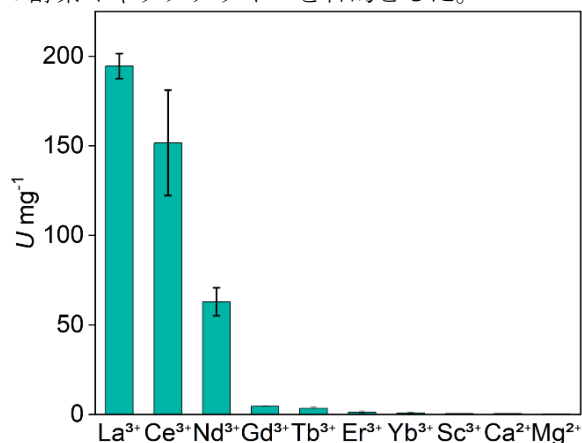


Fig. 1 Specific activity of D-glucose oxidation upon addition of various metal ions.

加しないアが酵素のみの場合、活性は示されず、 Ca^{2+} もしくは 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)。 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、 Ce^{3+} や Nd^{3+} の添加でも活性を示したものの、 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 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 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 U mg^{-1}) が、ブタノールに対しては高い活性を示した (240 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⁻応答性タンパク質ラベル化剤の開発と Conditional Proteomics への応用

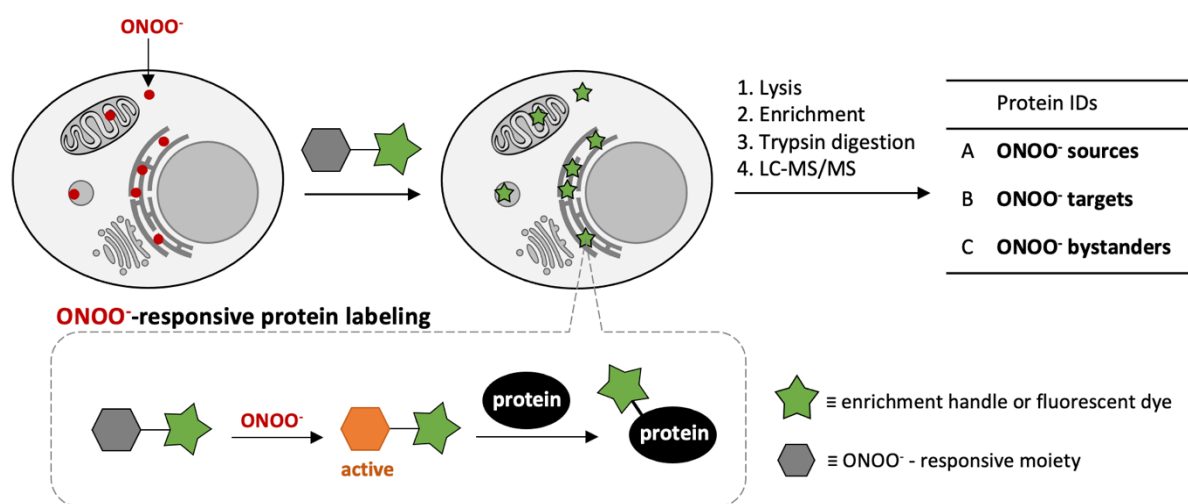
○宇野寛彬¹・朱浩¹・松葉恭一¹・浜地格^{1,2} (¹京大院工、²ERATO, JST)

Development of ONOO⁻-responsive protein labeling reagents for conditional proteomics (Graduate School of Engineering Kyoto Univ.¹, ERATO, JST²) Uno, Hiroaki¹; Hao Zhu¹; Matsuba, Kyoichi¹; Hamachi, Itaru^{1,2}

ONOO⁻ (peroxynitrite) は一酸化窒素 NO とスーパーオキシド O₂^{•-} の拡散律速の反応で生じる活性酸素/窒素種である。ONOO⁻ 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⁻ 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⁻ 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⁻ 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⁻ をイメージングできるが、ONOO⁻ 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⁻ の生体内での役割を明らかにするために、ONOO⁻ 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⁻ 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⁻ 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⁻ 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⁻ 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¹・高橋 泰人¹、齊藤 知恵子²、吉川 雅英²、水上 進¹(¹東北大多元研、²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.¹, Graduate School of Medicine, Tokyo Univ.²)
TAKASHIMA, Ippei¹; TAKAHASHI, Hiroto¹; SAITO, Chieko²; KIKKAWA, Masahide²; MIZUKAMI, Shin¹

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^[1]、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¹・赤川絵里¹・澤田真希¹・武田康太²・藤井敏司³・養王田正文¹・中村暢文¹ (¹農工大院工、²産総研、³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.¹, National Inst. of Advanced Industrial Sci. and Technol. (AIST)², Depart. of Nanobiochem., FIRST (Faculty of Frontiers of Innovative Research in Sci. and Technol.), Konan University³) NAKAZAWA, Mahiro¹; AKAGAWA, Eri¹; SAWADA, Maki¹; TAKEDA, Kouta²; FUJII, Satoshi³; YOHDA, Masafumi¹; NAKAMURA, Nobuhumi¹

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。Co²⁺添加培養は、培養液に 250 μ M 5-アミノレブリン酸、500 μ M CoCl₂、250 μ M 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 Co²⁺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 Co²⁺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^[1]。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 Co²⁺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^{1,2}・後藤祐平^{2,3}・杉山博紀^{2,4}・築地真也⁵・青木一洋^{2,3}
 (¹産総研バイオメディカル、²自然科学研究機構 生命創成探究センター (ExCELLS)、³京大院生命、⁴東大院工、⁵名工大院工)

Optimization of synthetic ligand-induced protein translocation (SLIPT) system for fission yeast and chemogenetic control of endogenous signaling proteins. (¹Biomed. Res. Inst., AIST; ²Exploratory Res. Center Life Living Syst. (ExCELLS), NINS; ³Graduate School of Biostudies, Kyoto Univ.; ⁴Graduate School of Engineering, Univ. Tokyo; ⁵Graduate School of Engineering, Nagoya Inst. Technol.) NAKAMURA, Akinobu^{1,2}; GOTO, Yuhei^{2,3}; SUGIYAMA, Hironori^{2,4}; TSUKIJI, Shinya⁵; AOKI, Kazuhiro^{2,3}

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_{4Me} を新たに設計・合成した。この m^Dc TMP_{4Me} 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_{4Me} 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_{4Me} 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¹・平原令偉¹・莫竣凌¹・藤本健造¹（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）

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.¹)
FUJIOKA Akira¹; HIRAHARA Rei¹; MO, Junling¹; FUJIMOTO, Kenzo¹

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¹。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²。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¹・小山田知輝²・影近弘之² (¹医科歯科大RCC、²医科歯科大生材研)

Development of Dehydroevodiamine derivatives as G-quadruplex ligand (Research Core Center, Tokyo Med. Dent. Univ.¹, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Med. Dent. Univ.²) MA, Yue¹; OYAMADA, Tomoki²; KAGECHIKA, Hiroyuki²

【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 π - π 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¹⁾。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²⁾、*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 π 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** の骨格を択性の向上を目指す。

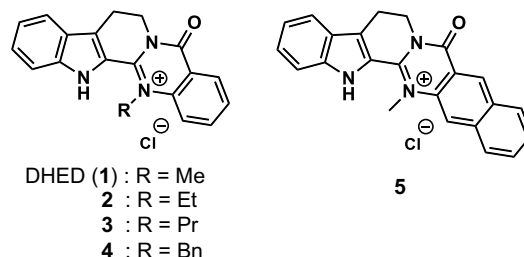


Figure 1 DHED (1) と誘導体2-5の構造

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 π 平面を拡張したことにより、母骨格と G-quartet 平面との π - π 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)^[1]とアキラルな基本骨格を有する SNA (serinol nucleic acid)^[2]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)^[3,4]。

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^[2]」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。

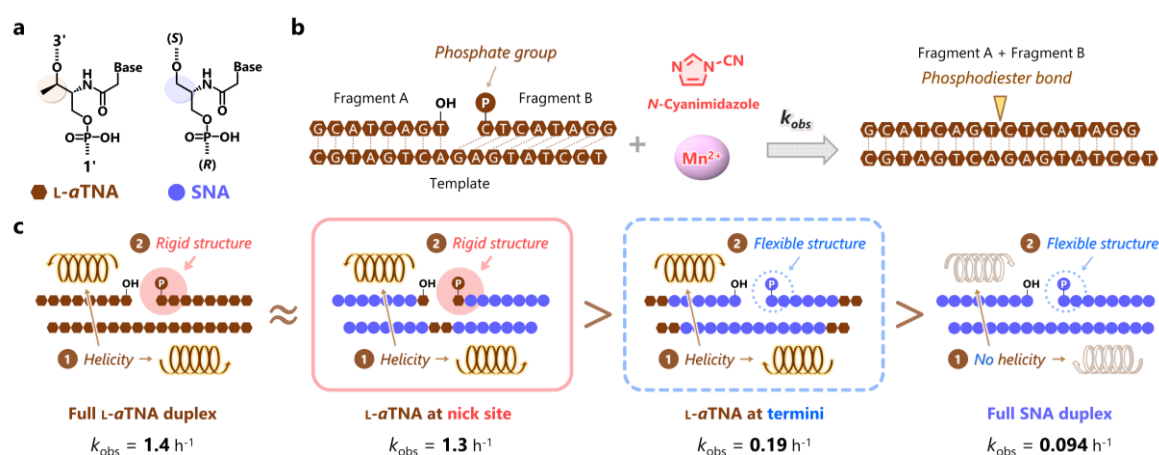


Fig. 1. (a) Chemical structures of chiral L-*a*TNA and achiral SNA. (b) Chemical ligation method and sequences. (c) Effect of chiral L-*a*TNA scaffold on chemical template-directed synthesis.

[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^[1]。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^[2]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)^[3]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 T₈ 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。

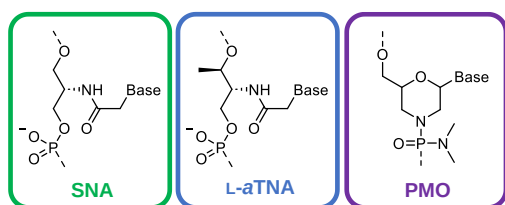


Fig. 1 Chemical structures of SNA, L-*a*TNA and PMO.

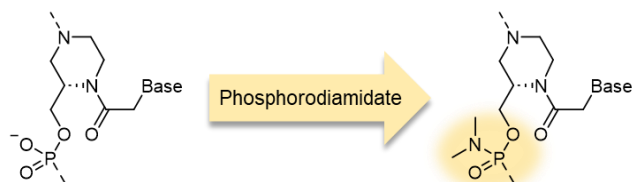


Fig. 2 Installation of phosphorodiamidate bonds into novel cyclic artificial nucleic acids.

[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.

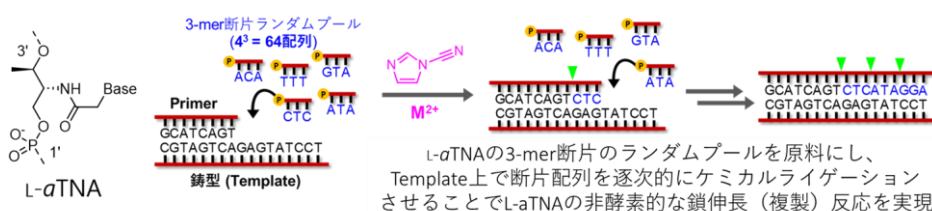
[3] J. Summerton, D. Weller, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **1997**, 7, 187.

Histidine- 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- 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)¹。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)²。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。



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³。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 : Cd^{2+} の滴定実験を行った。その結果、histidine : 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⁴。また、histidine : 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 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。

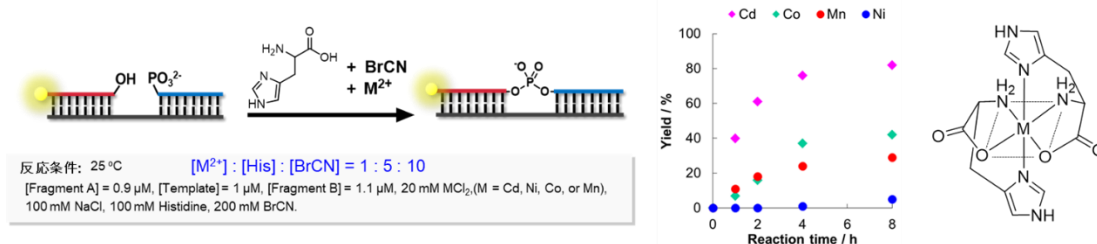


Fig. 2. histidine/BrCN による L-aTNA のケミカルライゲーションと His/ M^{2+} 錯体の構造

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¹・稲葉央¹・遠藤玉樹²・建石寿枝²・杉本直己²・松浦和則¹ (¹鳥取大院工、²甲南大 FIBER)

Creation of artificial viral capsid encapsulated quadruplex DNA (Graduate School of Engineering, Tottori University¹, The Frontier Institute for Biomolecular Engineering Research, Konan University²) ISHII, Motono¹; INABA, Hirioshi¹; ENDOH, Tamaki²; TATEISHI-KARIMATA, Hisae²; SUGIMOTO, Naoki²; MATSUURA, Kazunori¹

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¹。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 β -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²。本研究では、ジスルフィド結合を介して β -Annulus ペプチドの N 末端に G4 を連結した G4 DNA-SS- β -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- β -Annulus peptide (CINHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS)を合成した。5' Amino-G4 DNA (5'-NH₂-(CH₂)₆-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- β -Annulus peptide と PySS-G4 DNA をジスルフィド交換反応により G4 DNA-SS- β -annulus peptide を合成した。10 mM リン酸カリウム buffer(pH7.5)中で、G4 DNA-SS- β -annulus と未修飾の β -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).

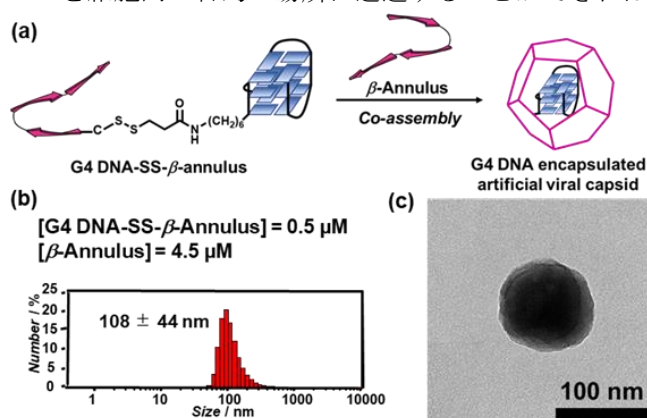


Fig. 1 (a) Construction of G4 DNA-encapsulated artificial viral capsid. DLS size distribution (b) and TEM image (c) of G4 DNA-encapsulated artificial viral capsids at 5 μ M.

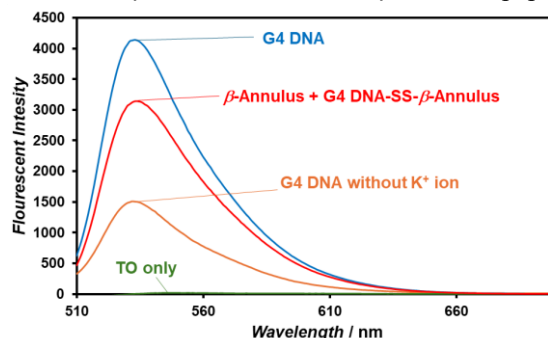


Fig. 2 Fluorescence spectrum of thiazole orange in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5).

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¹・西原 達哉¹・田邊 一仁¹・(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 Univ¹) TAMURA, Kouki¹; NISHIHARA, Tatsuya¹; TANABE, Kazuhito¹

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。¹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。

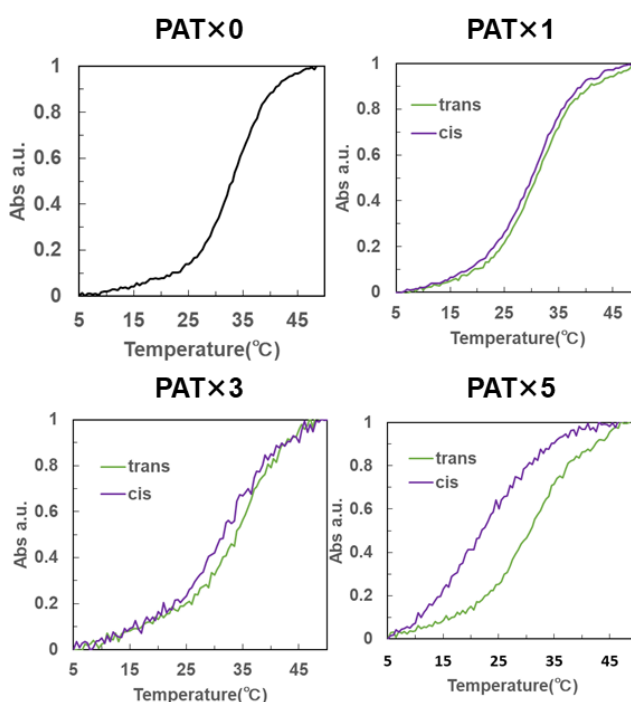


Figure 1. Melting Temperature of P-ODN

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¹・金森功史¹・河添好孝²・杜瑤瑤¹・吉田七唯¹・湯浅英哉¹ (¹東工
大院生命理工、²九州大院理)

Photosensitizer-modified plasmid DNA for elucidation of repair mechanisms of oxidative DNA damage.

(School of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology¹, Faculty of Science, Kyushu University²)

OZAWA Masashi¹; KANAMORI Takashi¹; KAWASOE Yoshitaka²; DU Yaoyao¹; YOSHIDA Nanai¹, YUASA Hideya¹

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。¹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。²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.

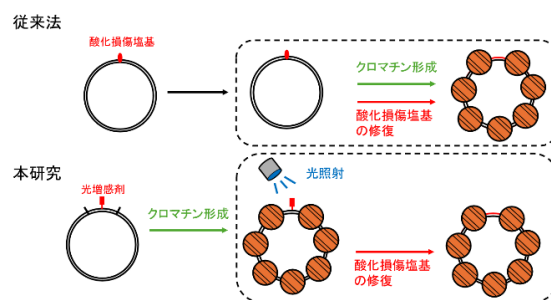


図 1 既存法と本研究の酸化損傷修復解析法

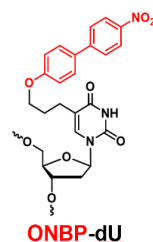


図 2 ONBP 修飾 DNA モノマー

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 HAILILI¹・藤本 健造¹ (¹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 ¹)

HAILILI, ZUMILA¹; KENZO, Fujimoto¹

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 (^{CNV}K). ^{CNV}K can form covalent bond with pyrimidine bases within one second under 366 nm ultraviolet irradiation. It is confirmed that ^{CNV}K-incorporated probes can achieve double-duplex invasion. And we used 5-cyanouridine (^CU) to replace the cross-linking site pyrimidine, suppressing the inter-probe cross-linking of the ^{CNV}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 ^{CNV}K as the photo-cross-linker and ^CU 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.

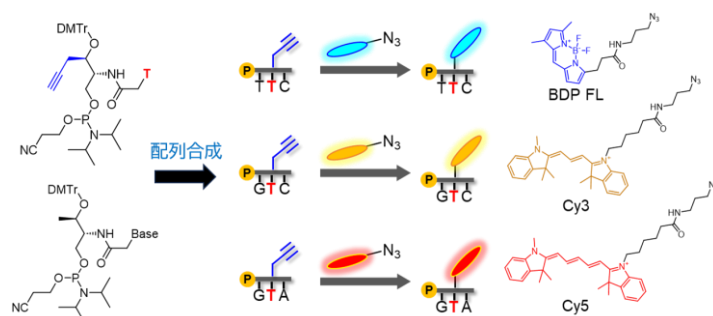
非酵素的な鎖伸長反応を基にした人工核酸の疑似翻訳反応の開発

○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^{1,2}。

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/Mn²⁺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。

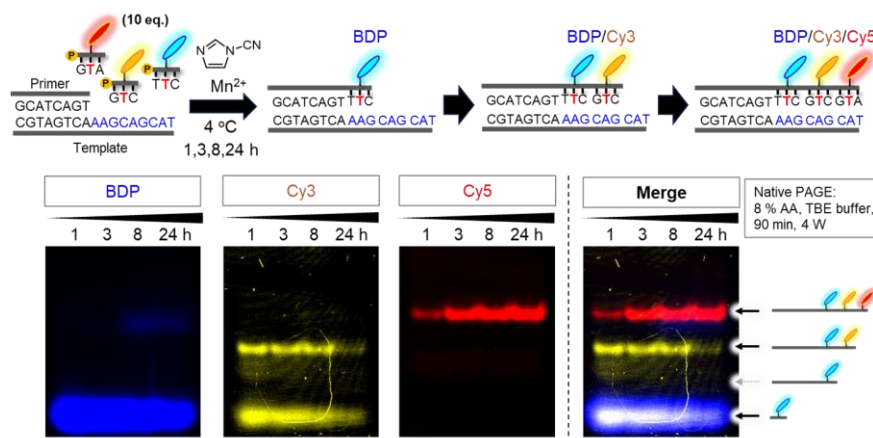


図 2. 疑似翻訳反応のスキーム(上図)及び PAGE 解析結果(下図)

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¹・田口真彦²・林重彦¹ (¹京大院理、²東北大多元研)Theoretical study on an enzymatic reaction of the hammerhead ribozyme (Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.¹, IMRAM, Tohoku Univ.²) MATSUYAMA, Ayaka¹; TAGUCHI, Masahiko²; HAYASHI, Shigehiko¹

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^[1]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^[2] 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

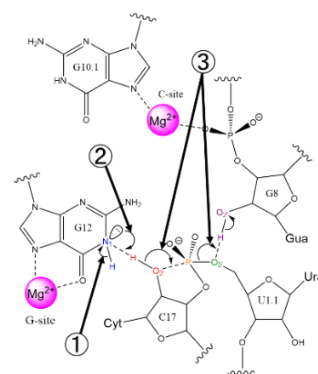


図2：現在推測されている切断反応機構

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¹・永谷恵梨佳¹・星野秀和²・笠原勇矢^{2,3}・小比賀聡^{3,4}・榎原正靖¹
(¹ 日大院総合基、² 医薬健康研、³ 阪大院薬、⁴ 阪大先端)

Effects of linker arm structures on the efficiency of DNA polymerase reaction (Graduate School of Integrated Basic Sciences, Nihon University¹, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition², Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University³, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives, Osaka University⁴) KATAOKA, Yuka¹; NAGATANI, Erika¹; HOSHINO, Hidekazu²; KASAHARA, Yuuya^{2,3}; OBIKA Satoshi^{3,4}; KUWAHARA, Masayasu¹

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¹。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²。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^{3,4}。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⁵、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^{amb}TP, dU^{urb}TP, dU^{tub}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⁶を用いて検証した。

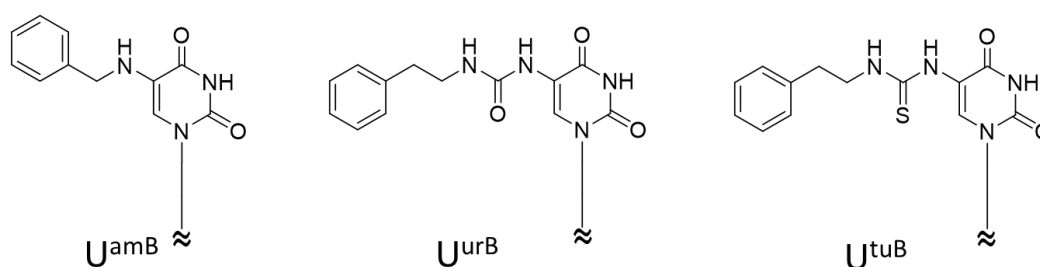


Figure 1. 合成した塩基修飾ヌクレオシド三リン酸 (dU^{amb}TP, dU^{urb}TP, dU^{tub}TP) の化学構造

- 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¹・三瓶悠¹・松崎有修¹・駒野淳²・柴田淳史³・山本剛史¹・堂野主税⁴・和田健彦⁵・山吉麻子^{1,6} (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)

Development of Photo-Reactive Peptide Nucleic Acids for Novel Photo Genome Editing Tools (¹Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, ² Faculty of Pharmacy, Osaka Medical and Pharmaceutical University, ³ Faculty of Pharmacy, Keio University, ⁴ SANKEN, Osaka University, ⁵ IMRAM, Tohoku University, ⁶ Department of Life Science and Technology, Tokyo Institute of Technology) Juki Nakao¹, Yu Mikame¹, Yusuke Matsuzaki¹, Jun A. Komano², Atsushi Shibata³, Tsuyoshi Yamamoto¹, Chikara Dohno⁴, Takehiko Wada⁵, and Asako Yamayoshi^{1,6}

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^[1]。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^[2]。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^[3]。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^{1,2}・奥田修二郎³・凌一葦³・建石寿枝^{1,2}・杉本直己²(¹甲南大学 FIRST、²甲南大学 FIBER、³新潟大学医学部)

Screening of G-quadruplex forming sequences under molecular crowding environment (FIRST, Konan University¹, FIBER, Konan University², School of Medicine, Niigata University³) ENDO, Tamaki^{1,2}; OKUDA, Shujiro³; LING, Yiwei³; TATEISHI, Hisae^{1,2}; SUGIMOTO, Naoki²

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¹。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²。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、バイオインフォ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、バイオインフォ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。

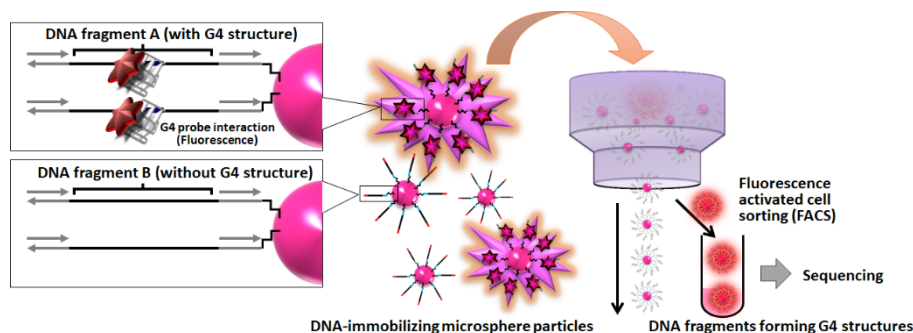


図 1 ゲノム DNA 断片を固定化した微粒子群および蛍光プローブ分子を利用した G4 構造形成領域のスクリーニング原理

【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¹・前原大悟¹・西原達哉¹・田邊一仁¹・(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 University¹) KANAYAMA, Airi¹; MAEHARA, Daigo¹; NISHIHARA, Tatsuya¹; TANABE, Kazuhito¹

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¹。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。

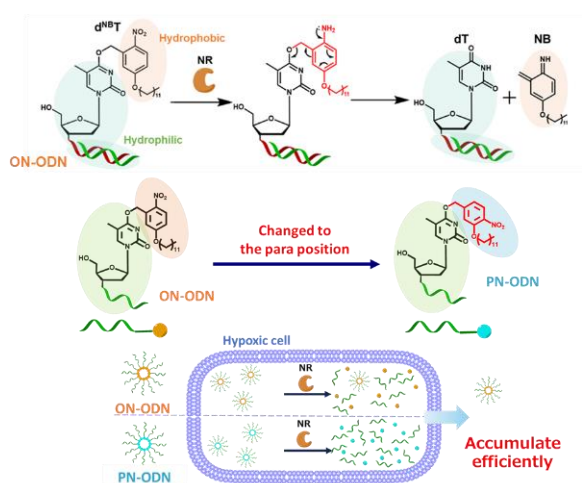


Figure1. Molecular design and mechanisms

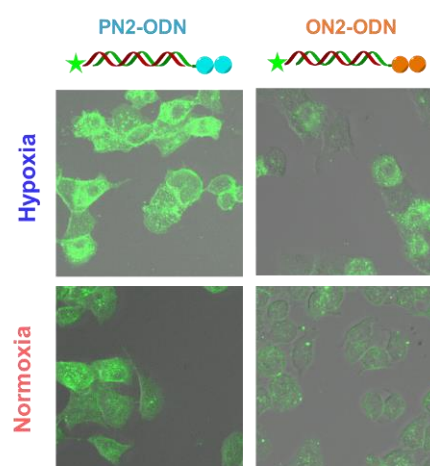


Figure2. Cellular uptake of PN-ODN and ON-ODN

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

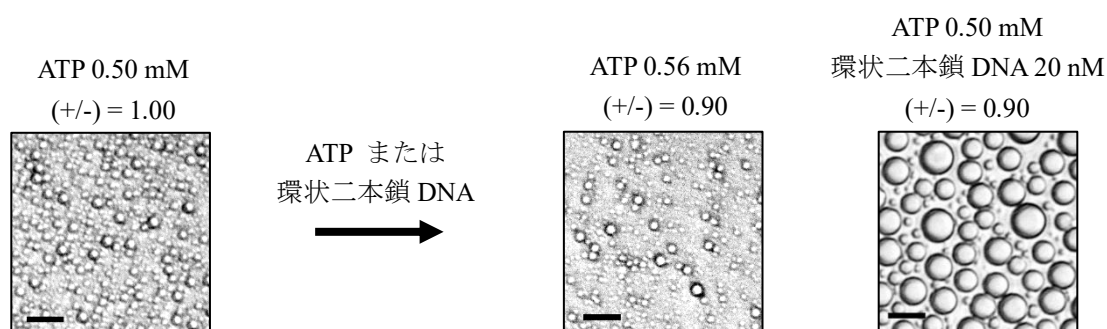
○千田隆誠¹・田立ののか²・文屋諒太郎²・田代竜³・大吉崇文^{1,2,4,5} (¹ 静大院理、² 静大理工、³ 鈴鹿医療科学大薬、⁴ 静大院創造・⁵ 静大グリーン研)

Effect of DNA topology on liquid-liquid phase separation (Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka Univ.¹, Faculty of Science, Shizuoka Univ.², Faculty of Pharmaceutical Sciences Suzuka Univ. of Medical Science³, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.⁴, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.⁵) SENDA Ryusei¹, TADACHI Nonoka², BUNYA Ryotaro², TASHIRO Ryu³, OYOSHI Takanori^{1,2,4,5}

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¹⁾。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²⁾。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³⁾。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 μ 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。

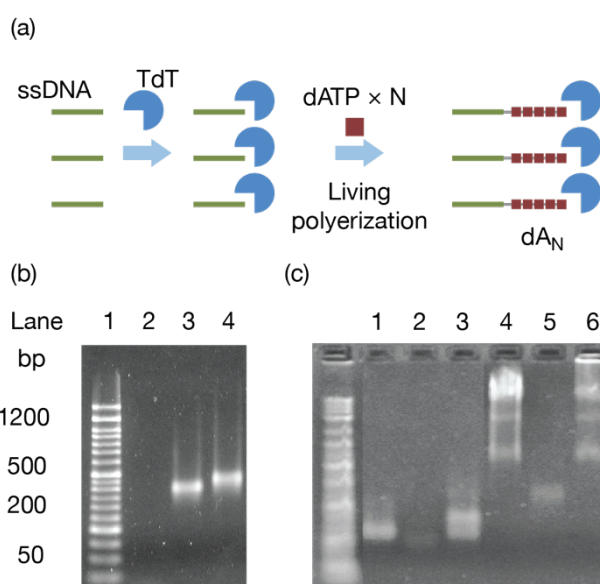


Figure 1. (a) Scheme of elongation reaction from single strand DNA using TdT. (b) Extension of ssDNA with dATP by TdT. Lane: 2-4 (dATP: 0, 500, 1000 eq). (c) ssDNA and branched DNA with polynucleotides (dAn and dTn). Lane: 1-3 (ssDNA: dAn, dTn, dAn/dTn); 4-6 (branched DNA: dAn, dTn, dAn/dTn).

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¹・安部俊輔²・松村茂祥^{1,2}・井川善也^{1,2}

(¹ 富山大院医薬理工学環、² 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 Toyama¹, Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, University of Toyama²) ABURAYA, Shino¹; ABE, Shunsuke²; MATSUMURA, Shigeyoshi^{1,2}; IKAWA, Yoshiya^{1,2}

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。

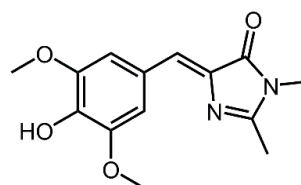


Fig.1 DMHBI の構造式

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)。

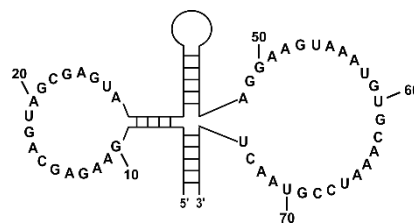


Fig.2 17-3 RNA 予測二次構造

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パ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。

- 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¹。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²。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 α -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/cm²）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^{tl}-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（IC₅₀）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^{tl}-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 ^{tl} -PCA	5' c a g t t a g g g t t a g PCA 3'
PCA-ODN ^{tl}	5' PCA c a g t t a g g g t t a g 3'
ORN ^{tl} -PCA	5' <u>CAGUUAGGGUUAG</u> PCA 3'
PCA-ORN ^{tl}	5' PCA <u>CAGUUAGGGUUAG</u> 3'

a, t, g, c: DNA; A, U, G, C: 2'-OMe RNA

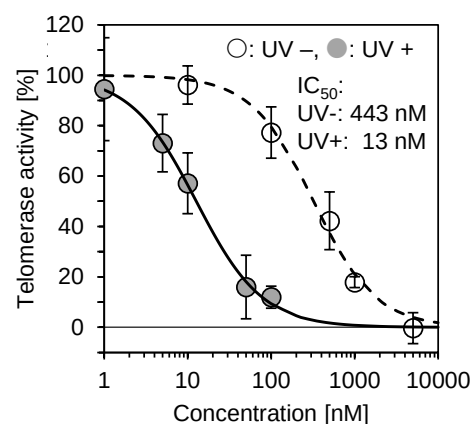
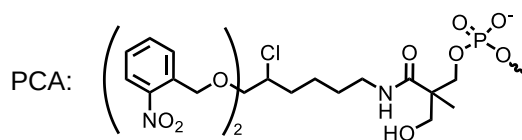


Figure 1. Dose-dependent inhibition of telomerase activity by ODN^{tl}-PCA.

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 Mashal¹・中田 栄^{1,2}・Lin Peng^{1,2}・森井 孝^{2,3}

(¹ 京都大学大学院エネルギー科学研究科、² 京都大学エネルギー理工学研究所、

³ 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

(¹Graduate School of Energy Science, Kyoto University, ²Institute of Advanced Energy, Kyoto University, ³Faculty of Health Science, Kyoto Koka Women's University, Japan) ASIF, Mashal¹; NAKATA, Eiji^{1,2}; LIN, Peng^{1,2}; MORII, Takashi^{2,3}

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 programmability¹⁾.

In this study, the DNA origami technique²⁾ 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_a values to allow detection over a wide pH range³⁾, were integrated onto a DNA scaffold along with a pH-insensitive fluorophore to facilitate ratiometric pH detection⁴⁾. In addition, substrates for cathepsin B and cathepsin D⁵⁾ 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.

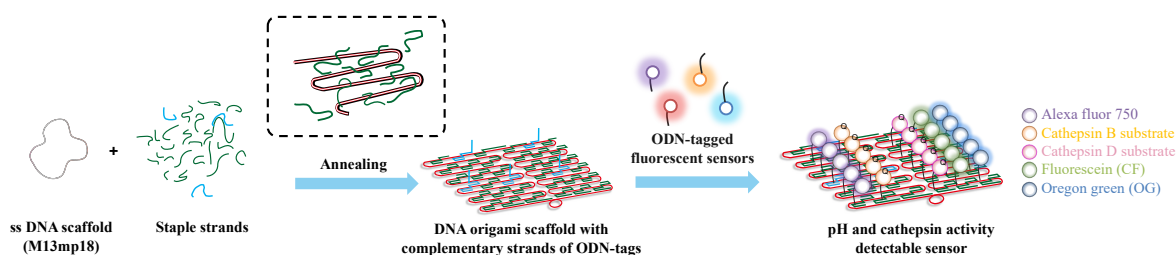


Fig. Synthesis scheme for wide-range pH and cathepsin activity sensor

- 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^{1,2}・PATHAK, Soumitra^{1,2}・百武篤也³・池袋一典⁴ (¹NIMS 高分子・バイオ材料研究センター、²北大院生命科学、³筑波大学、⁴東農工大院工)

Immunostimulatory activity of CpG oligodeoxynucleotides forming parallel-type guanine quadruplex structure. (Res. Ctr. Macromol. Biomat., NIMS,¹ Grad. Sch. Life Sci., Hokkaido Univ.,² Dept. Chem., Univ. Tsukuba,³ Grad. Sch. Technol., Tokyo Univ. Agric. Technol.) YAMAZAKI, Tomohiko¹; PATHAK, Soumitra²; MOMOTAKE Atsuya³; IKEBUKURO Kazunori⁴

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¹⁻⁴。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 ODN¹ 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】

¹Tu, A. et.al. Biomacromolecules v21, p.3644, 2020, ²Safitri, F. et.al. Biomolecules v11, p 11111617, 2021, ³Tu, A. et.al. ACS Chem Biol v17, p.1703 2022, ⁴Tu, A. et.al. Nanomedicine v40, p102508, 2022. ⁵Le, 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¹・勝田陽介^{1,2}・木田朋輝¹・佐藤慎一^{1,2}・北村裕介¹・井原敏博¹(¹熊本大学大学院先端科学研究部、²株式会社 StapleBio)

Regulation of target gene expression levels using next-generation nucleic acid medicine. (Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University¹, StapleBio Inc.²) MATSUMOTO, Ayu¹; KATSUDA, Yousuke^{1,2}; KIDA, Tomoki¹; SATO, Shin-ichi^{1,2}; KITAMURA, Yusuke¹; IHARA, Toshihiro¹

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関わり、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。

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、その結果についても報告する (Fig. 3)。

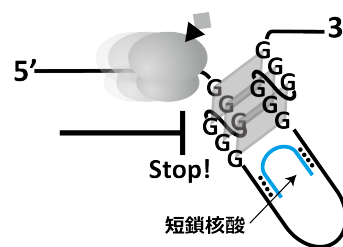


Fig.1 Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を標的 mRNA に導入することで RNA G-quadruplex (RGq) の形成を誘導する。RGq は Ribosome のアミノ酸伸長反応を阻害することから、タンパク質翻訳反応が抑制される。

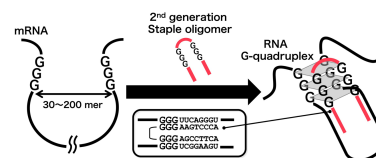


Fig. 2 第二世代型 Staple 核酸を用いた RNA hacking の概要図。

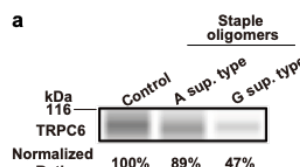


Fig. 3 第二世代 Staple 核酸投与マウスにおける TRPC6 発現抑制評価。

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¹・小野高広¹・上田卓見^{2,3}・竹内恒³・森本淳平¹・山東信介¹ (¹ 東大院工、² 阪大院薬、³ 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. Tokyo¹, Graduate School of Pharmaceutical, Osaka Univ.², Graduate School of Pharmaceutical, Univ. Tokyo³) SUGANO, Motoki¹; ONO, Takahiro¹; UEDA, Takumi^{2,3}; TAKEUCHI, Koh³; MORIMOTO, Jumpei¹; SANDO, Shinsuke¹

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¹。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^{2,3}。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⁴、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⁵。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

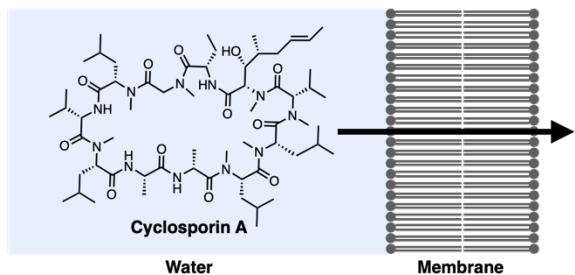


図 1 シクロスポリン A の構造式

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

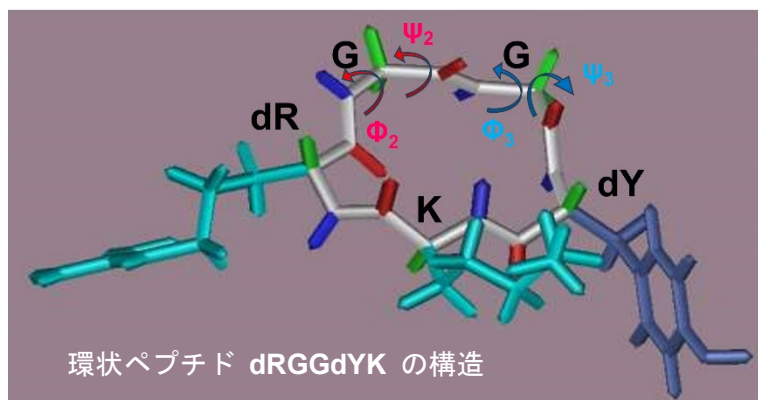
○山口朋也¹・藤本和久¹・長門石曉²・津本浩平²・阪本知樹³・山置佑大³・永田崇³・片平正人³・柴田奈津希⁴・大吉崇文^{4, 5, 6} (¹九産大生命、²東大院工・³京大エネ理工・⁴静大院理・⁵静大院創造・⁶静大グリーン研)

Cyclic peptides based on RGG sequences and their structures and bindings to G4 DNA/RNA (Faculty of Life Science, Kyushu Sangyo University¹, School of Engineering, The University of Tokyo², Institute of Advanced Energy, Kyoto University³, Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University⁴, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University⁵, Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University⁶) YAMAGUCHI, Tomoya¹; FUJIMOTO, Kazuhisa¹; NAGATOISHI, Akira²; TSUMOTO, Kouhei²; SAKAMOTO, Tomoki³; YAMAOKI, Yudai³; NAGATA, Takashi³; KATAHIRA, Masato³; Natsuki Shibata⁴; OYOSHI, Takanori^{4, 5, 6}

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 β 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 β 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 β ターン構造に類似していたことから、dRGGdYK は Type-II の β 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 μ 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。

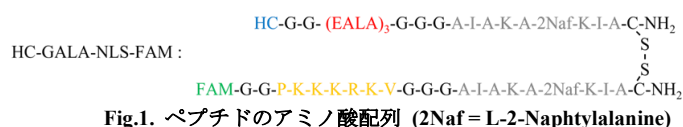


FRET プローブで標識したペプチドヘテロダイマーの細胞内挙動の解析

○田中かれん¹・山崎正幸²・富崎欣也¹（龍谷大先端理工¹・龍谷大農²）

Analysis of intracellular behavior of peptide heterodimers labeled with FRET probes (¹Faculty of Advanced Science and Technology, Ryukoku University, ²Faculty of Agriculture, Ryukoku University) TANAKA, Karen¹; YMASAKI Masayuki²; TOMIZAKI, Kin-ya¹

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-NH₂)^[1] 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^[2] 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。

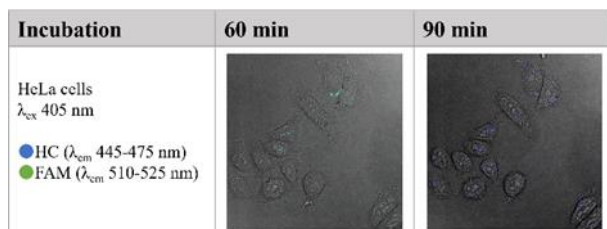


Fig.2. HeLa 細胞に HC-GALA-NLS を導入したときの CLSM 画像

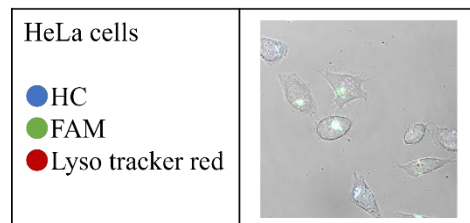


Fig.3. ペプチドとエンドソームとの局在評価

[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¹。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²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²。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。

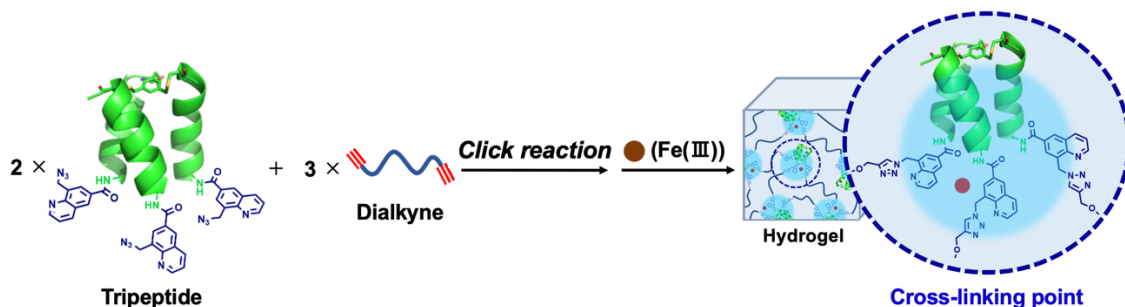


Figure 1. 鉄イオン結合部位を有する三量体ペプチドを架橋点とするハイドロゲルの調製

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, Taro¹; TSUKUBA, Hanako²

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)₄-Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg-(Gly-Pro-Hyp)₄-Gly-NH₂
 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 μ M の濃度で 4 $^{\circ}$ C、24 h 自己集合化を行い、銅イオンを加えて [CMP] = 100 μ M、[Cu²⁺] = 0、33 および 66 μ M 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 $^{\circ}$ C ではトリプルヘリックス構造を形成し、80 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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。

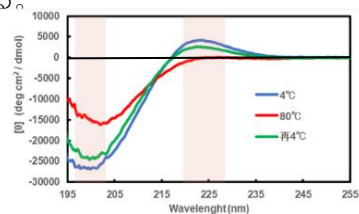


Fig 2. CMP-9 の二次構造

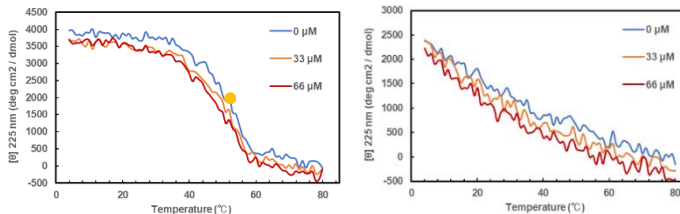


Fig 3. CMP-9 の熱変性温度

[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。

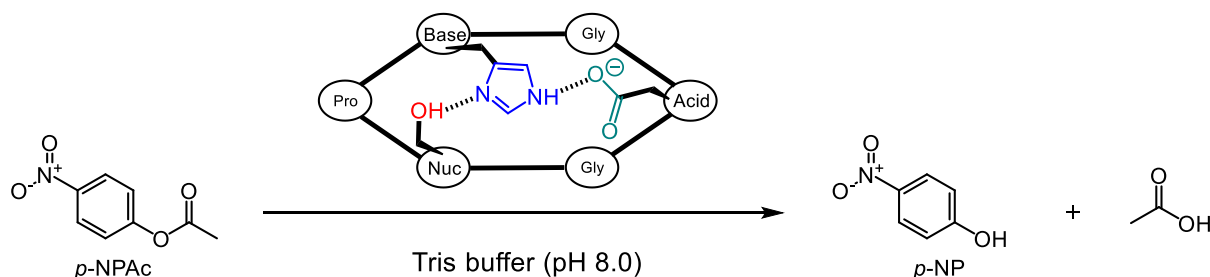


図1 人工加水分解酵素による *p*-NPAc の加水分解反応

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¹・稲葉央¹・角五彰²・松浦和則¹ (¹鳥取大院工、²京大院理)

Control of microtubule structures by azobenzene-incorporated cyclic Tau-derived peptides (Graduate School of Engineering, Tottori University¹, Graduate School of Science, Kyoto University²) TATEISHI, Mahoko¹; INABA, Hiroshi¹; KAKUGO, Akira²; MATSUURA, Kazunori¹

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¹⁾。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²⁾。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³⁾。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⁴⁾。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).

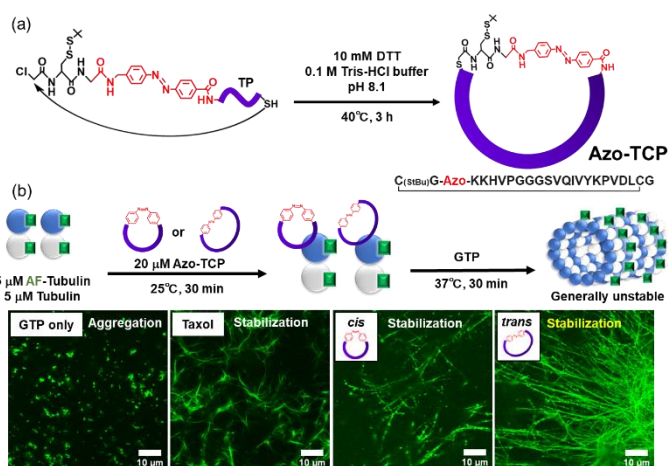


Fig. 1. (a) Synthesis of azobenzene-incorporated tau-derived cyclic peptide (Azo-TCP). (b) Construction of Azo-TCP-incorporated microtubules and the CLSM images.

Tau 由来ペプチド二量体による微小管安定化

○早川優衣¹・稲葉央¹・角五彰²・松浦和則¹ (¹鳥取大院工、²京大院理)

Stabilization of microtubule by Tau-derived peptide dimers (Graduate School of Engineering, Tottori University¹, Graduate School of Science, Kyoto University²) HAYAKAWA, Yui¹; INABA, Hiroshi¹; KAKUGO, Akira²; MATSUURA, Kazunori¹

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 α -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^[1]。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^[2]。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^[3]。そこで本研究では、異なる長さの α -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 α -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)。

α -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) _{n} 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 (α_n -TP)₂ ($n = 3, 4, 5$)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 α_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 (α_n -TP)₂ 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 (α_n -TP)₂ 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、(α_n -TP)₂ が α_n -TP よりも微小管への結合量が多く、また α -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、(α_n -TP)₂ 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、(α_n -TP)₂ が α_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、(α_n -TP)₂ が微小管形成を促進し、 α -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、 α -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. Inaba¹, Y. Sueki¹, M. Ichikawa¹, A. M. R. Kabir, T. Iwasaki, H. Shigematsu, A. Kakugo, K. Sada, T. Tsukazaki, K. Matsuura, *Sci. Adv.*, **8**, eabq3817 (2022) (¹Equal contribution).

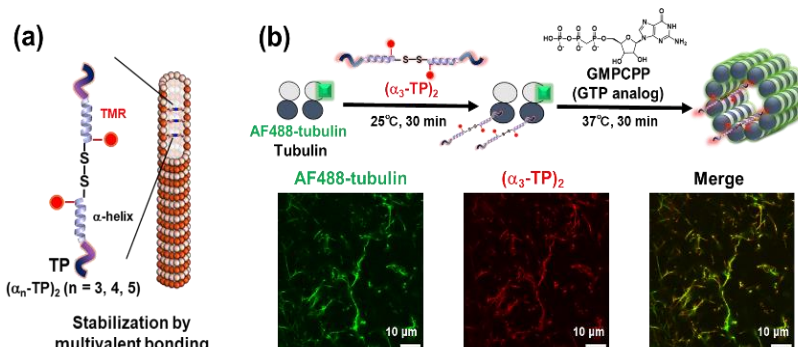


Fig. 1. (a) Design of (α_n -TP)₂ binding to the inside of microtubules. (b) Incorporation of (α_n -TP)₂ to microtubules and the CLSM images.

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)。

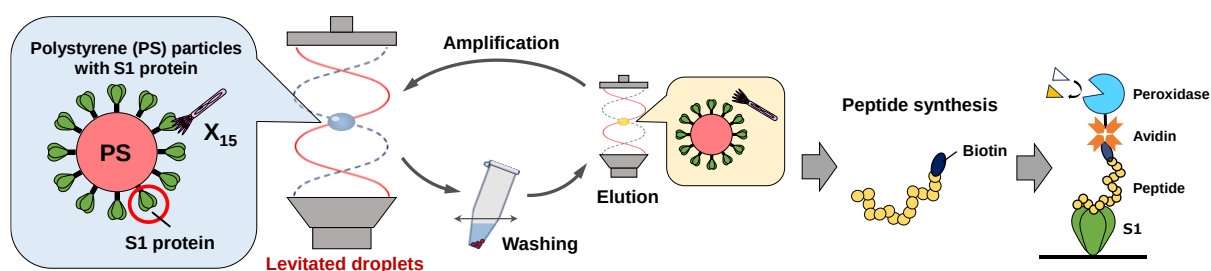


Fig. 1 本実験の概要。音響浮揚させた液滴を用いたセレクションの後、ペプチドを合成し、S1 結合活性を行う。

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¹・小澤英知¹・林剛介¹・村上裕^{1,2} (¹名大院工、²名大ナノライフ研)

Regulation of peptide structure and functions by removable peptide stapling (Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.¹, Inst. Nano-Life-Systems, Nagoya Univ.²) TOKI, Yusuke¹; OZAWA Eichi¹, HAYASHI Gosuke¹, MURAKAMI Hiroshi^{1,2}

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^{1,2,3}、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⁴、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 α -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¹・沼田圭司^{1,2,3} (¹理研バイオ高分子、²京大院工、³慶応大先端生命)

Chloroplast-Targeting Antioxidant Peptides for Shielding Plants from Photooxidative Stress
(Biomacromolecules Res. Team, RIKEN¹, Grad. Sch. Eng., Kyoto Univ.², Inst. Adv. Biosci., Keio Univ.³)
MIYAMOTO, Takaaki¹; NUMATA, Keiji^{1,2,3}

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-NH₂, X=Aib (α -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。

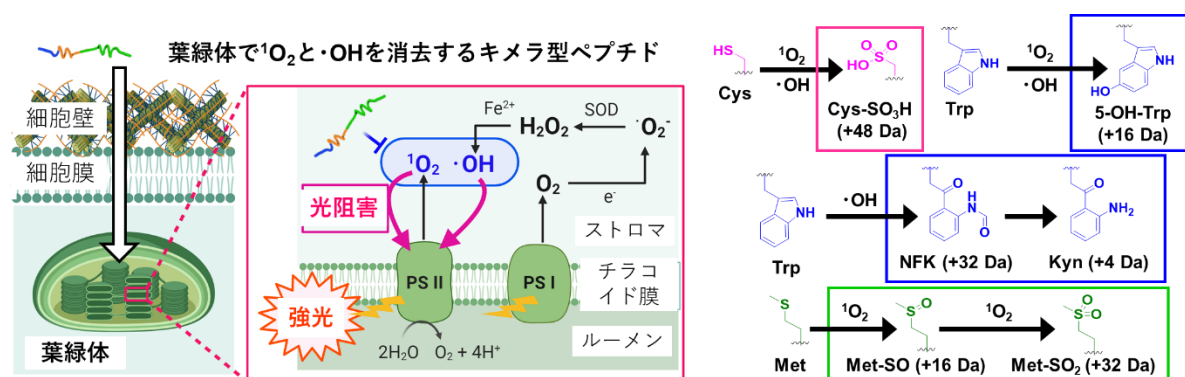


図 1 葉緑体で ROS を消去するキメラ型ペプチドを利用した植物の光防護と $\cdot\text{OH}$ と $^1\text{O}_2$ の消去に寄与するアミノ酸残基と側鎖の酸化。PSI: 光化学系 I。PSII: 光化学系 II。SOD: スーパーオキシドジスムターゼ。Cys-SO₃H: システイン酸。5-OH-Trp: 5-ヒドロキシトリプトファン。NFK: N-ホルミルキヌレニン。Kyn: キヌレニン。Met-SO: メチオニンスルホキシド。Met-SO₂: メチオニンスルホン。

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^{1,2}・角田達彦³・野本悌吾³・藤井七彩³・池本光志⁴・宮前友策¹

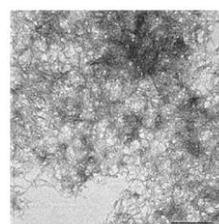
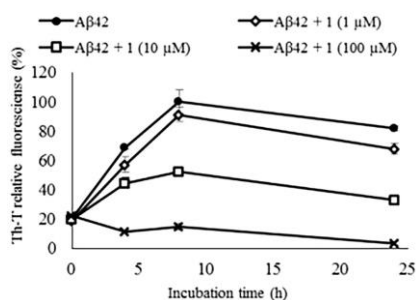
(¹筑波大生命環境系、²筑波大 MiCS、³筑波大院理工情報生命、⁴筑波大体育系)

Amyloid polypeptide aggregation-regulating activity and neuronal protection of the polyphenolic compound Clovamide (Inst. of Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba¹, MiCS, Univ. of Tsukuba², Grad. Sch. Sci. Technol., Univ. of Tsukuba³, Inst. of Health Sport Sci., Univ. of Tsukuba⁴) SHIGEMORI, Hideyuki^{1,2}, TSUNODA, Tatsuhiko³; NOMOTO, Daigo³; FUJII, Nanao³; IKEMOTO, Mitsushi J.⁴; MIYAMAE, Yusaku¹

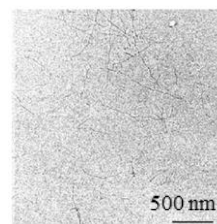
アルツハイマー型認知症 (AD) は世界的に最も多い神経変性疾患であり、最近、アミロイド β ($A\beta$) を除去する抗体医薬が認可された。しかしながら、AD 発症の 20 年以上前から $A\beta$ が蓄積されていることも報告されている。一方で、2 型糖尿病 (T2D) に関わるヒト膵島アミロイドポリペプチド (hIAPP) は、 $A\beta$ と cross-seeding することで AD 発症に関与することが知られている。したがって、これらのアミロイドポリペプチド凝集を阻害する化合物は AD および T2D の予防に有望であると考えられる。当研究室ではこれまでに、カテコ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^{1,2}。

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」¹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 (^{MEP}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、^{MEP}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²。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、^{MEP}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 ^{MEP}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高効率化

○藤原裕大¹・若林里衣¹・神谷典穂¹・後藤雅宏¹ (¹ 九大院工)

Modification of hydrogen bond unit of peptide supramolecules for highly efficient intracellular uptake

FUJIWARA, Yudai¹; WAKABAYASHI, Rie¹; KAMIYA, Noriho¹; GOTO, Masahiro¹

(Graduate School of Engineering, Kyushu University¹)

【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^{1,2)}。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。

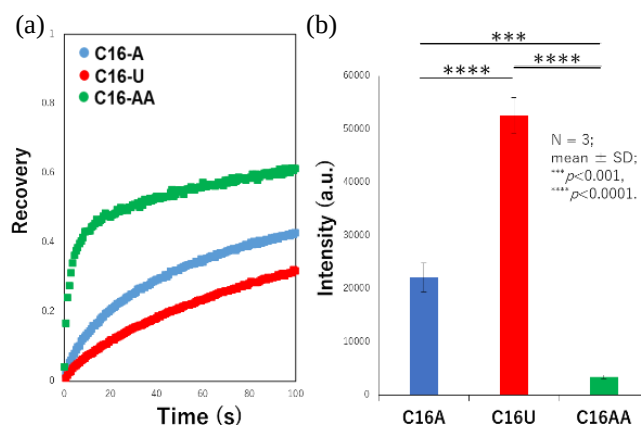


Fig. 2 a) FRAP によるダイナミクスの評価
b) 細胞内取り込みの定量評価

【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ると考えられている。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 Ca^{2+} イオンと 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、 Ca^{2+} イオンを添加し静置した後、 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。

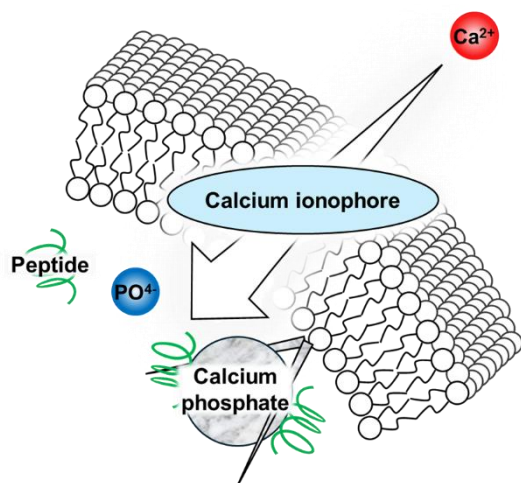


Fig. 1. Schematic representation of calcium phosphate formation within GUV.

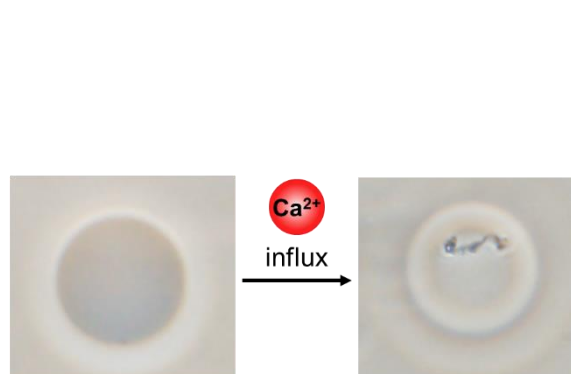


Fig. 2. Phase contrast microscopic images of GUV before and after the addition of Ca^{2+} ion and ionophore.

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¹。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²。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 ω 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³。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。

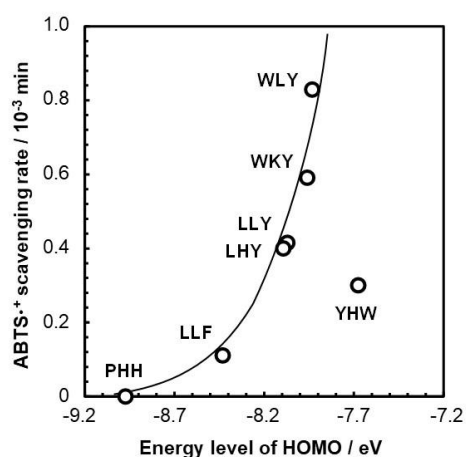


図1 トリペプチドの HOMO エネルギー準位と抗酸化活性との

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¹・佐藤史也¹・Hernandez Paniagua Liliana Alejandra¹・稲垣奈都子²・伊藤大知²・吉野大輔¹・寺正行¹(¹東農工大院工、²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.¹, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo²) HOSOKAWA, Kiyoka¹, SATO, Fumiya¹; Hernandez Paniagua Liliana Alejandra¹; INAGAKI, Natsuko²; ITO, Taichi²; YOSHINO, Daisuke¹; TERA, Masayuki¹

〔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^[1]。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^[2]、WS-CODY とアジド修飾ヒアルロン酸(HA-N₃)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、N₃-PEG-カルボン酸をアミド縮合したアジド修飾ゼラチン(gelatin-N₃)を合成し、WS-CODY と HA-N₃、生細胞に加えて gelatin-N₃ を加えた細胞封入ゲルの作製を行った(Figure 1)。

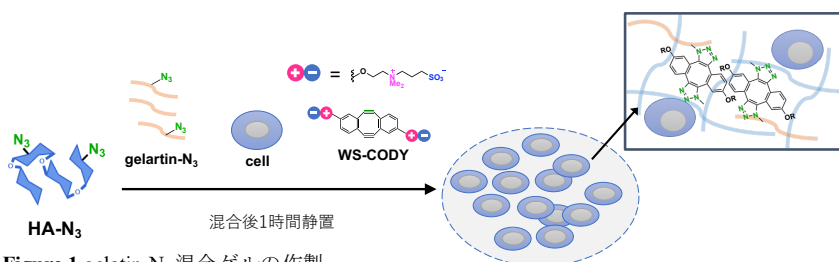


Figure 1 gelatin-N₃ 混合ゲルの作製

Figure 1 gelatin-N₃ 混合ゲルの作製。WS-CODY と HA-N₃、生細胞に加えて gelatin-N₃ を加えた細胞封入ゲルの作製を行った(Figure 1)。

〔結果〕まずゼラチンのリシン残基に対し、N₃-PEG-カルボン酸をアミド縮合させ、gelatin-N₃ 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^[3]。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-N₃(アジド修飾：28 %)、gelatin-N₃ 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-N₃ 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。

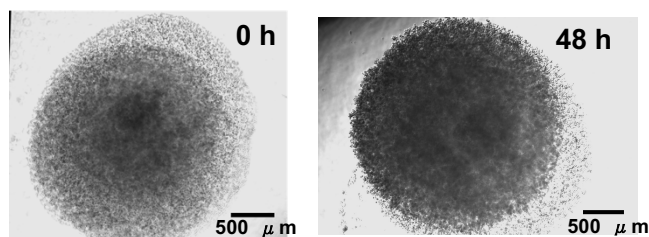


Figure 2 gelatin-N₃ 混合細胞封入ゲル

Figure 2 gelatin-N₃ 混合細胞封入ゲル。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-N₃(アジド修飾：28 %)、gelatin-N₃ 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-N₃ 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。

[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

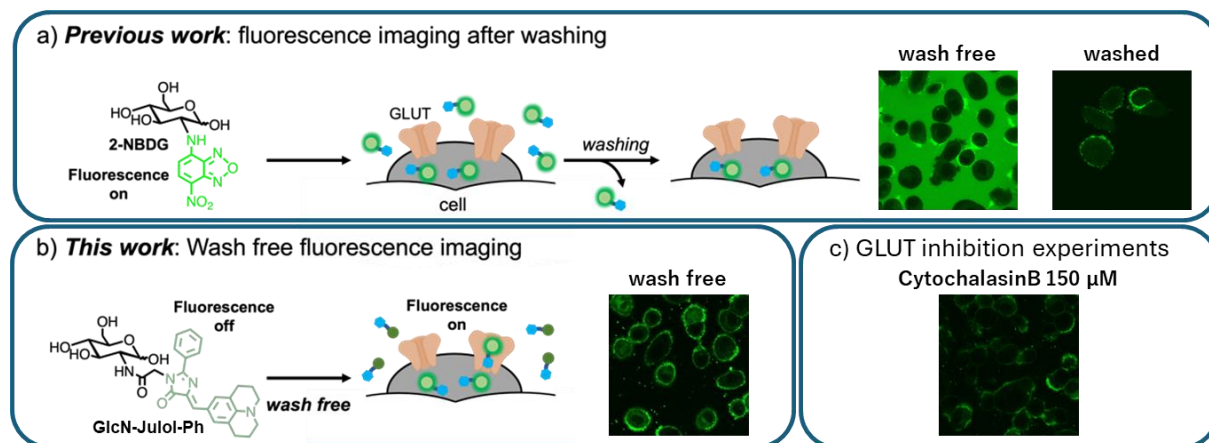
がんの診断法の一つとして、糖代謝の亢進に着目し GLUT を介した取り込みに基づくグルコース修飾蛍光プローブが多数開発されている。代表例としては、2-アミノグルコサミンに蛍光剤 NBD を導入した 2-NBDG が挙げられる。しかしこちらは、明瞭な蛍光イメージ像を得るには比較的高濃度(> 100 μM)の投与が必要である。また、常時蛍光性の蛍光色素を使用しているため、細胞レベルの実験では余剰分の蛍光プローブを洗浄する必要がある(図 a)、また *in vivo* では標的外に分布した蛍光剤の排出を待つ必要がある。

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¹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 μM 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 μM)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 μM)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¹・若林里衣¹・後藤雅宏^{1,2}・神谷典穂^{1,2} (¹九大院工、²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 University¹, Center for Future Chemistry, Kyushu University²) HIGUCHI, Ayato¹; WAKABAYASHI, Rie¹; GOTO, Masahiro^{1,2}; KAMIYA, Noriho^{1,2}

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^[1]。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_nQG (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^[2]、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-XL₂QG (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。

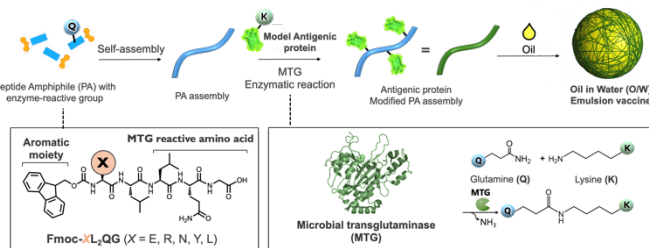


Fig. 1 Design of Oil in Water (O/W) emulsion vaccine.

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 を用い、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)

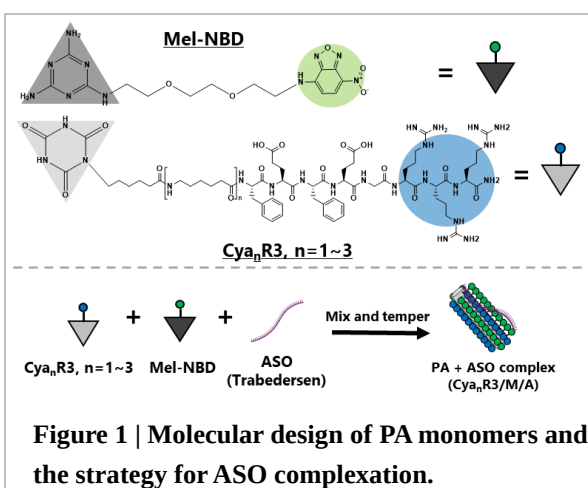
【謝辞】本研究は JSPS 科研費 JP22H01884, JP22KJ2482 の助成を受けたものです。

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 Ingram¹・若林里衣¹・神谷典穂^{1,2}・後藤雅宏^{1,2} (¹ 九大工学府, ² 未来化学創造センター)

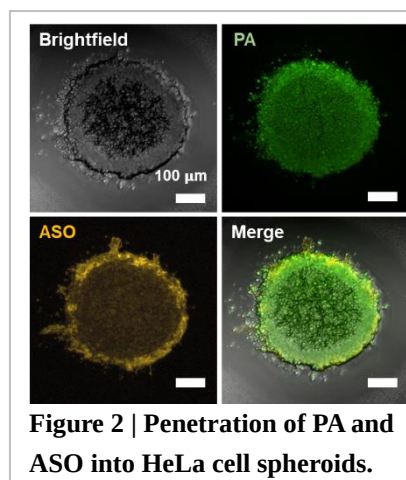
Deep Cancer Cell Spheroids Delivery of Antisense Oligonucleotide by Peptide Amphiphiles (Graduate School of Engineering, Kyushu University¹, Center for Future Chemistry, Kyushu University²) INGRAM, Tan¹; WAKABAYASHI, Rie¹; KAMIYA, Noriho^{1,2}; GOTO, Masahiro^{1,2}

[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)¹ 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_nR3) for electrostatic complexation with ASO. Cya_nR3 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_nR3. 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 Origami¹⁾ 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。

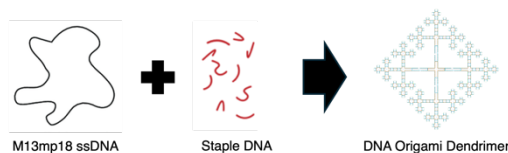


Fig. 1 Design of DNA Origami Dendrimer.

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。

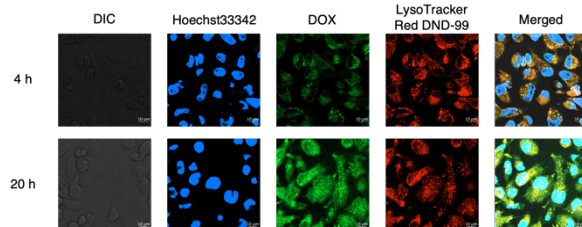


Fig. 2 CLSM images of HeLa cells with DOX-encapsulated DNA Origami dendrimer after 4- and 20-hour incubation.

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 (OD₆₀₀) 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 CO₂ 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。

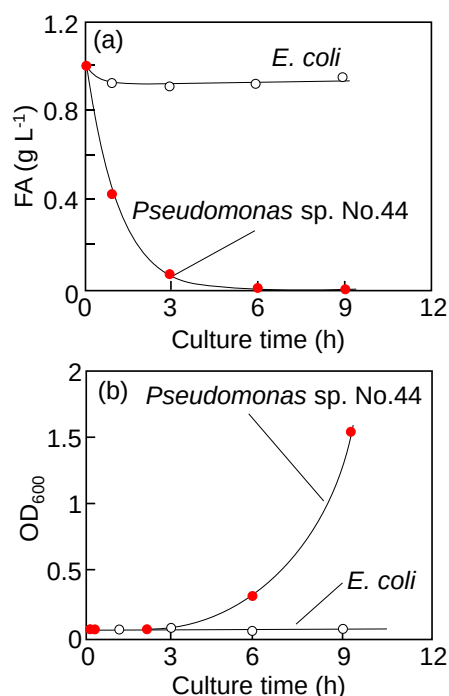


Figure Time dependence of (a) FA concentration and (b) cell density (OD₆₀₀) during the batch culture of *Pseudomonas* sp. No.44 and *E. coli* DH5α at 30 °C (LB medium containing 1 g/L FA).

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

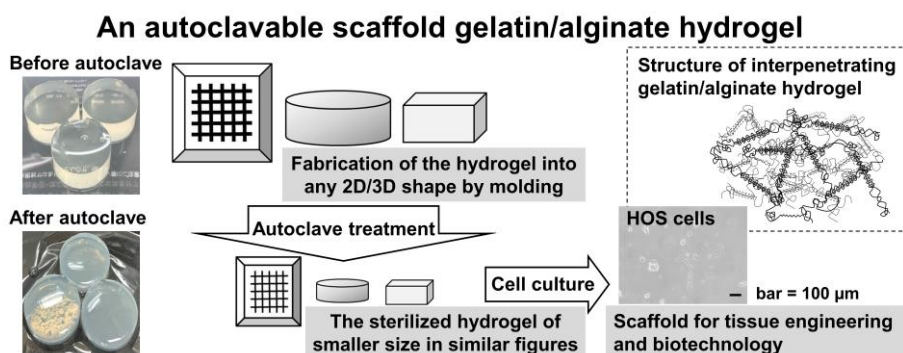
コラーゲン蛋白質の変性物であるゼラチンは高温で溶解し、低温で分子鎖間が物理的に架橋しゲル化する熱可塑性を持つ。一方、多糖類のアルギン酸は、カルシウムイオン (Ca^{2+}) の配位によって分子鎖間が架橋してゲル化する性質を持つ。架橋原理の異なる2つのゲル素材を組み合わせで作製した、ゼラチン/アルギン酸カルシウム混合ゲル (GAC 混合ゲル) は、鋳型成形により任意の形状に容易に加工でき、オートクレーブ滅菌も可能な細胞培養基材としての利用が期待される。本実験は、GAC 混合ゲルの物性、細胞接着性などのデータ収集を目的として、ゼラチンの濃度を変えた GAC 混合ゲルを作製し、膨潤試験、動的粘弾性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 CaCl_2 水溶液に浸漬して 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¹⁾。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 β -ガラクトシダーゼ（SA- β -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 β -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²⁾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 β -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 β -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。 β -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、 β -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）

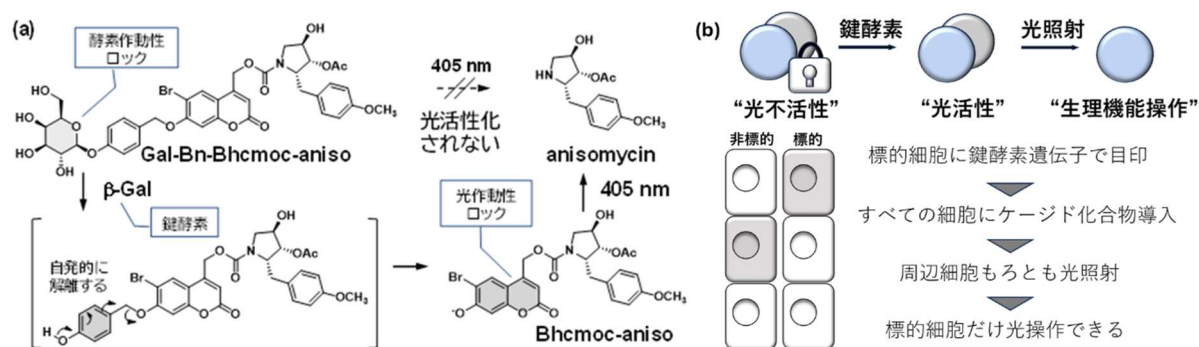


図 1 β -Gal 作動性遺伝子指向性ケージドアニソマイシンの設計と細胞への応用

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*.

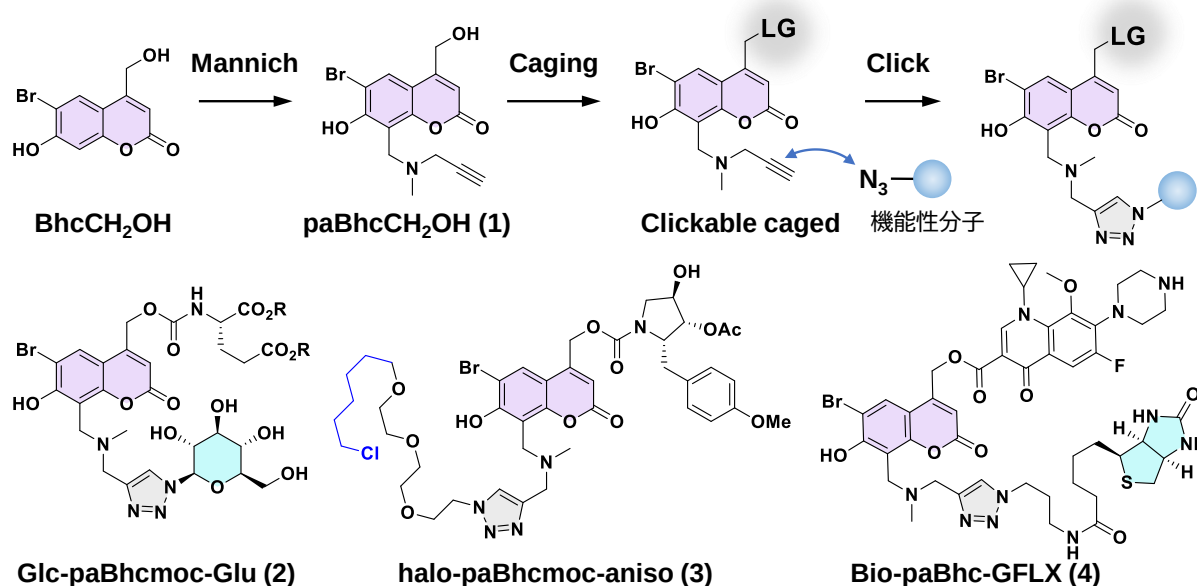
機能性部位を導入できる Clickable ケージド化合物の設計と合成

○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 paBhcCH₂OH (**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。

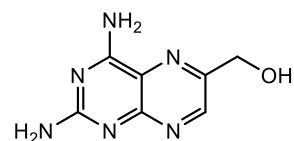


図 1 ジアミノプテリジン

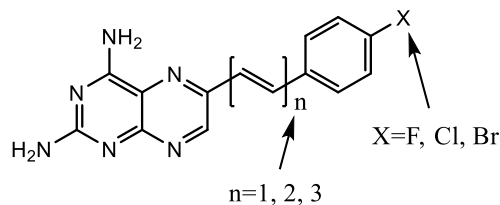


図 2 共役拡張プテリン型プロブの構造

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 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¹, 幡野明彦¹, 加藤敦² (芝浦工大¹, 富山大²)

Development of the polyrotaxane accumulated 1-deoxynojirimycin to control the activity of α -glucosidase such as membrane enzyme

Yuta Tenma¹, 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 α -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^{1,2}。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、 α -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、 α 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 α -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 β CD を複数分子貫通させる。PPG と β 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、 α -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 β CD を複数分子貫通させる。PPG と β 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、 α -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 β 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 β CD は 20 分子貫通していることが分かった。また、DNJ 結合 β CD をラット小腸由来 α グルコシダーゼに対する阻害実験を行ったところ、 β 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.

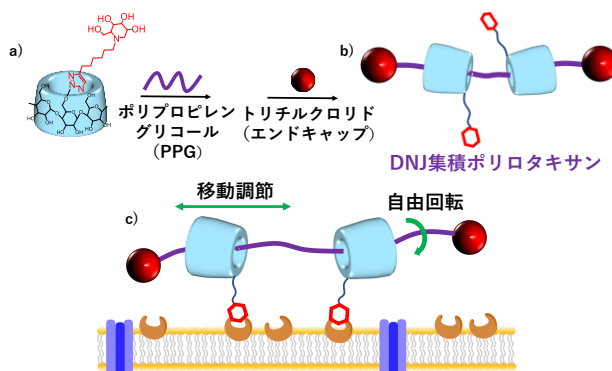


図 1 α -グルコシダーゼ阻害活性を最大化する
DNJ 集積ポリロタキサンの概念図

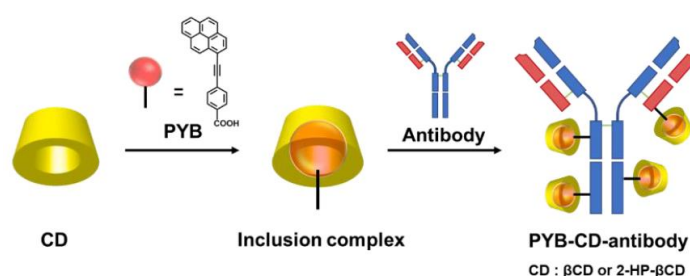
シクロデキストリンの特異的な色素取り込みを利用した蛍光標識抗体の効率的な作製法

○山口浩靖^{1,2}・岩井悠馬¹ (¹阪大院理、²阪大 FRC)

Efficient Preparation of Fluorescence-Labeled Antibodies Using Specific Dye Uptake of Cyclodextrins
(Graduate School of Science, Osaka Univ.¹, Forefront Research Center, Graduate School of Science, Osaka Univ.²)
YAMAGUCHI, Hiroyasu^{1,2}; IWAI, Yuma¹

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 β 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、 β CD のみならず、環サイズの異なる α 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- β CD (2-HP- β CD) を添加したときも、蛍光強度が強くなった。2-HP- β 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).

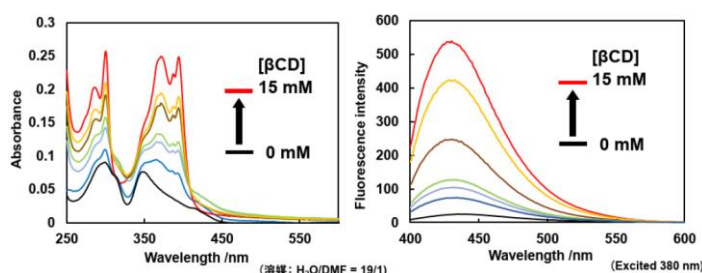
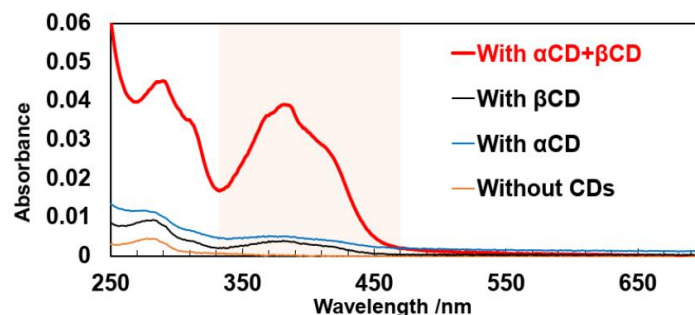


Figure 1. PYB solubilized by addition of β CD and its increase in fluorescence intensity.



Reaction condition	Number of PYB molecules immobilized on a single antibody molecule
Without CDs	0
With α CD	2.6
With β CD	1.9
With α CD + β CD	20

Figure 2. Effective immobilization of PYB on antibodies by adding α and β 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¹・牛島成実²・奈須野恵理²・加藤紀弘² (宇都宮大工¹・宇都宮大院²)

Inhibitory effect of quorum sensing by trapping intercellular signal in *Bacillus subtilis* (School of Engineering, Utsunomiya Univ.,¹ Graduate School of Regional Development and Creativity, Utsunomiya Univ.,²) AKATSUKA Natsume¹; USHIJIMA Narumi¹; NASUNO Eri¹; KATO Norihiro¹

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。

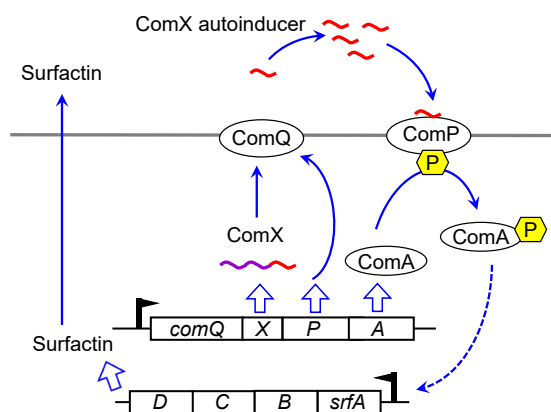


Fig. 1. The ComX quorum sensing in *B. subtilis*.

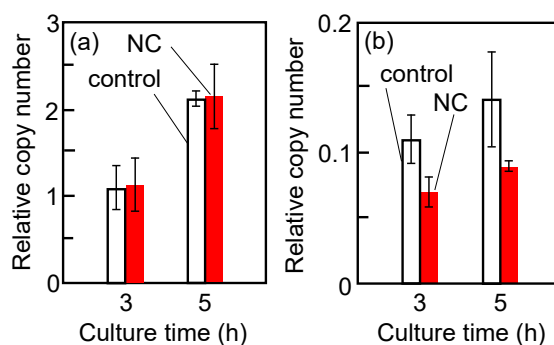


Fig. 2. Culture time dependence of relative copy number with or without the NC membrane during the culture. Three NC membranes (10 × 10 mm) were immersed at the start of culture (4 mL). (a) *comX*, (b) *srfA*.

臨床薬を用いたセロトニン 5-HT_{2A} 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_{2A} 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_{2A} 受容体 (5-HT_{2A}R) に着目した。5-HT_{2A}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_{2A}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_{2A}R に対する臨床薬のサブタイプ選択性に着目し、5-HT_{2A}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_{2A}R に対する臨床薬の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) 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_{2A}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_{2A}R の活性制御について報告する。

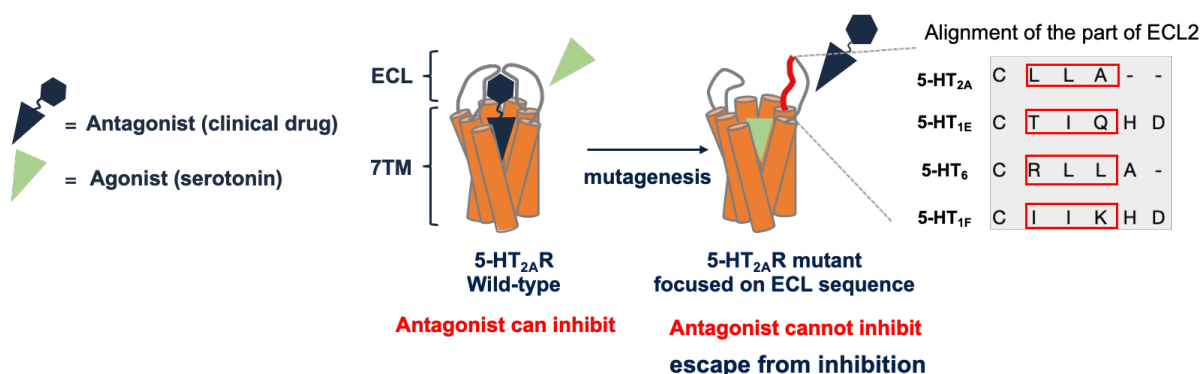


Fig1. Concept of escape from inhibition of clinical drugs to 5-HT_{2A}Rs

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。¹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。²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。³

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。⁴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 μM と、生体内グルコース濃度(0.1mM から数 mM)⁵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。

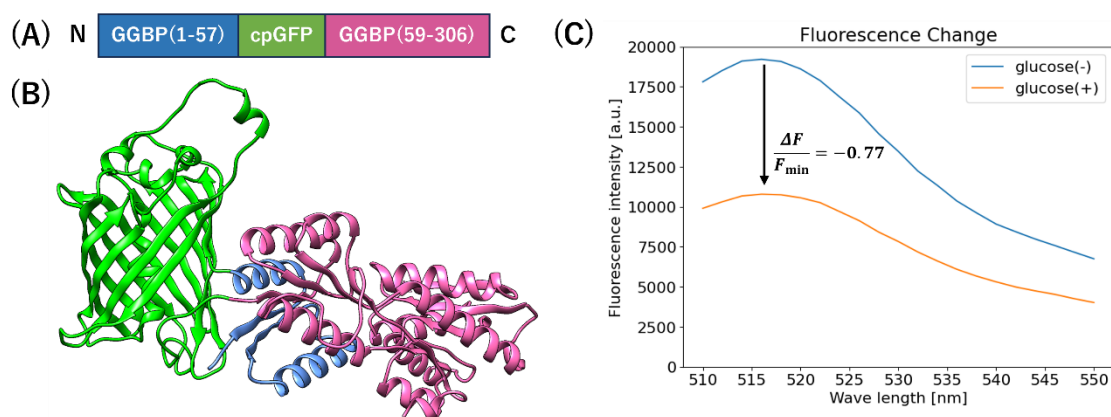


Figure. (A): The insertion site of cpGFP for the most promising variant. (B): Predicted structure of the most promising variant by AlphaFold2. (C): The Fluorescence intensity change between presence and absence of 100 mM of glucose. Excitation wavelength is 470 nm.

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¹・西村 賢宣¹ (¹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 Tsukuba¹), Leyun HUANG¹; Yoshinobu NISHIMURA¹

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。

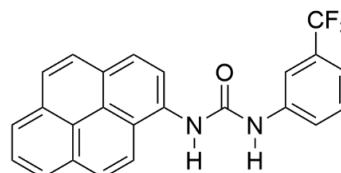


Fig. 1. The structure of *m*-CF₃-1PUP.

DMSO と DMF 中において、*m*-CF₃-1PUP—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¹。DMF 中で *m*-CF₃-1PUP—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、 α -CD、 β -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、 α -CD、 β -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、 α -CD と β -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 MingYao¹; Matsuo Ryusei²; FUJINO, Tomoshige¹; HAYASHI, Gosuke¹; MURAKAMI, Hiroshi^{1,2}
(Graduate School of Engineering, Nagoya University¹, Institute of Nano-Life-Systems, Institutes of Innovation for Future Society, Nagoya University²)

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.

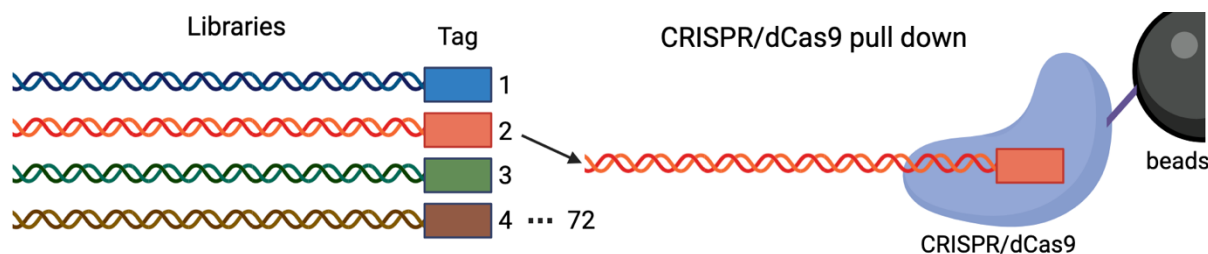


Figure 1. The strategy of accelerating affinity maturation selection by CRISPR/dCas9

[1] Kondo, T., *Sci. Adv.*, **2020**, 6(42), eabd3916.

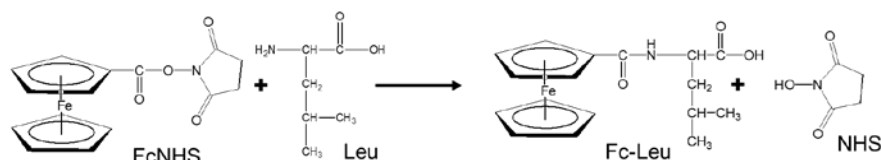
[2] Kondo, T., *Life Sci. Alliance*, **2022**, 5, 6, e202101322.

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 憲二¹・丹羽 史佳¹・上原 亜久理¹・上村 英大¹ (¹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 Technology¹) YOKOYAMA, Kenji¹; Niwa, Fumika¹; UEHARA, Akuri¹; KAMIMURA, Eito¹

【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。

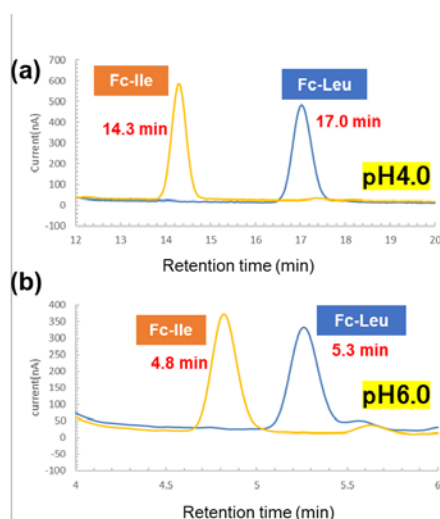


Fig. 1 Chromatogram of Fc-labelled branched chain amino acids
 Mobile phase: (a) 0.1 M acetate buffer pH4.0, (b) 0.1 M phosphate buffer pH6.0, buffer / acetonitrile = 70 / 30
 Flow rate 1.0 mL/min, ECD2: -400 mV vs Pd

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¹・Abdelazim Elsayed Elhelaly²・明田悠希¹・兵藤文紀²・松尾政之²・大澤毅¹・小松徹³・浦野泰照^{3,4}・齋藤雄太朗¹・山東信介¹(東大院工¹・岐阜大医²・東大院薬³・東大院医⁴)

Exploration of disease-specific enzyme activity using dipeptide library and its application to hyperpolarized molecular imaging (Graduate School of Engineering, Tokyo Univ.¹, School of Medicine, Gifu Univ.², Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo Univ.³, Graduate School of Medicine, Tokyo Univ.⁴) ARIMURA Kei¹, Abdelazim Elsayed Elhelaly², AKETA Yuki¹, HYODO Fuminori², MATSUO Masayuki², OSAWA Tsuyoshi¹, KOMATSU Toru³, URANO Yasuteru^{3,4}, SAITO Yutaro¹, SANDO Shinsuke¹

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¹⁾。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¹³C, ¹⁵N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²⁾。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^{3,4)}、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-[1-¹³C]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⁵⁾により、Xaa-[1-¹³C]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¹・川井麻那歌¹・鈴木寧々¹・佐藤智典¹・松原輝彦¹ (¹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 University¹) MORIMURA Wakaba¹; KAWAI Manaka¹; SUZUKI Nene¹; SATO Toshinori¹; MATSUBARA Teruhiko¹

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 μ 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96well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。

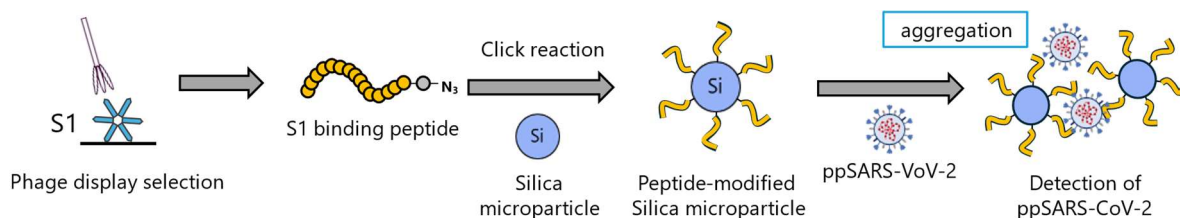


Fig. 1 本実験の概要. ファージ提示法により獲得した S1 結合性ペプチドをシリカ微粒子に修飾し、微粒子と ppSARS-CoV-2 との凝集反応を目視で判別することで検出する。

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¹・〇徐千茗²・平賀健太郎³・早出広司⁴・津川若子¹・池袋一典¹・浅野竜太郎¹ (¹農工大院工、²農工大工、³自然機構 ExCELLS、⁴UNC/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.¹, Department of Engineering, Tokyo Univ. Agric. Technol.², ExCELLS³, Joint Dept. of Biomed. Eng., The Univ. of North Carolina at Chapel Hill and North Carolina State Univ.⁴) ODA, Miho¹; XU, Qianming²; HIRAKA, Kentaro³; SODE, Koji⁴; TSUGAWA, Wakako¹; IKEBUKURO, Kazunori¹; ASANO, Ryutaro¹

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)。

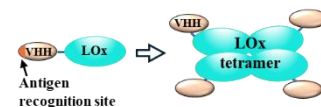


図 1 4 価抗体酵素複合体の作製

我々は、これまでに酸素との反応性を低下させ^{1,2}、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。

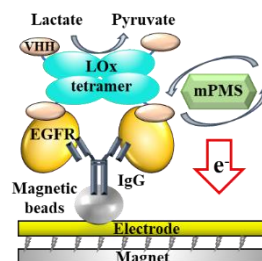


図 2 EGFR の電気化学検出

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^{1,2}・川畑まどか¹・藤田和弘²・平間正博¹・〇円谷 健¹ (¹大阪公立大学院理、²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.¹, Department of Research & Development, Japan Food Research Laboratories²) YOKOZEKI, Toshiaki^{1,2}; KAWABATA, Madoka¹; FUJITA, Kazuhiro²; HIRAMA, Masahiro¹; TSUMURAYA, Takeshi¹

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ンネル (Nav チャンネル) 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¹、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ンネル (Kv チャンネル) を阻害し、Nav チャンネルへの作用と同様に細胞を脱分極させることから、Kv チャン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 チャン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 チャン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 チャンネル阻害剤として、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 チャン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 チャン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 チャン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 μ 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 EC₅₀ 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 EC₅₀ の低下が認められた。最も EC₅₀ 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 チャンネルの阻害が 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¹。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²。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 ϵ 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³。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⁴。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⁵。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。

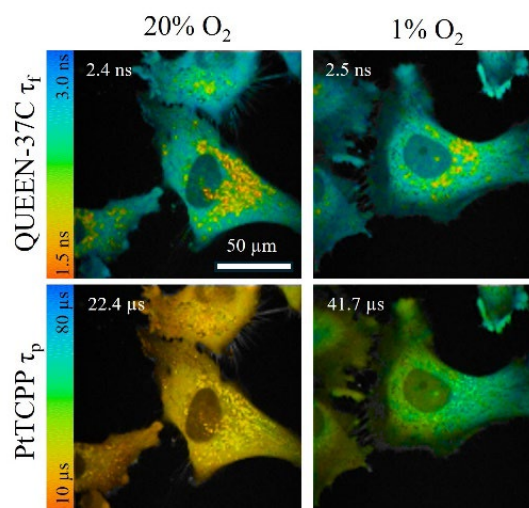


Figure Fluorescence and phosphorescence lifetime images of HL-Q37C-701G7 staining PtTCPP excited at 405 nm. Insert numbers are mean emission lifetime inside cells in the image.

¹ O. Warburg, *Science* 124, 269-270 (1956.)

² H. Kurokawa, *et al.*, *Scientific Reports* 5, 1, 10657 (2015)

³ H. Yaginuma, *et al.*, *Scientific Reports* 4, 1 6522 (2014)

⁴ Y. Okada, *et al.*, *bioRxiv*, 2021.10.08.463131

⁵ 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^{1,2}・民谷栄一^{1,2} (¹産総研先端フォトバイオ、²阪大産研)

Electrochemical characterization of gold nanomaterials and its application (PhotoBIO OIL, AIST¹, SANKEN, Osaka Univ.²) OSAKI Shuto¹; Tamiya, Eiichi²

【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)¹⁻⁴。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。

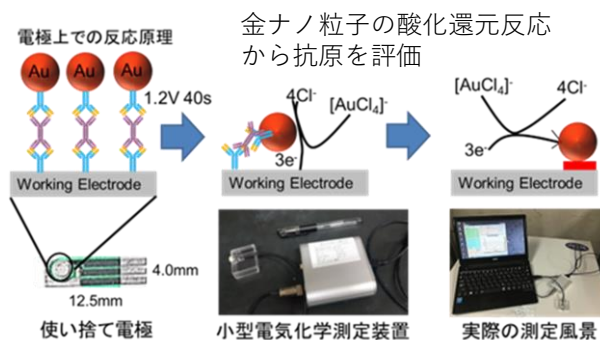


Figure 1: 発表者らが開発した電気化学バイオセンサの原理

【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

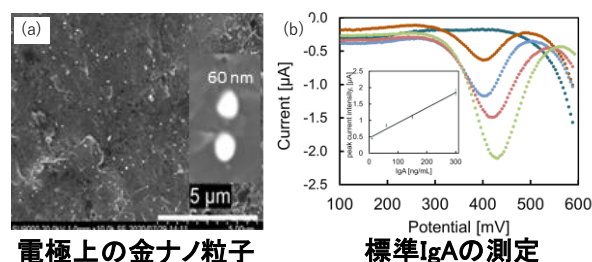


Figure 2: 抗原抗体後の電極 SEM 画像(a), 標準溶液測定時のボルタモグラム(b)

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¹²・Li Menglu¹²・Liao Hao-Xiang² 藤田克昌¹²³ (¹産総研生命工学領域、²阪大院工、³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, AIST¹, Graduate School of Engineering, Osaka University,² Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives³) **BANDO, Kazuki**¹; LI, Menglu¹²・LIAO, Hao-Xiang² FUJITA, Katsumasa¹²³

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¹。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²、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).

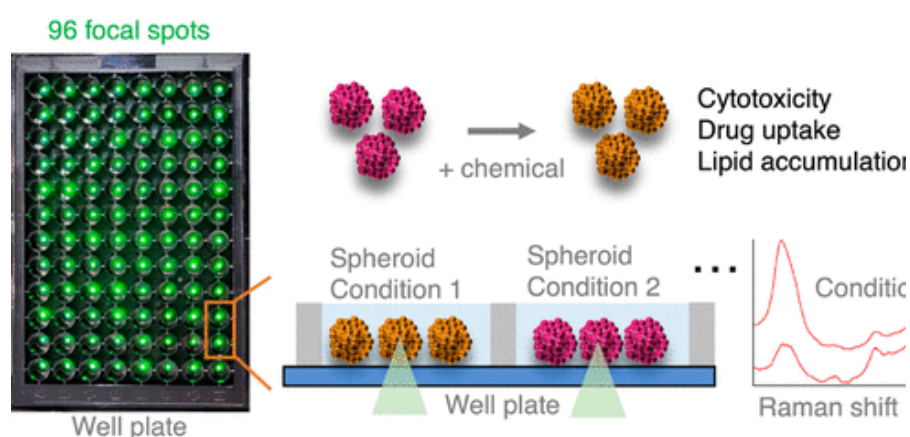


図 1 多点計測の概念図。異なる条件のスフェロイドからラマンを計測する。

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¹・金子諒右²・立石宙也¹・古賀朗寛¹・細川尊夏¹・加隈綾晟¹・谷戸謙太¹・山中皓太¹・新居輝樹²・岸村顕広^{2,3}・森健²・片山佳樹^{2,3}（九大院システム生命¹・九大院工²・九州大学分子システム科学センター³）

Development of Multicolor Cell-ELISA for High-throughput Drug Screening by Using Human Orthogonal Enzymes (Graduate School of Systems Life Sciences, Kyushu University¹, Graduate School of Engineering, Kyushu University², Center for Molecular Systems, Kyushu University³) HIRAKAWA, Rui¹; KANEKO, Ryosuke², TATEISHI, Chuya¹; KOGA, Akihiro¹; HOSOKAWA, Takanatsu¹; KAGUMA, Ryosei¹; TANITO, Kenta¹; YAMANAKA, Kota¹; NII, Teruki²; KISHIMURA, Akihiro^{2,3}; MORI, Takeshi²; KATAYAMA, Yoshiki^{2,3}

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、 β -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。

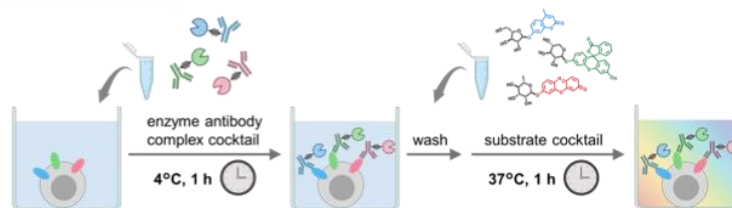


図1 HOEを用いた Cell-ELISA による
薬剤スクリーニングの概略図

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。

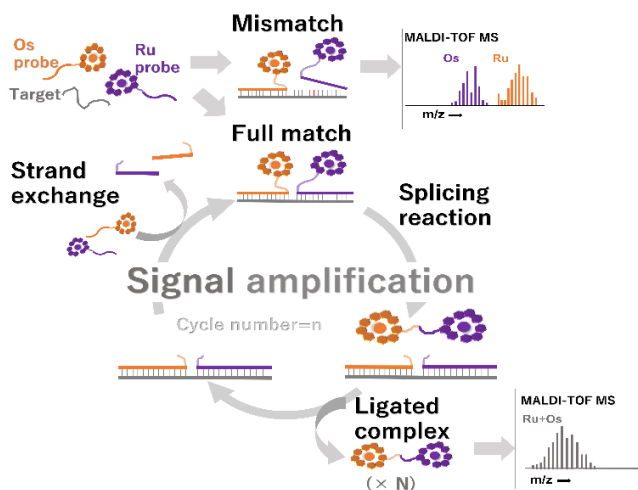


図 1. オスミウム錯体修飾 DNA プローブとルテニウム錯体修飾 DNA プローブによる標的の協働的認識および鋳型特異的に進行するルテニウム-オスミウム連結錯体の形成脱離

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 16.0¹ 及び DNA29² 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¹・三枝拓^{1,2} (¹茗溪学園高、²筑波大院)Research on Allelochemicals of Mushrooms (Meikei High School¹, Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba²) MATSUMOTO, Kana¹; SAEGUSA, Taku^{1,2}

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)。

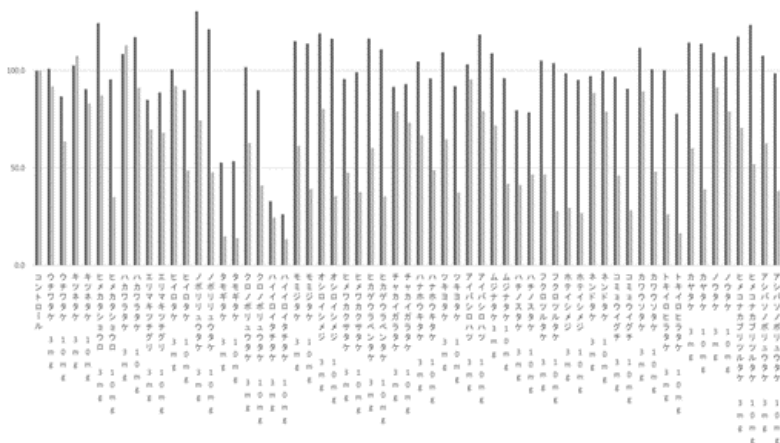


図1 キノコのアレロパシー活性(相対値%)

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¹・三枝 拓^{1,2} (¹茗溪学園高、²筑波大院)

Study on the induction of narcolepsy symptoms during chocolate administration (Meikei High School¹, Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba²) KOBAYASHI, Kano¹; SAEGUSA, Taku^{1,2}

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¹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²。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。

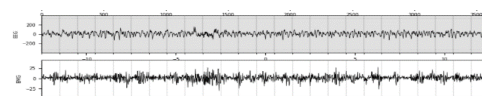


図 1 Wake 脳波 / 筋電図

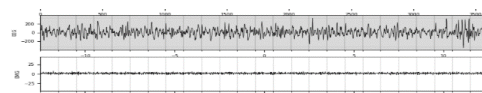


図 2 NREM 脳波 / 筋電図

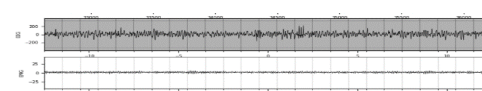


図 3 REM 脳波 / 筋電図

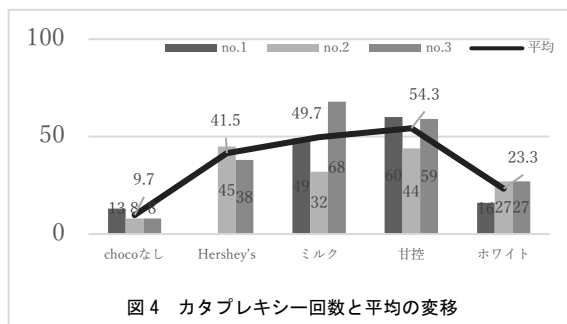


図 4 カタプレキシー回数と平均の変移

1. Y. Oishi. *et al.*, J Neurosci, 33 (23) 9743-9751, 2013

2. S. Uchida. *et al.*, J Neurosci, 41 (7) 1582-1596, 2021

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。（光受容体フォトロボリンの作用による）。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。

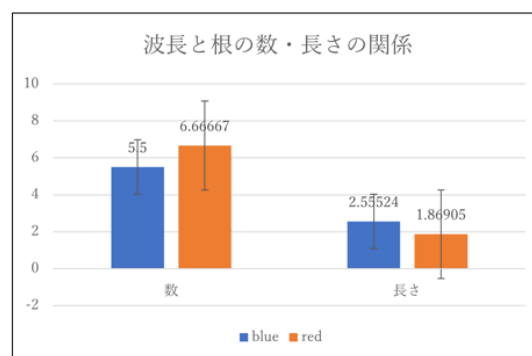


図 波長と根の数・長さの関係

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