

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「細胞自在操作のための分子化学技術の
開発拠点形成」

2017年度・成果報告会

講演プログラム・要旨集

2018年4月14日（土）

同志社大学京田辺キャンパス

恵道館 KD202・KD204

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

私立大学戦略的研究基盤形成事業

「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」2017年度・研究成果報告会

主催：同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

開催日時：2018年4月14日（土）13時-17時

開催場所：同志社大学京田辺キャンパス恵道館202および204

プログラム

研究成果概要報告【13:00-13:30】 恵道館KD202

- 本事業についての概要 小寺 政人（同志社理工）
- テーマ1 「細胞機能を人工的に制御するためのケミカルツール創製」の成果概要 北岸 宏亮（同志社理工）
- テーマ2 「細胞モデルを用いた細胞機能の自在操作技術」の成果概要 塩井 章久（同志社理工）

講演会【13:30-15:10】 恵道館KD202

- 講演1. 脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による神経細胞死誘導機構の解析 浦野 泰臣（同志社生命）
- 講演2. 化学反応によって誘起される運動性粒子の自発的集団運動 山本 大吾（同志社理工）
- 講演3. アミノ酸由来ビニルポリマーを基盤とする生体に優しいスマートマテリアル 東 信行（同志社理工）
- 講演4. 細胞の3次元組織化：優しい取り扱いでもって任意の形状を創り出す 吉川 研一（同志社生命）

研究成果報告会2【15:30-17:00】 恵道館KD204 <ポスター形式>

ポスター発表題目一覧

P1. がん細胞の特異環境で DNA を選択的に切断する二核銅錯体の開発

角谷 優樹・宮野 梨沙・廣畠 敦洋・人見 穂・小寺 政人

P2. 環状アミン修飾アミド型二核化配位子の合成とその二核銅錯体による DNA 切断・

抗がん活性

前川 雄哉・角谷 優樹・小寺 政人

P3. 窒素 5 座配位単核マンガン錯体を用いた触媒的酸化反応の開発に関する研究

竹林大貴・増田瑛介・小寺政人・人見穂

P4. 選択的酸化反応を目的とした反応空間を有する鉄ポルフィリン錯体触媒の合成

菅井優希・野村章子・小寺政人・人見穂

P5. 細胞内一酸化炭素によるミトコンドリア呼吸の調節

峯岸 彩夏・北岸 宏亮

P6. 膜透過性シクロデキストリンを用いたタンパク質類の細胞内デリバリー

二郎丸 美沙・北岸 宏亮

P7. 生体内における Sp1 亜鉛フィンガータンパク質のレドックスセンサーとしての機能評価

北野 莉加・岸 果苗・鳥見 優・杉浦幸雄・根木 滋

P8. SELEX 法による金属置換型 Sp1 フィンガーの至適 DNA 結合配列の探索

松田実紗・奥永望月・水谷茜・杉浦幸雄・根木 滋

P9. PARP-1 によるポリ ADP リボシル化反応におけるπ-π相互作用の重要性：試験管および細胞核内における反応メカニズムの検討

太田志織・照屋圭・竹川真央・成松李恵・松浦里奈・間下雅人・杉浦幸雄・根木 滋

P10.ZIF268 亜鉛フィンガータンパク質の細胞膜透過性：タンパク質表面の二次元カチオン性クラスター構造の重要性

久木望・北田千江梨・眞鍋貴行・杉浦幸雄・根木滋

P11.Sp1 亜鉛フィンガータンパク質の細胞膜透過性における各フィンガードメインの非等価性およびカチオンクラスターユニットの重要性

呉原美空・北田千江梨・眞鍋貴行・杉浦幸雄・根木滋

P12.ペプチド転移酵素 Sortase A: 金属コファクターのペプチド転移反応に及ぼす影響および生細胞表面の部位特異的修飾への応用

佐藤綾香・福島玲菜・川添莉穂・清水恭子・根木 滋

P13.オリゴアルギニンによるゲノムDNAのポリイオンコンプレックス形成挙動：巨視的スケールによる熱力学的および形態観察

神谷 亜門・杉浦幸雄・根木 滋

P14.酸化型GAGA亜鉛フィンガータンパク質のモノチオール化合物による還元反応における金属イオンの効果

橋本 梨奈・大北 佳奈・杉浦幸雄・根木 滋

P15.GAGA金属置換型フィンガータンパク質の作製及びその構造・機能評価

南 奈緒・塩路 未来・増山 紗永子・杉浦幸雄・根木 滋

P16.亜鉛輸送体の金属基質認識機構に関する解析

西藤有希奈・神戸大朋

P17.マルチブロック型ペプチド/ビニルポリマー・ハイブリッドの新規合成法の開発

古賀 智之・西村 慎之介・東 信行

P18.pH振動反応と走化性微小油滴による自律運動システムの構築

岡本泰直・佐々木陽子・名和愛利香・山本大吾・塩井章久

P19.大腸菌組成をもつリン脂質ベシクルへのイオン液体の分配

仁保早紀子・鈴木ひかる・松本道明

P20.水和イオン液体中のPYPの光反応ダイナミクス

木村佳文・小野寺香奈・水谷浩人・八坂能郎・遠藤太佳嗣

P21.プロトン性イオン液体中の特異なプロトン移動過程

藤井香里・八坂能郎・遠藤太佳嗣・木村佳文

P22.イオン液体に高濃度に溶解したセルロースの自己組織化現象

遠藤太佳嗣・細見昭太・藤井俊輔・仁宮一章・木村佳文・高橋憲司

P23.レーザ照射によるミクロ粒子の自律的動的パターンの生成

長谷川よし乃・妹尾駿佑・田中智子・剣持貴弘・貞包浩一朗・吉川研一

P24.音に内在する時間反転対称性の破れの評価 -楽器の音色の解析-

矢鳴洸思・馬場ひかり・鷹取慧・剣持貴弘・吉川研一

P25.拮抗的な塩は水中でどれだけ界面活性剤のように振舞うか

土合恭平・貞包浩一朗

P26.塩に対する多重小胞膜溶液の反応

中嶋一真・貞包浩一朗

P27.直流電流源駆動型無接点マイクロモーター構築の試み-電極形状変化による影響-

松村拓哉・岡田和也・吉川研一・塩井章久

P28.組織切片の伸展性応答：病態に依存したひび割れパターン形成

大社奈摘・中村直彦・井口公太・池川雅哉・剣持貴弘・吉川研一

P29.水/有機溶媒/塩の混合溶液で形成される結晶構造

加藤僚・伊藤尚充・高椋利幸・貞包浩一郎

P30.シスプラチニンとトランスプラチニンによるDNAの高次構造と機能への影響の比較研

究

岸本幹史・吉川祐子・吉川研一

講演 1

脳特異的オキシステロール 24S-hydroxycholesterol による神経細胞死誘導機構の解析

浦野泰臣

同志社大学生命医科学部・医生命システム学科

E-mail address: yurano@mail.doshisha.ac.jp

脳特異的オキシステロールである 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) は脳内のコレステロール恒常性を保つ上で重要な役割を果たしている。一方でアルツハイマー病 (AD) や軽度認知症患者の脳脊髄液中で増加することが報告されている。また、24S-OHC の生成酵素である cholesterol 24-hydroxylase の多型が AD 発症の危険因子として報告されており、24S-OHC と AD の発症や進行との関連が示唆されている。

これまで我々は、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞において、過剰な 24S-OHC がカスパーゼ非依存性プログラム細胞死である necroptosis 様の細胞死を誘導すること、さらに初期段階で acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) によりエステル化した 24S-OHC が蓄積することを見出した。本研究ではその細胞死メカニズムについて明らかにすることを目的とし、以下の解析を行った。

まず細胞内に蓄積した脂質について HPLC 法を用いて測定したところ、主に 4 種類の 24S-OHC エステル体が蓄積していることを見出した。そこで DART 質量分析法を用いて詳細な同定を行ったところ、オレイン酸など 4 種の長鎖不飽和脂肪酸が 3 位の OH 基にそれぞれエステル結合した 24S-OHC エステル体が蓄積していることを明らかにした。同定された各脂肪酸を 24S-OHC と同時添加すると細胞死が増悪したことから、特定の種ではなく、全体として 24S-OHC エステル体が蓄積することが細胞死を誘導すると考えられた。次に電子顕微鏡により細胞内構造を観察したところ、24S-OHC 処理細胞では脂肪滴様構造の形成と共に小胞体の肥大化が観察され、ACAT 阻害剤によりこれらの構造の形成が抑制されることを見出した。そこで小胞体ストレスについて解析したところ、unfolded protein response (UPR) 経路の活性化が確認された。また ACAT 阻害剤処理により UPR の活性化が抑制されたことから、24S-OHC のエステル化に伴って小胞体ストレスが生じていることが明らかとなった。以上の結果から、ACAT によりエステル化された 24S-OHC が増加し、異常な脂肪滴様構造を形成することが小胞体ストレスを誘導することで、細胞死が引き起こされる可能性が考えられた。

講演 2

2017 年度 成果報告会

化学反応によって誘起される運動性粒子の自発的集団運動

山本 大吾・井尾 祐斗・久保内 雅生

同志社大学理工学部化学システム創成工学科

E-mail address: dyamamot@mail.doshisha.ac.jp

生物は自由に動くことができ、複数の生物が混み合った環境にいる場合には特徴的な集団運動を行うこともある。「動く」という行為は我々にとって非常にありふれた行為であるが、いざ「動く」という行為をする物体（乗り物、ロボットなど）をメカニカルに作製しようとすると、非常に複雑な構造を持つシステムが必要となる。一方で、バクテリア・ゾウリムシなどの高等生物ほど複雑ではない構造を持つミクロな単細胞生物さえ自律的に運動を行うことができ、集団の場合にはコロニーとして知られる興味深い幾何学パターンを形成することを考慮すると、「動く」さらには「集団運動」という行為はそれほど複雑な構造を持たない物体でも為しえるものだと考えられる。本研究では、自然界ではありふれているこれらの自発運動をシンプルな人工系で再現し、生物模倣的なモデル系を確立することを目的としている。本研究ではこれまでに、アルコールなどの有機物を含む水溶液中で白金触媒粒子が自発運動をおこなうことを見出している。駆動力は溶存酸素を用いた有機物質の酸化反応であり、大局的に見れば、水棲の微生物と同様の運動機構であるといえる (*Nanoscale*, 7, 13186, 2015)。

今回の研究では、有機物を含む濃厚な白金粒子懸濁液を用いると、①粒子が集まりクラスター化、②複数のクラスターが運動をおこない合一してより大きなクラスターを形成、③反応が終了すると粒子のブラウン運動によって速やかに解散し元の分散した状態に戻る、といった興味深い集団運動 (Fig.1) を見出した。その他、条件を変えることで多数の新規な現象を観察できたので報告する。

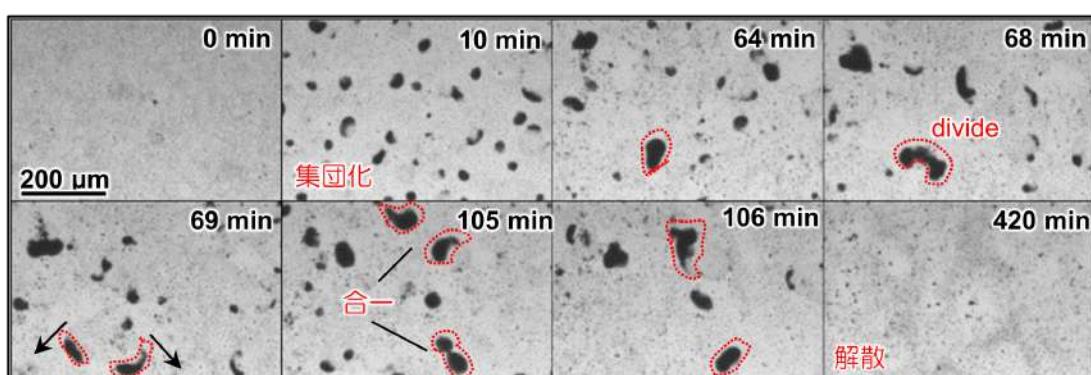


図 1 エタノール水溶液中における白金触媒粒子の自発的集団運動

講演 3

2017 年度 成果報告会

アミノ酸由来ビニルポリマーを基盤とする生体に優しいスマートマテリアルの開発—細胞足場材としてのインジェクタブルゲル—

東 信行・松原 翔・西村慎之介・古賀智之

同志社大学 理工学部 機能分子・生命化学科

E-mail:nhigashi@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】

これまでにアミノ酸由来ビニルポリマーが温度応答性を示すことを見出してきた。また、用いるアミノ酸の構造によって LCST 型や UCST 型に応答様式を設計できること、さらに異なるアミノ酸種の共重合化により相転移温度を広範囲に制御できることを明らかにした。また、固体表面からの ATRP 法によるスマート表面の調製に成功し、その転移温度を利用した細胞シートの作成・回収にも成功した。本年度は、三次元ネットワーク化に挑戦すべく ABA 型のトリブロックポリマーの精密合成とその温度応答性について検討した。

【結果と考察】

アラニン由来ビニルポリマー($T_T = 18^\circ\text{C}$)を A ブロック、グリシン由来ビニルポリマー($T_T = 77^\circ\text{C}$)を B ブロックとする新規トリブロックポリマー($\mathbf{1}_{n,m}$)を ATRP 法により系統的に合成した (Fig. 1a)。この水溶液の希釈下での濁度の温度依存性を Fig. 1c に示す。低温域(5°C)では透明な水溶液が、昇温に伴って 18°C 付近より濁度が増し LCST 型の相転移を示した。さらに昇温すると、平坦部を経て第 2 の LCST 転移を示した。それぞれの LCST 現象は各ブロックに基づくものであると考えられるが、それらの温度が対応するホモポリマーの LCST に必ずしも一致しないことから、特異な分子間相互作用にもとづく特徴的な集合構造を形成していることが予想される。各温度における水溶液の AFM や TEM 観察、動的光散乱(DLS) 測定により、Fig. 1b に模式的に示すようなフラワー様ミセルを経るモデルが妥当である結論づけた。すなわち、溶解状態 ($\sim 5^\circ\text{C}$) からアモルファスな凝集状態を経て、 $30 \sim 60^\circ\text{C}$ の間で分子間の相互作用の組み替えが進み、安定なフラワー様ミセルを形成したものと考えた。更なる昇温で A ブロックが転移して疎水的となり巨大凝集体へと変化したと考察した。高濃度下でのハイドロゲル形成については講演時に述べる。

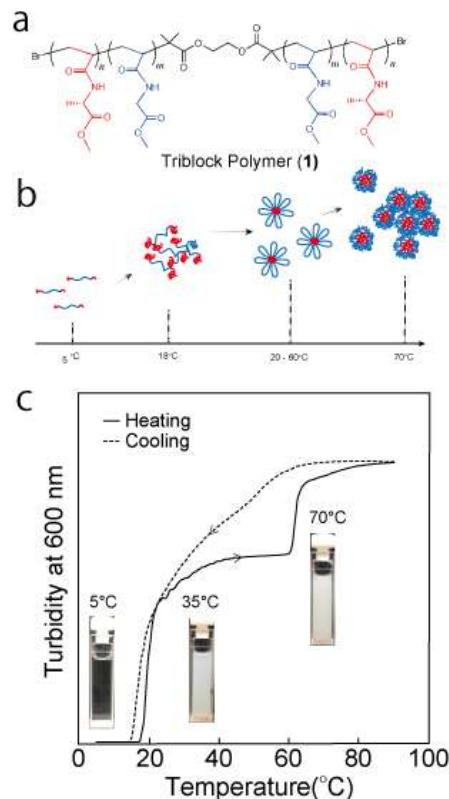


Fig. 1. (a) Molecular structure of triblock copolymer ($\mathbf{1}_{n,m}$). (b) Plausible model for the thermo-responsive transitions of $\mathbf{1}$. (c) Temperature dependence of the turbidity at 600 nm for $\mathbf{1}_{53,240}$ in water.

講演4

細胞の3次元組織化：優しい取り扱いでもって任意の形状を創り出す

吉川研一

同志社大学生命医科学部・医情報学科

E-mail address: keyoshik@mail.doshisha.ac.jp

iPS細胞やES細胞などの万能細胞を、実際に、医療や食物生産などの分野に応用するためには、分化した細胞を三次元的に配列させて、必要とされる機能を有する細胞組織体を人工的に形成することができる技術の創出が不可欠となる。これまででは、細胞組織体を構築する方法として、ゲルなどの人工的な基盤を用いて、細胞同士を接着さる方法が主流となっている。しかしながら、これら従来の方法では、二次元的な細胞組織体を構築することは可能であるが、臓器のように複雑な形状をもつ三次元細胞組織体を構築することは困難である。現在、人為的に作成した細胞を複雑な三次元形状の生体組織へと組み立てる方法は、数多くの試みがあるものの、未だ確立されていない。今回は、光ピンセット技術と高分子混雑効果を組み合わせることで可能となった三次元細胞組織体構築方法について報告したい。¹⁻³⁾

図には、Nd:YAGレーザ（波長 1,064 nm）による光ピンセット操作により、マウスの乳腺上皮細胞を三次元的に接着させた結果を示した。このように、高分子環境下において、光ピンセットで操作することにより、数分程度で遠隔操作により細胞組織体を構築することが可能であることが明らかとなった。

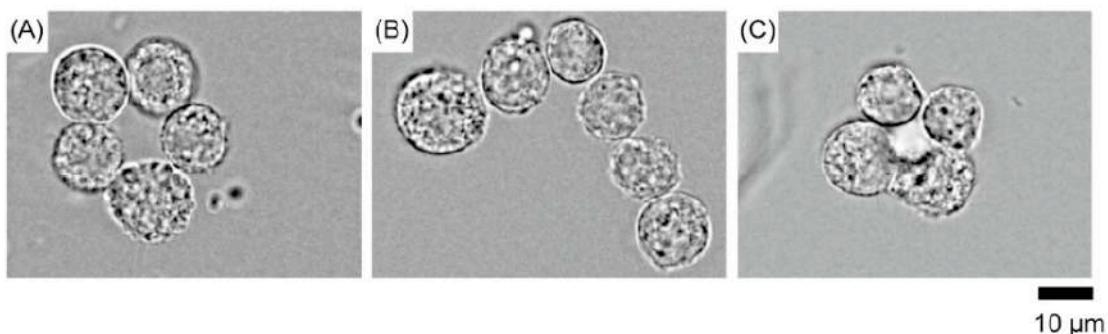


図 乳腺上皮細胞(NMuMG)の3D組織体、デキストラン40mg/mL存在下、レーザ操作により細胞集合体を生成。²⁾ (A)ドーナツ、(B)L字、(C)正4面体構造。
Ref: 1) S. Hashimoto, et al., *Chem. Phys. Lett.*, 655, 11-16(2016). 2) A. Yoshida, et al., *Polymers*, 9, 319/1-10(2017). 3) 劍持ら、「細胞にやさしい三次元細胞組織体構築の新手法」、クリーンテクノロジー、11月号(2016).

がん細胞の特異環境で DNA を選択的に切断する二核銅錯体の開発

角谷 優樹・宮野 梨沙・廣畑 敦洋・人見 穂・小寺 政人
同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻
duq0716@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】

現在抗がん剤として使用されている白金錯体は、様々ながんに對して効果があるため、広く使用されている。しかし、これらの抗がん剤は正常細胞とがん細胞の選択性がないため、深刻な副作用を引き起こすことが問題となっている。そこで我々は、がん細胞のみを攻撃する金属錯体の開発を目指し、がん細胞の低 pH や高い過酸化水素濃度などの特異環境に注目した。

本研究では、これらの環境下で DNA を選択的に切断する新規二核銅錯体の開発を目指し、Figure 1 に示す二核化配位子を合成し、それらの二核銅(II)錯体 $[Cu_2(\mu-OH)bcmp]^{2+}$ (1), $[Cu_2bcc]^{3+}$ (2), $[Cu_2(\mu-OH)Me4bcmp]^{2+}$ (3), $[Cu_2(\mu-OH)bcamide]^{2+}$ (4), $[Cu_2(\mu-OH)bpmp]^{2+}$ (5), $[Cu_2(\mu-OH)bpcp]^{2+}$ (6) を合成した。今回は、これらの錯体の DNA 切断活性について報告する。

【実験および結果と考察】

本研究では、初めに、がん細胞内の pH が低いことに注目し、錯体 1-3 を用いて DNA の加水分解的切断実験を pH 5.0-7.4 で行った。この結果、低 pH 領域において 1 の活性が最も高く、3 の活性が最も低いという結果が得られた。さらに正常細胞の pH である 7.4 付近ではいずれの錯体も DNA を全く切断しなかった。これらの結果から、金属中心の μ -OH 架橋基と環状アミンの NH 基が DNA の加水分解的切断を加速することが示された。さらに低 pH 領域での高い DNA 切断活性の理由をその反応機構から推定した。次に、がん細胞内の高い H_2O_2 濃度に注目し、 H_2O_2 存在下で錯体 1-3 による DNA 切断実験を行った。しかし H_2O_2 を加えても DNA 切断は全く加速されなかった。そこで、ペンドント基をつなぐ方法として、強固な結合であるアミド結合に変更した錯体 4 を開発した。錯体 4 を用いて H_2O_2 存在下で DNA の酸化的切断を行ったところ、 H_2O_2 濃度に依存して高い DNA 切断活性を示すことが見出された。またペンドント基を環状アミンから dipyridylmethylamine (DPA) に変換した新規二核銅錯体 6 を合成し、ペンドント基が環状アミンである場合と比較して DNA 切断活性がどのように変化するかを調べた。この結果、6 は 4 よりも高い DNA 切断活性を示すことが見出された。これらのことから、本研究で開発したアミド結合でペンドント基を導入した二核銅錯体 4 と 6 は、共通して H_2O_2 存在下での DNA 酸化切断に対して非常に高い活性を示すことが明らかになった。またこれらの錯体を用いれば H_2O_2 濃度によって DNA 切断活性を変化させられると考えられる。従って、これらの錯体は正常細胞とがん細胞において DNA 切断活性が異なるはずであり、副作用のない抗がん剤の開発への応用が期待される。

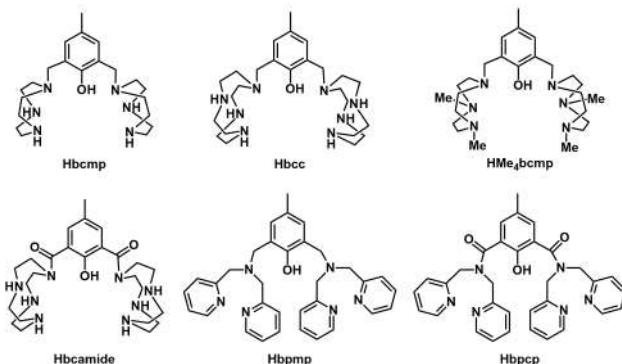


Figure 1. 様々な二核化配位子

環状アミン修飾アミド型二核化配位子の合成とその二核銅錯体による DNA 切断・抗がん活性

前川 雄哉・角谷 優樹・小寺 政人
同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻
duq0716@mail4.doshisha.ac.jp

DNA の複製を阻害する抗がん剤として cisplatin などが臨床利用されている。これらは、正常細胞にも作用して深刻な副作用を引き起こす。これまでに、我々は、がん細胞の特徴の 1 つである、正常細胞よりも高い濃度で存在する活性酸素種(ROS)、特に H₂O₂ に注目して副作用の少ない抗がん剤の開発を目指した研究を行ってきた^[1]。我々は、p-cresol の 2,6 位に cyclen をアミド結合で導入した配位子 Hbcamide (Figure 1)を合成し、その二核銅錯体 Cu₂(μ-OH)bcamide を用いて H₂O₂ 存在下での DNA 切断能を検討した^[2]。この結果、この錯体は過酸化水素の濃度に依存して DNA の酸化的切断を促進し、120 分という短時間で DNA の Form III が生成することが見出された。DNA の Form III は直線構造をしており、環状構造をしている Form II よりも生体内に存在する DNA 修復酵素によって修復されにくい。このため、短時間で Form III を生成する我々の二核銅錯体は抗がん剤に応用できると考えられる。

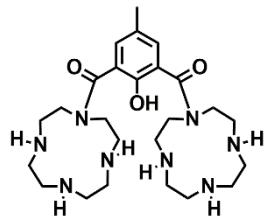


Figure 1. Chemical Structure of Hbcamide

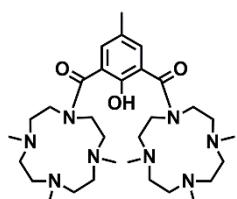


Figure 2. Chemical Structure of HMe₆bcamide

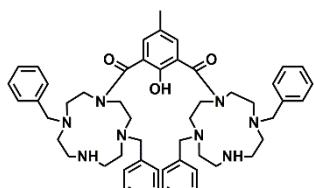


Figure 3. Chemical Structure of HBn₄bcamide

上を目指した。また、錯体の細胞導入を目指すために細胞膜透過能力を持つグアニジン誘導体を官能基として導入することによって、細胞内により取り込まれやすいと考えられる新規二核化配位子を設計した。今回は、この二核配位子の比較として、第 2 級アミン部位にメチル基やベンジル基などを導入して第 3 級アミンとした新規二核化配位子 HMe₆bcamide(Figure 2)及び HBn₄bcamide(Figure 3)の設計・合成及びその二核銅錯体を合成したので、これを報告する。

参考文献

- [1] Aykin-Burns, N.; Ahmad, I. M.; Zhu, Y.; Oberley, L. W.; Spitz, D. R. *Biochem. J.* **2009**, *418*, 29–37.
- [2] 福井克樹氏, 2017 年度 同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻修士論文

しかし、酸化的条件において、Cu₂(μ-OH)bcamide の第 2 級アミンの部位が不安定であると考えられる。このため、本研究では、錯体の耐久性を向上させるために第 2 級アミンの部位に置換基を導入することによって第 3 級アミンとし、耐久性の向上を目指した。また、錯体の細胞導入を目指すために細胞膜透過能力を持つグアニジン誘導体を官能基として導入することによって、細胞内により取り込まれやすいと考えられる新規二核化配位子を設計した。今回は、この二核配位子の比較として、第 2 級アミン部位にメチル基やベンジル基などを導入して第 3 級アミンとした新規二核化配位子 HMe₆bcamide(Figure 2)及び HBn₄bcamide(Figure 3)の設計・合成及びその二核銅錯体を合成したので、これを報告する。

窒素5座配位单核マンガン錯体を用いた 触媒的酸化反応の開発に関する研究

竹林大貴・増田瑛介・小寺政人・人見穂

同志社大学大学院理工学研究科

E-mail address: ctwc7055@mail4.doshisha.ac.jp

炭化水素の水酸化反応は、C-H結合解離エネルギーが高いために、酸化力の強い酸化剤を用いる必要があり、選択的酸化が困難である。複雑な化合物の合成において、選択的な酸化を行う事が可能になれば、より少ない工程で合成ができるようになる。当研究室では、置換活性な配位座のトランス位にアミドアニオン配位を有する单核マンガン錯体 Mn^{III}(dpaq)が、過酸化水素を酸化剤として酢酸存在下、アダマンタンの第3級炭素を第2級よりも選択的に酸化することを報告している[1]。本系では、酢酸の非存在下では、酸化反応が進行しない。今回、選択酸化に対する酢酸の役割を明らかにするために、酢酸存在下及び非存在下における、錯体の過酸化水素との反応を吸収スペクトルおよびESI-MSを用いて測定した。

錯体 Mn^{III}(dpaq)に過酸化水素を添加した際の吸収スペクトル変化は、酢酸の有無によって異なった。そこで、錯体に過酸化水素を添加した際のESI-MS測定を行うと、酢酸非存在下では [(dpaq)Mn^{III}(O)₂Mn^{IV}(dpaq)]⁺などの、酸素原子で架橋した二核錯体を形成していることがわかった。一方、酢酸存在下では酢酸が配位した錯体[Mn^{III}(OCOCH₃)(dpaq)]⁺のスペクトルが得られた。これらのことから、酢酸によって錯体の二核化が阻害されていると考えられる(Figure 1)。

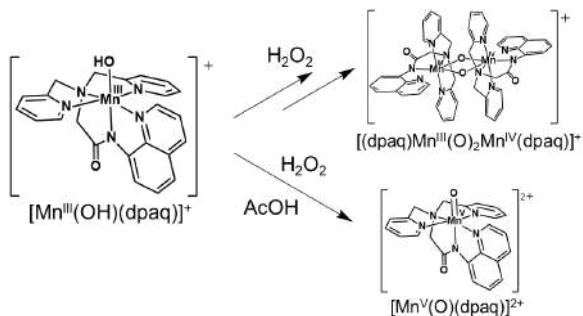


Figure 1. Plausible reaction of Mn^{III}(dpaq) with H₂O₂

参考文献

1. 増田瑛介, 同志社大学大学院理工学研究科, 修士論文, 2017

選択的酸化反応を目的とした反応空間を有する
鉄ポルフィリン錯体触媒の合成

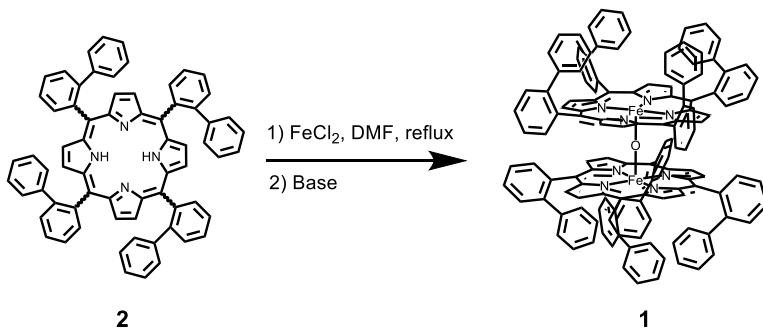
菅井優希・野村章子・小寺政人・人見穂

同志社大学大学院理工学研究科

E-mail address: ctwc0749@mail4.doshisha.ac.jp

アルカンの C-H 結合を穩やかな条件で選択的に活性化し、官能化することができれば産業、工業分野において有用である。しかし、アルカンの C-H 結合の結合解離エネルギー (BDE) は約 100 kcal mol⁻¹ と高く、アルカン選択酸化には高い酸化能力と選択性の双方を備えた酸化剤が必要となるが、有用なものは未だに開発されていない。たとえば、Sorokin らは、フタロシアニンあるいはポルフィリンを配位子とする μ -ニトリド鉄錯体 2 量体から発生させた金属オキソ種 ((TPP)Fe^{IV}=N-Fe^{IV}(TPP^{•+})=O) が強い C-H 結合を有するメタン (BDE = 104.9 kcal mol⁻¹) を酸化できると報告しているが[1,2]、これには選択性がない。また、鉄テトラキスフェニルポルフィリン (TPP) 錯体の μ -オキソ二量体を酸化触媒としてシクロヘキサンを酸化し、シクロヘキサノンとシクロヘキサノールを生成させた場合、398 K, 0.6 MPa の条件下で、鉄 TPP 錯体に比べてその触媒回転数は 6.5 倍となり、ケトンをより選択的に生成したという報告がある[3]。

本研究では、鉄 TPP 錯体の μ -オキソ二量体の上下に、アルカン酸化のための反応空間を構築し、アルカン選択酸化に必要な高い酸化能力と選択性の双方を備えた酸化触媒 **1** を合成することを目指した。



[1] A. B. Sorokin et al., *Chem. Commun.* **2008**, 2562.

[2] E. V. Kudrik et al. *Nat. Chem.* **2012**, 4, 1024.

[3] C. C. Guo et al., *J. Mol. Cat. A*. **2003**, 192, 289-294.

細胞内一酸化炭素によるミトコンドリア呼吸の調節

峯岸 彩夏, 北岸 宏亮

同志社大学大学院理工学研究科

E-mail address: hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】一酸化炭素(CO)はミトコンドリア内で、ヘムタンパク質であるシトクロム *c* オキシダーゼ(CcO)の中心鉄に結合し、ミトコンドリアの呼吸低下や代謝異常を引き起こす¹⁾。一方、細胞内に微量の CO を加えると、ミトコンドリアの呼吸機能が向上することが報告されたが、その詳細なメカニズムは明らかとされていない。CO は細胞内でヘムの代謝分解の際に常に微量発生しており、内因性 CO もミトコンドリア内において何らかの役割を担っていると考えられるが、未だ解明には至っていない。我々はこれまでに、水中で極めて高い CO 親和性を示す超分子錯体(hemoCD)に、細胞膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン(R8)を修飾することで、細胞膜を透過する CO 除去分子(R8-hemoCD)の開発に成功している²⁾。本研究では、R8-hemoCD を用いて細胞内 CO を除去した際のミトコンドリアの機能変化を検討し、微量の CO がミトコンドリア内で果たす役割を考察した(Figure 1)。

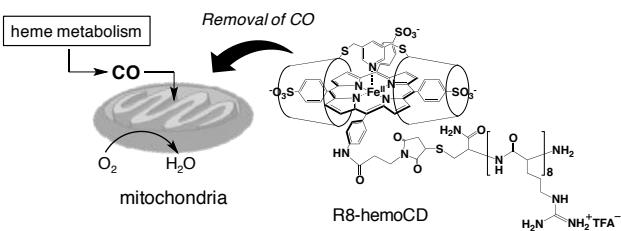


Figure 1. Removal of CO in mitochondria using R8-hemoCD.

【結果と考察】R8-hemoCD をミトコンドリア溶液に加え内因性 CO を除去すると、CcO 活性および酸素消費速度(OCR)がいずれも減少し、ミトコンドリアの呼吸機能が有意に低下したことから、内因性 CO は呼吸機能を向上させる働きがあることが示唆された(Figure 2)。ミトコンドリア内膜上には、CcO よりも CO 解離定数が約 6 倍低い K⁺チャネル(BK_{Ca})が存在することが報告されている³⁾。すなわち微量の CO は、CcO に優先して BK_{Ca} チャネルへ結合すると考えられる。BK_{Ca} チャネルは CO の結合によって活性化することから、CO を除去することで BK_{Ca} チャネルが不活性化され、ミトコンドリアの呼吸機能が低下したと推測した。

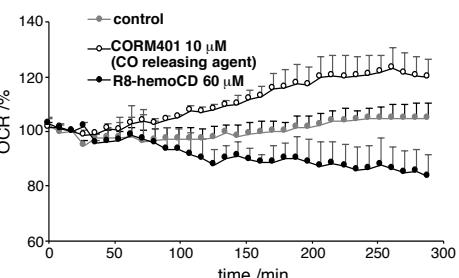


Figure 2. Oxygen consumption rate in BV2 cells after addition of PBS (control), CORM401 (10 μ M), or R8-hemoCD (60 μ M).

【参考文献】

- 1) L. Yi, J. T. Morgan, S. W. Ragsdale, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 201117.
- 2) S. Minegishi, A. Yumura, H. Miyoshi, S. Negi, S. Taketani, R. Motterlini, R. Foresti, K. Kano, H. Kitagishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 5984.
- 3) C. E. Cooper, G. C. Brown, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2008**, 40, 533.

膜透過性シクロデキストリンを用いたタンパク質類の 細胞内デリバリー

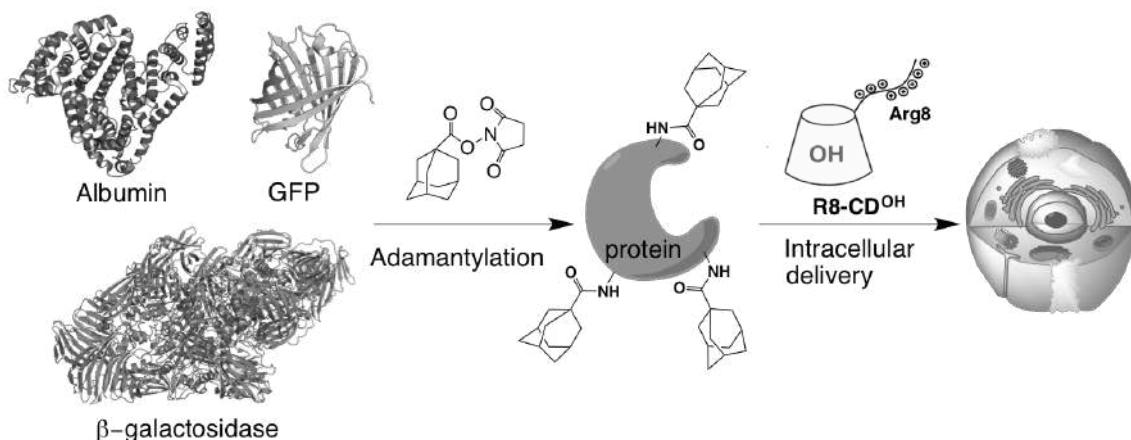
二郎丸 美沙, 北岸 宏亮

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

E-mail address: hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】

当研究室では以前に β -シクロデキストリン(CD)の第一級水酸基側に細胞膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン(R8)を修飾したR8-CD^{OH}を合成し、包接錯体の細胞膜透過について報告した¹⁾。本研究では、R8-CD^{OH}を用いてタンパク質類を細胞内に導入する方法を検討した。CDに内包される部位として、表面に露出しているリジン残基にアダマンタンを導入したタンパク質(Ad-protein)を調製した。モデルのタンパク質として、アルブミン、GFPおよび β -ガラクトシダーゼの3つを選択し、これらがR8-CD^{OH}によって細胞内に導入されるか検討した。



【結果と考察】

アルブミン、GFPおよび β -ガラクトシダーゼのいずれの場合においても細胞内デリバリーが確認され、特にR8-CD^{OH}により導入した β -ガラクトシダーゼは細胞内においても触媒活性を示した。本研究により、Ad化/R8-CD^{OH}法による細胞内タンパク質送達技術は、汎用性が高く活性保持型のデリバリーシステムであることが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) H. Kitagishi, F. Chai, S. Negi, Y. Sugiura, K. Kano, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 2421-2424.

生体内における Sp1 亜鉛フィンガータンパク質の レドックスセンサーとしての機能評価

○北野 莉加・岸 果苗・鳥見 優・杉浦 幸雄・根木 滋

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:ykf052@dwc.doshisha.ac.jp

【研究目的】

亜鉛フィンガータンパク質 (ZEP) は真核生物の転写因子に見られる DNA 結合モチーフの一つである。近年、ZEP がレドックス応答を通して細胞内部の酸化還元状態に大きく関与していることが示唆されている。しかし詳細な分子反応メカニズムはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、3つのフィンガーを持ち、レドックス応答性といわれているヒト転写因子由来の Sp1ZEP を用い(Fig.1)、各フィンガードメインおよび3フィンガータンパク質と H₂O₂との酸化反応について検討を行った。

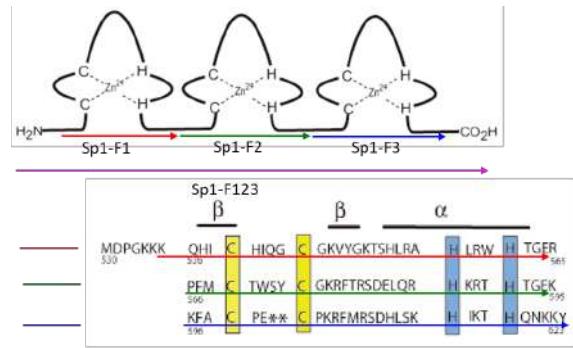


Figure 1. Primary sequence of Sp1 and tandem structure. The zinc coordinating Cys and His residues are boxed. Sp1 contains three finger units (Sp1-F1, F2 and F3) of a classical Cys₂His₂-type zinc finger motif as a DNA-binding domain.

【研究方法】

各フィンガードメインは、Fmoc 固相合成法により島津 PSSM-8 ペプチド合成機にて合成した。H₂O₂による各フィンガードメインの酸化反応性および酸化反応速度の検討を TOF-MASS および HPLC を用いて行った。また Sp1-F123 は大腸菌タンパク質発現系を用いて作成し、DNA 結合能についてゲルシフトアッセイ法により検討を行った。

【結果および考察】

酸化実験の結果、Sp1-F1 ではジスルフィド型酸化体のみ生成し、Sp1-F2 および F3 ではジスルフィド体および Met 残基の S 原子がさらに酸化されたスルホキシ型酸化体が生成した。また、酸化反応後の生成物に対して TCEP 還元反応を行ったところ、Sp1-F2 および F3 では Met 残基の S 原子部分の酸素が外れず不可逆的な酸化反応が起こっていることが明らかとなった。また、反応速度解析から、酸化反応性は Sp1-F1>>F2>F3 となり、酸化反応における各フィンガーの非等価性が認められ、酸化反応が最も早く進行していたのは Sp1-F1 フィンガーであった。この理由として、各フィンガーと Zn(II)との結合定数が、Sp1-F2 および F3 に比べて Sp1-F1 が 100 倍程度小さくなっていることが主たる要因であると考えられる。また、Sp1-F2 および F3においても酸素付加体の生成が逐次反応的に進行している可能性が考えられる。3 フィンガータンパク質である Sp1-F123 の酸化反応では、1 および 2 つのジスルフィド結合を含む酸化体、すべての SH 基が酸化されて 3 つのジスルフィド結合をもち、さらに 1 あるいは 2 つの酸素を Met 残基の部分に有する酸化体が生成することが明らかとなった。酸素付加体の酸化体に対してゲルシフトアッセイを行ったところ、酸化体によって DNA 結合能の回復に違いが見られた。Sp1-F123 の各フィンガードメインでは、同じ Zn(II)への配位構造でありながら酸化反応性は等価ではなく、F1 部分が選択的に酸化されやすく、この部分がレドックスセンサーとして機能していることが示唆された。また Sp1-F123 において、酸化による Met 残基への酸素の付加の数によって、DNA 結合能の回復が異なるという興味深い結果が得られた。

SELEX法による金属置換型Sp1フィンガーの至適DNA結合配列の探索

○松田実紗・奥永望月・水谷茜・杉浦幸雄・根本滋

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:ykd056@dwc.doshisha.ac.jp

【研究目的】

転写因子はゲノム上の特定の配列に特異的に結合する性質をもち、遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしている。転写因子にはDNA結合能を有する特定のドメインが存在しており、例として亜鉛フィンガータンパク質(ZF)がある。ZFはZn(II)に対してCysとHisが正四面体配位することで二次構造である逆平行 β シートと α ヘリックスを誘起し、DNA結合能を得る(Fig. 1)。

今回、Zn(II)をNi(II)およびCo(II)に置換した金属置換型フィンガーのDNA結合能に着目し、構造因子である金属イオンがDNA結合親和性および配列選択性にどのような影響を与えるかを検討するため、ヒト転写因子由来の亜鉛フィンガーであるSp1-F123を用いて、Zn(II)をNi(II)とCo(II)に置換した金属フィンガーを作製し、Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment(SELEX法)及びGibson Assembly法を利用して、各置換体に結合可能なDNA配列の探索を行った。

【研究方法】

10塩基のランダム配列を含むN10 template(5'-CCCAAGCTTAGCTGTGCTA
NNNNNNNNNNAGTTATGGTGTACTAGTC-3')を用いて、SELEX法によりタンパク質に特異的に結合する核酸を選択し、その核酸をGibson Assembly法によりベクターにクローニングし、大腸菌の形質転換を行った。得られたコロニーに対して、DNAシークエンス解析し、至適DNA結合塩基配列を検討した。

【結果および考察】

Zn(II)フィンガーの結果は、1st round、2nd roundでは、特定の配列に収束する傾向は見られないが、3rd roundでは、GCボックス(5'-GGGGCGGGG-3')に徐々に収束する傾向が見られた。

Co(II)置換型フィンガーの結果は、1st round、2nd roundでは、特定の配列に収束する傾向は見られないが、3rd roundでは、GCボックス(5'-GGGGCGGGG-3')に収束する傾向が徐々に見られ、4th roundではほとんどGCボックスにのみ収束した。

Ni(II)置換型フィンガーの結果は、1st roundでは、特定の配列に収束する傾向は見られないが、2nd roundでは、GCボックス(5'-GGGGCGGGG-3')に収束する傾向が徐々に見られ、3rd round、4th roundではほとんどGCボックスにのみ収束した。

以上の結果からZn(II)をNi(II)およびCo(II)に置換した金属フィンガーを用いても野生型GC結合が高いことがSELEX法から明らかとなった。

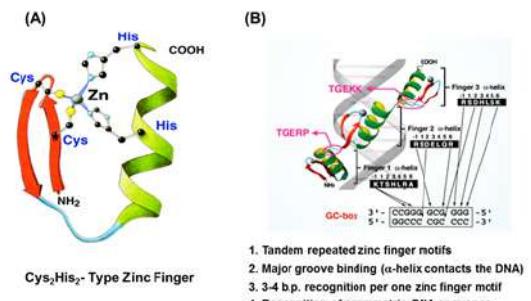


Figure 1. (A) Schematic view of Cys₂His₂-type zinc finger motif displaying the $\beta\beta\alpha$ fold. (B) Putative base recognition mode of Sp1 zinc finger protein.

PARP-1 によるポリ ADP リボシル化反応における $\pi-\pi$ 相互作用の重要性：試験管および細胞核内における反応メカニズムの検討

○太田 志織、照屋 圭、竹川 真央、成松 李恵、
松浦 里奈、間下 雅人、杉浦 幸雄、根木 滋

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:ykf102@dwc.doshisha.ac.jp

【研究目的】

PARP-1 は自己ポリ ADP リボシル化(PAR 化)により DNA の修復、クロマチン構造のコンパクション、DNA 転写反応の調節に関与する。近年、Pascal らにより、PARP-1 と DNA との複合体に対して X 線構造解析がなされ、DNA に結合する際に重要な役割を果たすアミノ酸残基が明らかとなった。そこで、PARP1 の機能や疾患に深くかかわっている WGR 領域に存在する W589 に注目し、PARP-1 WT および疎水性の異なる Ala、Leu および Phe 残基に変異させた点変異体の自己 PAR 化反応を比較することにより、自己 PAR 化反応における $\pi-\pi$ 相互作用や疎水性相互作用の重要性について検討を行った。本研究では、試験管内および細胞核内における PAR 化反応性について比較検討を行った。

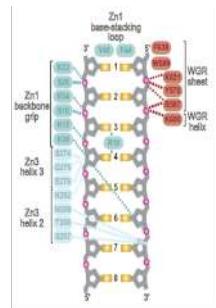


Figure 1. Schematic representation of PARP-1 contacts with DNA (J. M. Pascal, et al. (2012), *Science* 336, 728).

【研究方法】

PARP-1 WT タンパク質発現ベクターの構築、PARP-1WT および点変異体 (W589F, W589L, W589A) タンパク質の発現および精製、さらにこれら 4 つの PARP1 の mCherry 融合タンパク質の作製を行った。ウェスタンブロッティングおよび細胞へのレーザー照射後の蛍光強度により、PARP-1 タンパク質の自己ポリ ADP リボシル化反応について検討を行った。

【結果および考察】

初めに試験管内の実験で自己 PAR 化反応を行った。SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングを用い自己 PAR 化反応の追跡を行った結果、全ての系で反応時間が増加するにつれ ADP リボース(PAR)のバンドが長くなることから、反応時間と PAR 化が進行することが明らかとなった。WT および WT と同じ芳香環のフェニル基側鎖を持つ W589F では、PAR 化が進行するにつれて高分子量の PAR が生成した。一方、脂肪族の疎水性側鎖を持つ W589L および最も疎水性の小さい側鎖 W589A の場合では、高分子量の PAR はほとんど生成されず、PARP-1 タンパク質に低分子の PAR が付加したもののが認められた。この結果から W589 と DNA との相互作用が PAR 化効率に非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。次に Hela 細胞を用いて細胞核内における各 PARP-1 の挙動について検討を行った。DNA に損傷を与えるために 405 nm のレーザーを核に照射し、照射部位における蛍光強度の時間変化から PAR の集積量および結合能を解析した。その結果、集積量の最大値に関しては野生型と変異体において顕著な差は見られなかったが、集積後に DNA から解離する速度に関しては、野生型と比較して変異体の方が速く解離した。また各変異体間の比較では、W589F の解離速度が W589L および W589A よりやや遅いことが明らかとなった。この結果から、DNA 損傷部位への集積量は同程度であるが、DNA からの解離は疎水性が小さくなるにつれて速くなることが明らかとなった。

以上の結果から、未修飾の各 PARP-1 の DNA 結合能は同程度であると予想されるが、PAR 化されることにより PAAR-1 と DNA のリン酸骨格部分との静電反発が大きくなり、結果、芳香環のない、より疎水性の低い W589L および W589A は DNA から解離し PAR 化反応の進行が止まると考えられる。以上のことから DNA 修復タンパク質のフィードバック機構の調整に $\pi-\pi$ 相互作用および疎水性相互作用が非常に重要な役割を果たしていることを示すことができた。

ZIF268 亜鉛フィンガータンパク質の細胞膜透過性：タンパク質表面の二次元カチオン性クラスター構造の重要性

○久木望・北田千江梨・眞鍋貴行・杉浦幸雄・根木滋

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:ykf058@dwc.doshisha.ac.jp

【研究目的】

近年、10 アミノ酸残基程度の細胞膜透過性ペプチド配列を、キャリアとして様々な生理活性物質や機能性物質に付加すると、それらが生理活性を保ったまま細胞内に効率よく導入され、かつ導入された物質が細胞内で機能することを確認した研究が数多く報告されている。代表的な細胞膜透過性ペプチドとして、カチオン性のアミノ酸残基(Arg や Lys)を多く含む塩基性ペプチドが挙げられる。本研究では ZIF268 亜鉛フィンガータンパク質を用い、細胞膜透過実験を行った。種々のフィンガーユニット数を持つ亜鉛フィンガーを作製し(Fig. 1)、導入量にどのように影響を与えるかについて検討を行った。

【研究方法】

大腸菌を用いたタンパク質発現(2F12,2F23、および 3F123)、および Fmoc 固相ペプチド合成法を用いて FD の合成を行った。得られたタンパク質の C 末端に Cy5 蛍光ラベルの導入を行い、HeLa 細胞を用いた亜鉛フィンガータンパク質の細胞内分布の観察、FACS を用いた亜鉛フィンガータンパク質の細胞内移行量の測定を行った。

【結果および考察】

ZIF268において、全てが細胞膜透過能を有しており、それぞれ核周辺にドット状に局在することが明らかとなった。FACS による細胞内移行量は、1F3(+8)>2F23(+9)>3F123(+12)>1F2(+6)>1F1(+3)>2F12(+7)となり(Fig. 2)、F3 を含む方が移行量は大きくなるということがわかった。これまで、ペプチド全体の総電荷数や Arg および Lys のカチオン構成比が膜透過能に主に重要であると考えられていたが、今回の結果は必ずしもこれらに当てはまらない。そこで、この要因を検討する目的で各フィンガードメインの Zn(II)に関与する Cys を Ala に置換した変異体を作製し、2 および 3 次構造形成と膜透過能の関係について検討を行った。その結果、1F3 において 1F3-wt>>1F3-Ala となり大きな差が認められ、1F3-Ala の移行量は 1F1 および 1F2 と同程度になった。1F2 においても僅かな差はあるが 1F2-wt>1F2-Ala となり、野生型の方が移行量は大きくなるということが明らかとなった。この結果から、Zn(II)の配位によるフォールディング構造形成が細胞膜透過能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この要因についてはさらに検討が必要であるが、フォールディングにより形成されるタンパク質表面の二次元カチオン性クラスター構造が細胞膜透過能に重要な役割を果たしていることを示唆する重要な結果と考えられる。

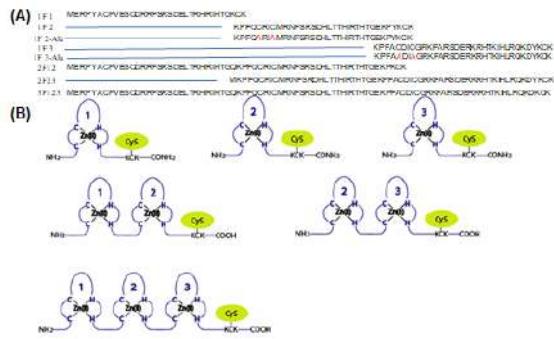


Figure 1. (A) Amino acid sequences of ZIF268KCK1.1F1, 1F2, 1F3, 1F3-Ala, 2F12, 2F23, and 3F123 zinc finger proteins. (B) A schematic representation of Cy5-labeled zinc finger proteins based on ZIF268KCK zinc finger proteins.

フィンガーユニット数の違いや構造の違いが細胞導入量にどのように影響を与えるかについて共焦点顕微鏡やフローサイトメトリーを用いて検討を行った。

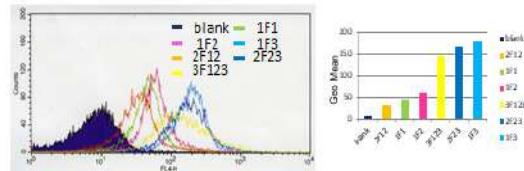


Figure 2. Transduction of Cy5-labeled ZIF268 peptides into HeLa cells assessed by fluorescent-activated cell sorting (FACS) analysis; ZIF268 1F1, 1F2, 1F3, 2F12, 2F23, and 3F123.

Sp1 亜鉛フィンガータンパク質の細胞膜透過性における各フィンガードメインの非等価性およびカチオンクラスターユニットの重要性

○吳原美空・北田千江梨・眞鍋貴行・杉浦幸雄・根本滋

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:snegi@dwc.doshisha.ac.jp

【研究目的】

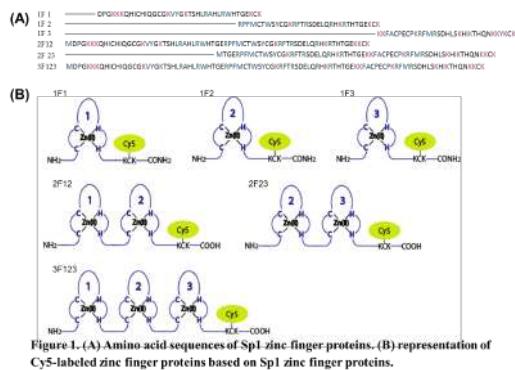
近年、10 アミノ酸残基程度の細胞膜透過性ペプチド配列を、キャリアとして様々な生理活性物質や機能性物質に付加すると、それらが生理活性を保ったまま細胞内に効率よく導入され、かつ導入された物質が細胞内で機能することを確認した研究が数多く報告されている。代表的な細胞膜透過性ペプチドとして、カチオン性のアミノ酸残基(Arg や Lys)を多く含む塩基性ペプチドが挙げられる。本研究では Sp1 亜鉛フィンガータンパク質を用い、細胞膜透過実験を行った。種々のフィンガーユニット数を持つ亜鉛フィンガーを作製し、フィンガー数の違いや構造の違いが細胞導入量にどのように影響を与えるかについて共焦点顕微鏡やフローサイトメトリーを用いて検討を行った。

【研究方法】

2F12,2F23,2F13 および 3F123 は大腸菌タンパク質発現系を、FD は Fmoc 固相ペプチド合成法を用いてそれぞれ合成を行った。得られたタンパク質の C 末端に Cy5 蛍光ラベルの導入を行い、HeLa 細胞を用いた亜鉛フィンガータンパク質の細胞内分布の共焦点顕微鏡による観察、FACS を用いた亜鉛フィンガータンパク質の細胞内移行量の測定を行った。

【結果および考察】

作製した全てのペプチドが細胞膜透過能を有しており、それぞれ核周辺にドット状に局在することが明らかとなった。FACS による細胞内移行量は、3F123 (+17)>2F23 (+11)>1F3 (+9)>2F12 (+11)>1F1 (+7)=1F2 (+6) となった。また、2F13 を作成し 2F 同士で比較を行ったところ 2F23>2F13>2F12 となり、これらの結果から 1F3 および 1F3 を含むペプチドの移行量は大きくなるという事が分かった。正電荷の大きさに移行量が依存しているように見えるが、それを考慮しても 1F3 の移行量が大きいことは説明しがたい。そこで、各 FD 間の膜透過能の違いを調べる目的で、Zn(II)配位に関する 2 つの Cys を Ala に置換した変異体を作製した。その結果 1F1 および 2 では野生型と変異型の間にほとんど差が認められなかつたが、1F3 では変異体において著しく移行量が低下し、それが 1F1 および 2 と同程度になった。もし、電荷数によって移行効率が主として決まるならば変異体においても野生型と同様の傾向が認められると思われる。この結果から 1F3 においては Zn(II)が配位することにより形成されるフォールディング構造が高い膜透過能に非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この理由についてはさらに検討が必要であるが、恐らくフォールディングにより形成される二次元表面のカチオンクラスター構造が透過能に重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。



ペプチド転移酵素 Sortase A : 金属コファクターのペプチド転移酵素反応に及ぼす影響および生細胞表面の部位特異的修飾への影響

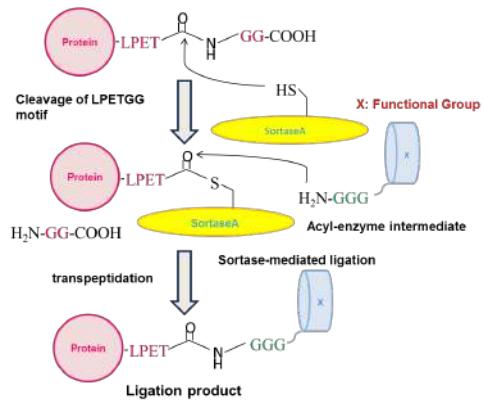
○佐藤綾花・福島玲菜・川添莉穂・清水恭子・根木滋

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:ykf110@dwc.doshisha.ac.jp

【研究目的】

Sortase A は黄色ブドウ球菌由来のペプチド転移酵素であり、5つの特異的アミノ酸配列 LPETG と細胞壁表面のポリグリシンを縮合させ、タンパク質を細胞壁表面に固定化するのに用いられる酵素である。Sortase A は T-G 間のアミド結合を切断し acyl-enzyme 中間体を形成し、そこへポリグリシンのアミノ基による求核攻撃を受け LPET-GGG 結合を形成する。したがって Sortase A は、部位特異的なタンパク質修飾において非常に有用なツールになることが期待できる。そこで本研究では、モデルペプチドを用いた Sortase A およびその変異体の反応性の検討を行った。さらに Sortase A による生細胞表面の化学修飾についても検討を行った。



【研究方法】

反応基質のペプチドは Fmoc 固相合成法により作製した。Sortase A およびその変異体は大腸菌タンパク発現系を用いて作製した。Sortase A の認識配列タグである LPETGG を膜貫通型タンパク質である破骨細胞分化因子(ODF)の C 末端に導入することにより、トランジェントに細胞表面上に LPETG タグを発現させたモデル細胞を作製した。

【結果および考察】

モデルペプチドを用いた反応の経時変化を追跡した結果、反応開始 1 時間で反応が平衡に達し、その収率はおよそ 40 %前後であることが分かり、それ以上反応時間を延長しても収率は向上しなかった。さらに Ca(II)の濃度および温度の検討を行った結果、Ca(II)の至適濃度は 5~10 mM かつ至適温度は 27~37°C であることが分かった。この結果より Sortase A においては幅広い温度域で活性が保持されることが分かった。次に Ca(II)を他の金属イオン(Sr(II), Mg(II), Ni(II), Co(II), Fe(II), Cu(II))に置換し、その効果について検討した。その結果、Sr(II)を除いて著しく反応性が低下し、Cu(II)においては全く反応が進行しなくなることが明らかとなった。X 線構造解析によると Sortase A は 1 つの活性ドメインに対して 1 つの Ca(II)を有しており、今回の実験結果からも分かるように Sortase A の活性には Ca(II)の存在が必須であることが分かった。発表では、金属配位部のアミノ酸変異の反応に対する効果についても報告する。さらに Sortase A による細胞表面の化学修飾においては、Sortase A によって生細胞の膜表面上にモデルペプチドを化学修飾することに成功した。このことから、Sortase A が細胞生物学および細胞工学において有用なツールとなることが考えられる。

P 1 3

オリゴアルギニンによるゲノム DNA の ポリイオンコンプレックス形成挙動：巨視的スケールによる熱力学的および形態観察

○神谷 亜門・杉浦 幸雄・根本 滋

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:snegi@dwc.doshisha.ac.jp

【研究目的】

近年、塩基性アミノ酸残基が7つ以上含まれているHIV-1 Tat(48-60)やオクタアルギニンなどが細胞内に薬物やタンパク質を輸送するキャリアーとして用いられている。これまでにカチオン性物質とDNAとの凝集体形成に関する研究が多くなされているが、未だにその凝集メカニズム等については明確に解明されておらず、未解明な点が多く残されている。本研究では、塩基性アミノ酸であるアルギニン(R)のみで構成されるオリゴアルギニン(R_n : $n=4,5,6,7,8,12,16$)およびゲノムDNAとしてウシ胸腺DNA(CT DNA)を用いた。それらの凝集体形成について巨視的なスケールの下、物理化学的手法により検討を行った。

【研究方法】

R_n をFmoc固相合成法により島津PSSM-8ペプチド合成機を用いて合成し、CT DNAとの相互作用について、様々な物理化学的手法(等温滴定型熱量測定(Isothermal Titration Calorimetry: ITC), 動的光散乱法(Dynamic Light Scattering: DLS), 原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope: AFM))を用いて検討を行った。

【結果および考察】

ITC測定により R_4 を除くすべての R_n において、最初、一定の発熱ピークが認められ、ある点で急激な発熱ピークが生じ、その後反応が終結する現象が観察された(Fig. 2)。DLSでは、 R_n /CT DNA複合体のうち、 R_4 においてより大きな複合体を形成していることが分かった。AFM観察では、 R_4 /CT DNAでは大きな会合体が形成されているのに対し、 R_8 および R_{16} /CT DNAではコンパクトで規則的な球形粒子が形成されていることがわかった。また、その凝集過程が大きく異なることも明らかとなった。以上の結果よりCT DNAとの凝集体形成は単に静電的な相互作用だけでなく、 R_n の鎖長に大きく依存することが明らかとなった。

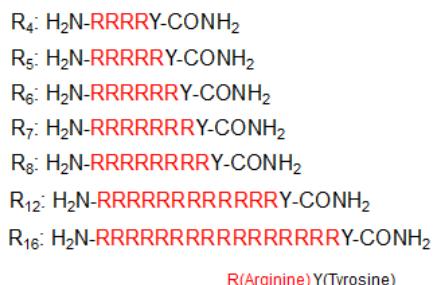


Figure 1. Primary sequence of oligoarginines.

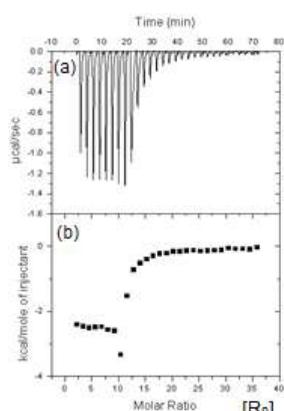


Figure 2.(a) ITC data for of DNA (1.6 mM) with R_n (0.01 mM) in water (pH 7.0) at 25 °C.
 (b) Binding isotherm by plotting of integrated peak from titrations against molar ratio.

P 1 4

酸化型 GAGA 亜鉛フィンガータンパク質の モノチオール化合物による還元反応における金属イオンの効果

○橋本 梨奈、大北 佳奈、杉浦 幸雄、根木 滋

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address: ykg010@dwc.doshisha.ac.jp

【研究背景】

亜鉛フィンガータンパク質(ZFP)は転写因子に見られるDNA結合モチーフの一つである。最近、Zn(II)結合に関与しているCys残基のチオール基が、生体内で可逆的あるいは不可逆的なレドックス反応に関与していることが言わされている。本研究ではキイロショウジョウバエ転写因子由来のGAGA亜鉛フィンガーの酸化体を用いて、種々のモノチオール還元剤(グルタチオン(GSH)、N-アセチル-L-システイン(NAC)、N-アセチル-D-ペニシラミン(NAP)、L-システイン(Cys))を用いた還元反応におけるコファクターである金属イオンの効果について検討を行った。

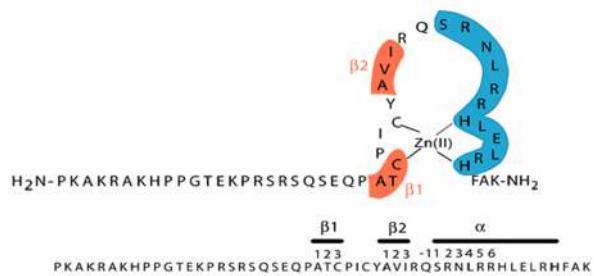


Figure 1. Amino acid sequence of GAGA zinc finger.

【研究方法】

還元型GAGAは、Fmoc固相合成法により島津PSSM-8ペプチド自動合成機にて作製し、酸化型GAGA-wtは、還元型GAGAを酸化剤であるジアミド(*N,N*-dimethyl formamide)と2時間酸化反応させることにより作製した。酸化型GAGAに、各金属イオン(Zn(II), Co(II)およびNi(II))、各還元剤を添加してスターラー上で攪拌し、所定の時間(0, 5, 10, 20, 30, 60, 90および120 min)でサンプリングを行い、還元反応の経時的変化を追跡した。

【結果および考察】

GSHの場合は、Zn(II)およびNi(II)ではアポ体に比べて還元反応の進行度が大きくなかった。また、Zn(II)およびNi(II)の反応性はほぼ同程度で、Zn(II)の場合のみGSH付加体の生成が認められた。一方、Co(II)ではアポ体と同程度の反応進行しか認められず、Co(II)添加の効果が認められなかった。次にNACの場合は、還元反応の進行度はZn(II)>Co(II)の順になり、いずれの場合も還元体およびNACのモノおよびジ付加体の生成が認められた。それに対しNi(II)ではアポ体と同程度の進行しか認められず、Ni(II)の効果が認められなかった。NAPの場合は、全ての金属イオンにおいてアポ体と反応の進行が同程度であり、ほとんど金属効果の影響が認められないことが分かった。さらにNAPの場合、還元体は全く生成されないという結果が得られた。Cysの場合、Zn(II)では還元反応が進行したのに対し、アポ体、Ni(II)およびCo(II)においては再酸化反応がみられた。特にNi(II)およびCo(II)ではほとんど還元反応が進まないことから、Ni(II)およびCo(II)の添加により還元反応は抑制されると考えられる。以上の結果より、酸化型GAGA-wtとチオール系還元剤の還元反応において、同じモノチオール系還元剤においても、僅かな構造の違いによりその反応性が大きく異なり、さらにコファクターである金属イオンが反応性に大きく影響を与えることが明らかとなった。

GAGA 金属置換型フィンガータンパク質の作製及びその構造・機能評価

南 奈緒, 塩路 未来, 増山 紗永子, 杉浦 幸雄, 根木 滋

同志社女子大学薬学部・医療薬学科

E-mail address:ykf072@dwc.doshisha.ac.jp

【背景】

真核生物の転写因子に見られるDNA結合モチーフの1つである亜鉛フィンガータンパク質は、多くの場合、二つのシステイン(C)残基と二つのヒスチジン(H)残基が含んでおり、それらが1つのZn(II)に配位することで $\beta\beta\alpha$ 構造誘起が生じ、1つのドメインが形成される(Fig. 1)。通常このドメインが2~3個タандемに連なることで、DNA結合能が付与されることが知られている。

【目的】

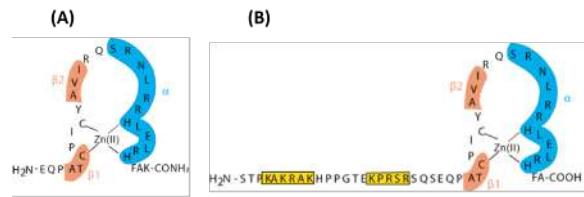
本研究では、GAGA 金属置換型フィンガータンパク質の構造および機能を調べる目的で、野生型であるGAGA(CCHH)のフィンガードメイン部分であるGAGA30、ベーシック領域を加えたGAGA52を作製した。それらと各々の金属との金属結合能、二次構造誘起、さらにDNA結合能について検討を行った。

【方法】

GAGA30(CCHH)とGAGA52(CCHH)をFmoc固相合成法により島津PSSM-8ペプチド合成機を用いて合成し、円偏光二色性(CD)測定、紫外可視吸光度(UV)測定による構造解析の検討を行った。また、ゲルシフト法によりDNA結合能の検討を行い、さらにSELEX法により各ラウンドのDNA結合能の検討も行った。

【結果および考察】

CDおよびUVスペクトル測定により、Zn(II)、Co(II)、Ni(II)およびCu(I)をそれぞれ添加し、二次構造誘起能および金属配位構造を検討した。CDスペクトル測定では、Zn(II)、Co(II)、Ni(II)およびCu(I)すべてに二次構造誘起がみられた。さらにUVスペクトル測定では、Zn(II)はd¹⁰構造なので、Zn(II)以外の金属で検討を行った。その結果、Co(II)添加時には、320および650 nm附近に、Ni(II)添加時には、305および400 nm附近に、Cu(I)添加時には、263 nm附近にそれぞれ吸収帯が認められた。このことから、Co(II)、Ni(II)およびCu(I)はGAGA30(CCHH)に配位していることが明らかとなった。さらに、Zn(II)、Co(II)、Ni(II)についてはCD滴定より配位結合定数を求めた。その結果、Zn(II)>Co(II)>>Ni(II)の順(結合定数: $K_{a\text{ Zn(II)}}=1.48 \times 10^{15}$, $K_{a\text{ Co(II)}}=1.08 \times 10^9$, $K_{a\text{ Ni(II)}}=1.99 \times 10^5$)となった。また、ゲルシフト法によりDNA結合について検討を行ったところ、Co(II)の場合では、Zn(II)とほぼ同程度のDNA結合がみられ、Ni(II)ではZn(II)に比べて弱いながらもDNA結合が認められた。一方、Cu(I)添加時ではシフトバンドが全く認められず、DNA結合能がCu(I)により消失することが分かった。Cu(I)はGAGA52と配位結合を形成し、野生型と類似した二次構造を形成するにも関わらずDNA結合することができなかった。次に金属置換に伴う最適DNA結合配列の探索をゲルシフト法に基づくSELEX法により行った。Cu(I)はコントロール実験ができないことから、Zn(II)、Co(II)、Ni(II)に対してSELEX法を行った。その結果、いずれの場合もラウンドを繰り返し行うと野生型の最適配列であるGAGAG配列に結合することが明らかとなり、金属置換により結合配列の選択性が変化しないことが明らかとなった。



P 1 6

亜鉛輸送体の金属基質認識機構に関する解析

西藤有希奈、神戸大朋

京都大学大学院生命科学研究科

E-mail address: nishito.yukina.36c@st.kyoto-u.ac.jp

【緒言】微量元素は生体内において、酵素活性の調節やタンパク質の構造維持など多岐に渡る機能を担っており、これら金属のホメオスタシス維持においては、複数の金属輸送体が重要な役割を果たしている。近年、幾つかの亜鉛輸送体が亜鉛のみならずマンガンの輸送に関わることが示され、金属輸送体が複数の金属基質の輸送に関わる可能性が示されている。しかしながら、これら輸送体がどの様に金属基質を選別しているかについて詳細な解析は行われていない。そこで本研究では、近年マンガン代謝に寄与することが示されている亜鉛輸送体 ZNT10 に着目し、ZNT10 のマンガン輸送機構について、他の ZNT 輸送体との金属基質認識機構の違いに着目し解析を行った。

【実験】相同組換え効率が高く遺伝子破壊と再発現が容易なニワトリ B リンパ球系細胞株 DT40 細胞において、ゴルジ体へマンガンを輸送するとされる Spca1 を欠損させたマンガン高感受性株 Δ Spca1 株 ($Spca1^{-/-}$)、および、細胞質の過剰な亜鉛を減少させる機能を持つ Znt1、Metallothionein (Mt)、Znt4 を欠損させた亜鉛高感受性株 Δ 1M4 株 ($ZnT1^{-/-} Mt^{-/-} ZnT4^{-/-}$)を作成し、輸送体の金属輸送能を評価した。

【結果と考察】 Δ Spca1 株を用いた解析により、ZNT10 が亜鉛輸送に関与せず、マンガン選択性的な輸送を行う可能性が示された。この ZNT10 によるマンガン選択性的輸送機構について、亜鉛選択性的輸送を行う ZNT1 とのドメイン置換変異体を作成し解析を行った。その結果、ZNT10 の膜貫通領域内に存在する 43 番目の Asn 残基が ZNT10 のマンガン輸送能に最も重要な残基であることを明らかにした。さらに、ZNT10 の膜貫通領域内に存在する 52 番目の Cys 残基と 242 番目の Leu 残基が ZNT10 の亜鉛輸送能を抑制することにより、ZNT10 のマンガン選択性的輸送が可能となっていることを見出した。また興味深いことに、ZNT1 の 43 番目の His 残基を Asn 残基に変えるだけで、亜鉛選択性的輸送を行う ZnT1 にマンガン輸送能が付与された。以上の解析結果から、ZNT10 のマンガン選択性的輸送の分子メカニズムのみならず、ZNT 輸送体の金属認識機構についてその一端を明らかにすることができた。

マルチブロック型ペプチド/ビニルポリマー・ハイブリッド の新規合成法の開発

○古賀 智之・西村 慎之介・東 信行
(同志社大学 理工学部 機能分子・生命化学科)
E-mail address: tkoga@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】汎用合成高分子に人工ペプチドを組み込んだペプチド/ポリマー・ハイブリッドは、合成高分子の力学特性とペプチドに基づく機能を併せもつ優れた高分子材料となる。マルチブロック型のハイブリッドポリマーは、単純なジブロックやトリブロック型と異なり、その特徴的な構造に起因する興味深い物性を示す。本研究では、ニトロキシド介在重合(NMP)開始部位を有する様々な配列の環状ペプチドを新規に設計・合成し、これらを用いたマルチブロック型ペプチド/ビニルポリマー・ハイブリッドの一段階的合成法を開発した(Fig. 1)。

【結果及び考察】各種環状ペプチド NMP 開始剤は Fmoc 固相合成法を用いて合成した。まず、環状(*Leu*)₄開始剤を用いてスチレンの重合を DMF 中 110 °C で 36 時間行った。SEC 測定により分子量と多分散度を評価したところ、单一のピークが得られ、 $M_n = 9600$, $M_p = 14500$, $D = 2.08$ であることがわかった。フラグメント化を行うため、このポリマーを大過剰の TEMPO 存在下 110 °C で 12 時間加熱した。加熱後にポリマーを単離し、SEC 測定を行ったところ、ピークが低分子量側にシフトし、 $M_n = 3100$, $M_p = 3300$, $D = 1.15$ であることがわかった。これらの結果より、得られたハイブリッドポリマーは Fig. 1 に示すようなペプチド-*b*-ビニルポリマーを基本単位とした繰り返し数 3~4 のマルチブロック構造を有することがわかった。また、重合時間を様々なに変化させて同様の実験を行ったところ、モノマー転化率を変化させることで、マルチブロック構造を保ったままポリスチレン鎖長を任意に制御できる($D < 1.3$)こともわかった。ペプチドブロックのアミノ酸配列は様々なに変えることができ、スチレン以外にも 4-ビニルピリジンおよび *p*-クロロスチレンの単独重合、スチレン/アクリロニトリルの共重合が可能であることがわかった。

このように、様々なペプチドとビニルポリマーからなるマルチブロック型ペプチド/ビニルポリマー・ハイブリッドの新しい一段階的合成法の開発に成功した。

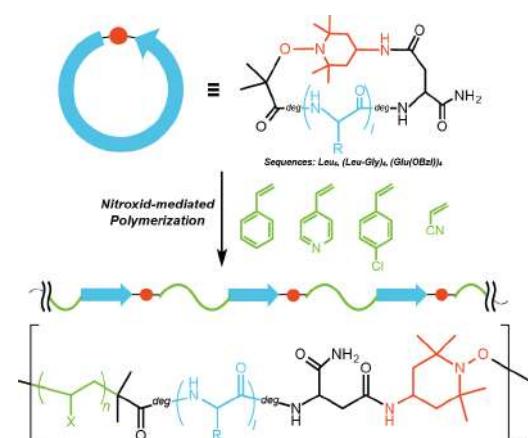


Fig. 1 Conceptual scheme for the one-step synthesis of multiblock peptide-vinyl polymer hybrids by NMP.

P18

pH振動反応と走化性微小油滴による自律運動システムの構築

岡本 泰直, 佐々木 陽子, 名和 愛利香, 山本 大吾, 塩井 章久

同志社大学理工学部理工学研究科

E-mail address: ashioi@mail.doshisha.ac.jp

pH振動反応は、私たちの生体内ではDNAがシート構造からランダムコイル構造に構造変化するときに使われている。また、pH応答性ポリマーと組み合わせることにより、人口筋肉の駆動力や薬物輸送への応用が考えられる。このためには、“動き続ける”という観点から持続的な振動が不可欠であるが、これまでに報告されている振幅が大きなpH振動反応は、回分系では一度しか発振しないものが多い。本研究では、振幅が大きいものの、回分系では1回しか振動しないpH振動反応であるMethylene Glycol-Sulfite-Gluconolactane (MGSG)反応と、pHに応答した界面張力の変化により自走するオレイン酸の油滴を組み合わせることで、pH振動反応を用いた油滴の持続的な自律運動の実現とそのメカニズムの解明を目指している。

Fig. 1に示すように、円柱形の寒天ゲルをペトリ皿の中心に設置し、この周囲に振動反応溶液を流しこみ、振動反応液上にオレイン酸油滴を置いた。寒天ゲルにはpH上昇反応を起こす亜硫酸ナトリウムを含有させた。油滴を寒天ゲルに付着させると油滴は寒天ゲルの周りを持続的に運動した。運動中の油滴の内部対流を炭素粉末によって可視化し観察すると、一対のロール状の対流が発生しており、この対流が、対称な場合、油滴は運動しなかった。一方で、Fig. 2に示すように、対称性が破れて、一方の対流が大きくなると大きい対流側へ油滴が移動していた。すなわち油滴はこの内部対流によって運動すると考えられる。

系の簡略化とよりバイオミメティックな系の構築のために、同様の寒天ゲル状に超純水を敷き、振動反応液をエマルションとして封入したオレイン酸油滴を超純水上に置くと、このW/Oエマルションはランダムな運動を示した。

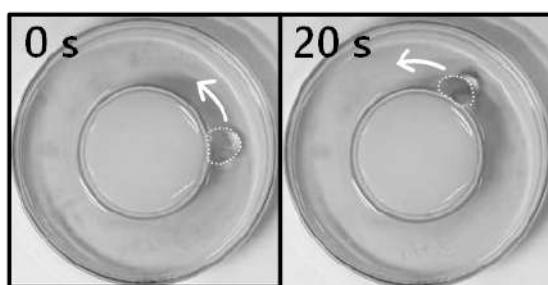


Fig.1 寒天ゲルの周りを
運動するオレイン酸油滴

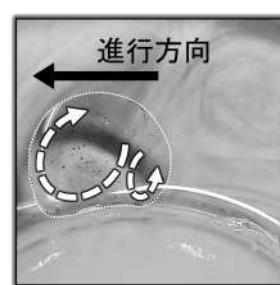


Fig.2 内部対流の対称
性の破れと運動方向

大腸菌組成をもつリン脂質ベシクルへのイオン液体の分配

仁保早紀子・鈴木ひかる・松本道明

同志社大学理工学部化学システム創成工学科

mmatsumo@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】イオン液体が環境中に放出された後の生物蓄積、生態学的影響は十分に解明されていないが、中でも大腸菌はイオン液体中で失活することが知られている。そこで本研究では、イオン液体のベシクルへの分配機構を解明することを目的とし、大腸菌生体膜に含まれるリン脂質 PE(phosphatidylethanolamine)と PG(phosphatidylglycerol)を含む DPPE/DPPG リン脂質混合ベシクルを用いて、イオン液体のリン脂質ベシクル/水溶液系の分配係数 ($\log P_{M/S}$) を測定した。また DSC を用いたイオン液体によるベシクルの相転移温度の変化についてはポスターで説明する。

【結果及び考察】

DPPE/DPPG 混合比 4:1, 3:2, 1:1 ベシクルの様々なイオン液体における $\log P_{M/S}$ の測定結果を Table 1 に示した。アニオンを固定すると、4:1 のベシクルではカチオンのアルキル鎖が長いほど $\log P_{M/S}$ が小さくなる傾向があった。これは、アルキル鎖による立体障害のために分配量が減少したと考えられる。また、4:1 の組成比をもつベシクルについて [Bmim][BF₄] と [Bmim][PF₆], [Hmim][BF₄] と [Hmim][PF₆] の分配係数を比較すると明確な対応関係がなかったことから、カチオンだけでなくアニオンもベシクルに分配されていると考えられる。3:2, 1:1 の組成比のベシクルへの分配係数について、[BF₄] アニオンを持つイオン液体は 4:1 の組成比のベシクルのような傾向はみられなかった。これは、PE/PG のヘッドグループ間の相互作用がアニオン、カチオンの分配に影響を与えたためと考えられる。

Table 1 $\log P_{M/S}$ of ionic liquids

IL	ベシクル混合比(DPPE:DPPG)		
	4: 1	3: 2	1: 1
[Emim][BF ₄]	2.49	2.38	2.44
[Bmim][BF ₄]	2.42	2.51	2.06
[Hmim][BF ₄]	2.45	2.34	2.38
[Omim][BF ₄]	2.33	2.41	-
[Bmim][PF ₆]	2.47	2.36	2.37
[Hmim][PF ₆]	2.41	2.32	2.25

P20

水和イオン液体中のPYPの光反応ダイナミクス

木村佳文・小野寺香奈・水谷浩人・八坂能郎・遠藤太佳嗣

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

E-mail to: yokimura@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】ある種のイオン液体は、通常の緩衝溶液よりもタンパク質を安定に保存できることが知られており[1]、生体分子の機能を解明する上で非常に興味深い現象である。しかしながら、このようなイオン液体中のタンパク質の溶存状態が、通常の緩衝溶液とどのように違うのかについての理解は進んでいない。本研究では Photoactive Yellow Protein(PYP)の光サイクル反応(Fig. 1)を題材に、反応速度定数や拡散係数などの値から溶存状態の違いについて検討を行った。PYP は植物の走行性をつかさどるタンパク質で Fig.1 のような光サイクル反応を示し、pB 状態がシグナリング状態であるといわれている。本実験では、PYP をコリニウムカチオンとリン酸二水素アニオンからなるイオン液体(choline dihydrogen phosphate, [ch][dhp])を 50 wt%含む溶液に溶解し、その溶存状態や光反応過程を CD 分光法、過渡吸収分光法、および過渡回折格子分光法により測定した。

【結果と考察】CD 測定の結果、50wt%の[ch][dhp]溶液中では PYP の pG 状態は通常の緩衝溶液と同じような 3 次構造を保っていることが推測された。この溶液の過渡吸収を測定したところ、pR→pB への反応時定数が 25μs 程度となり、水溶液よりも早い反応速度をしめすことが分かった。また pB→pG への戻り反応は 20 ms と 4s の二つの時定数で変化することが分かった。さらに、過渡回折格子法による測定から、通常の水溶液では生じていた pB 状態における末端ヘリックス構造の崩壊が観測されていないことが期待される結果が得られ、イオン液体中ではタンパク質の揺らぎが抑えられていることが示唆された。

【謝辞】PYP は京都大学の寺嶋正秀教授、中曾根祐介助教、金穂香氏によって提供していただいたものを用いた。ここに謝意を表する。

【文献】[1]K. Fujita and H. Ohno, *Biopolymers*, **93**, 1093-1099 (2010).

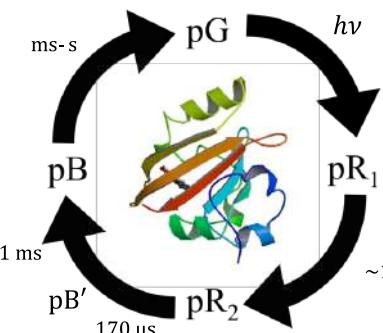


Fig.1. Photocycle of PYP.

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
2017年度 成果報告会

プロトン性イオン液体中の特異なプロトン移動過程

藤井香里*、八坂能郎**、遠藤太佳嗣**、木村佳文*,**

同志社大学院理工学研究科*、同志社大学理工学部 機能分子生命化学科**

cyjc1701@mail4.doshisha.ac.jp

数多くの化学反応の中でも、プロトン移動(PT)反応は生体内でも進行する最も基本的な素反応のひとつであり、様々な溶媒環境の中でPT反応がどのようなふるまいをするのかということは非常に興味深い。我々は、構造不均一性を有するとして近年盛んに研究が行われているイオン液体の中でも、プロトン性イオン液体(PILs)に着目し、PILs中における溶質分子のPT反応を題材に研究を進めてきた。PILsは酸と塩基の中和反応から合成され、カチオンに解離可能なプロトンをもつものを指す。PILs自身がプロトン受容体、供与体となりうるため、一般的な水溶液中とは異なる複雑な溶質-溶媒間PT反応ダイナミクスが期待できる。

本研究では、溶媒にアニオンの異なる3種の PILs ($[N_{222}H][CF_3SO_3]$ 、 $[N_{222}H][CH_3SO_3]$ 、 $[N_{222}H][CF_3COO]$)を用い、これら の溶液中におけるシアノナフトールのPTダイナミクスに着目した。シアノナフトールは代表的なPhotoacidであり、ここでは5シアノ-2-ナフトール($5CN2$ 、 $pK_a^*:-0.75$)と5,8-ジシアノ-2-ナフトール($DCN2$ 、 $pK_a^*:-4.5$)を用いた(pK_a^* は励起状態における酸解離定数)。Photoacidは励起状態において酸解離度が上昇するため、蛍光スペクトルには主に分子構造を反映した2つのバンドが現れる(Fig. 1参照)。そこで種々の PILs中におけるシアノナフトールの時間分解蛍光スペクトルを測定することで、励起状態におけるPT反応ダイナミクス(ESPT)が PILsのアニオンの種類によってどのように変化するか評価した。

$5CN2$ では $[N_{222}H][CF_3COO]$ 中で、 $DCN2$ は $[N_{222}H][CH_3SO_3]$ 、 $[N_{222}H][CF_3COO]$ 中で ROH^* 体、 RO^-* 体とは異なる蛍光バンド(Y^-* 体)が観測された。

Y^-* 体は水溶液中での研究では報告例なく、イオン液体に特有の反応中間体を反映していると考えられる。時間分解蛍光スペクトルの詳細な解析の結果、 Y^-* 体は PILsのアニオンが溶質分子から直接プロトンを受けることによって生成した RO^-* 体とアニオンの共役酸との間のコンプレックスであると結論づけた[1]。(Fig. 2 参照)

[1] J. Phys. Chem. B 2017, 121, 6042–6049

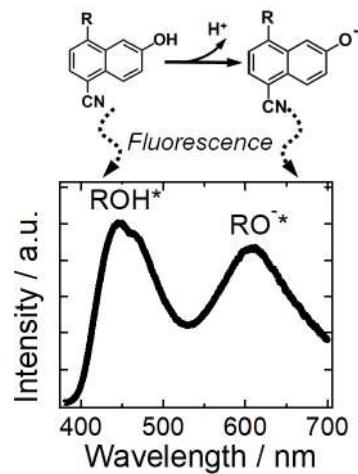


Fig. 1 Reaction scheme and fluorescence spectrum of cyanonaphthol. (R= H: $5CN2$, R= CN: $DCN2$)

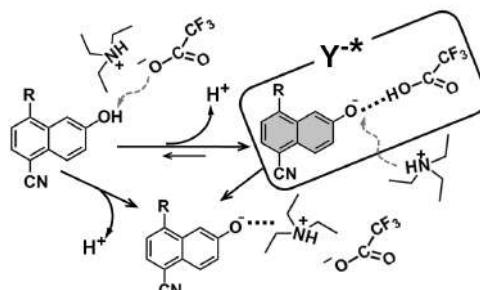


Fig. 2 ESPT scheme.

イオン液体に高濃度に溶解したセルロースの自己組織化現象

遠藤太佳嗣¹、細見昭太²、藤井俊輔²、仁宮一章³、木村佳文¹、高橋憲司²

同志社大理工¹、金大理工²、金大新学術³

E-mail address: taendo@mail.doshisha.ac.jp

セルロースは植物細胞壁の主成分である。地球上に最も豊富に存在する生体高分子であり、その高度利用は持続可能な社会の実現において急務である。最大の障壁は、セルロースの高い難溶性であるが、近年イオン液体と呼ばれる、室温付近で液体状態の塩のいくつかが、高濃度にセルロースを溶解させることが明らかになった。溶解メカニズムを明らかにするためには、その溶存状態の解明が必要となる。本研究では、これまで全く注意が払われていなかった、高濃度領域に注目し、その溶存状態を明らかにすることを目的とした。

セルロース溶解型イオン液体として最も代表的な 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate を用いて、微結晶性セルロース (Avicel PH-101) を様々な濃度で混合し、その溶存状態を X 線散乱法によって観察した。また、量子化学計算プログラム Gaussian09 を用いて、分子レベルの理解を深めた。

5 mol%からセルロース濃度を上げていくと、X 線散乱パターンの小角部に、セルロースにもイオン液体にもない、新しいピークが立ち上がった。更に 35 mol%を超えると、2 つのピークの出現が確認された。量子化学計算の結果と併せて、この新しい周期構造は、Figure 1 に示すような構造であることが強く示唆された。即ち、アニオンがセルロース鎖の間に入り込むことでセルロースの水酸基を水素結合で繋いで（アニオン架橋）シート状の構造を形成し、それがカチオンを介した疎水性相互作用により積み重なった層状構造である。これは、高濃度状態でのみ発現する構造である。

アニオンを変えて同様の実験を行った所、高濃度領域で acetate と同様、新しい周期構造が見られた。しかし、周期長は、アニオンの大きさに反比例しており、アニオンによって固有の構造・相互作用が存在することが明らかになった。

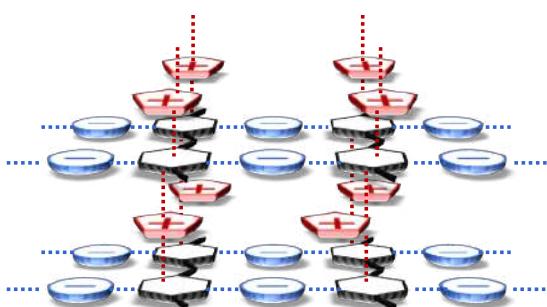


Figure 1. Schematic of the structure for cellulose/ionic liquid at high concentrations.

P 2 3

レーザ照射によるミクロ粒子の自律的動的パターンの生成

長谷川よし乃, 妹尾駿佑, 田中智子, 劍持貴弘, 貞包浩一郎, 吉川研一

同志社大学大学院生命医科学研究科生命物理科学研究所

E-mail address: yoshinohasegawa.doshisha@gmail.com

【緒言】本研究において、グラファイト粒子を拡散させたエタノール溶液にレーザ照射した際のグラファイト粒子の振る舞いを調べた結果、溶液表面及び内部において波状の周期的な自律的動的パターンが生じることが新たに見出された。

【実験方法】異なる濃度のエタノール水溶液を入れたガラスケースにグラファイト粒子を拡散させ、水平方向からレーザ(波長 532[nm])を照射させた。ビデオカメラやデジタルマイクロスコープ等を用いて水平方向及び上方向から録画し、ImageJ を用いて観察結果を解析した。

【実験結果と考察】第 1 に、ビデオカメラによる観察では、レーザを照射することによりグラファイト粒子の一方向流れが cm スケールで生成できることが確認された。録画地点でのレーザ照射後の定常流れの平均流速は、本実験条件下ではレーザ照射位置の上部の方が下部と比べて約 2 倍速くなることが明らかになった。第 2 に、デジタルマイクロスコープによる観察では、エタノールが含まれる水溶液中では、グラファイト粒子が一定間隔の波状の粗密パターンを形成しており、純水では形成されていないことが新しく見出された(Fig. 1)。また、この疎密パターンの形成や様態の変化にはエタノール濃度が関係することが明らかになった。以上 2 種の観察において生じた流れは、グラファイト粒子がレーザを吸光することでエタノール水溶液の温度を上昇させ、レーザ照射位置からの距離に応じた温度上昇程度の偏りにより表面張力差が生じたことが起因となったと考えられる。本研究を更に進めることで、レーザを用いた複数粒子を非接触で配列させるといった操作技術の構築に繋がることが期待される。

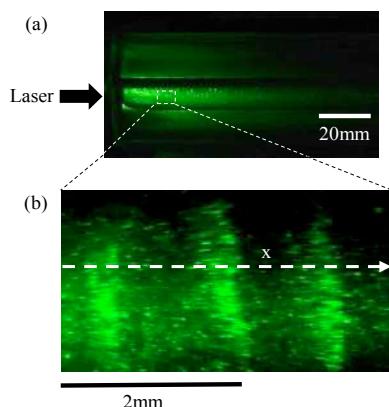


Fig. 1 (a) Bird view of graphite solution. (b) Enlarge view by microscope.

音に内在する時間反転対称性の破れの評価 - 楽器の音色の解析 -

矢鳴 洋思, 馬場 ひかり, 鷹取 慧, 剣持 貴弘, 吉川 研一

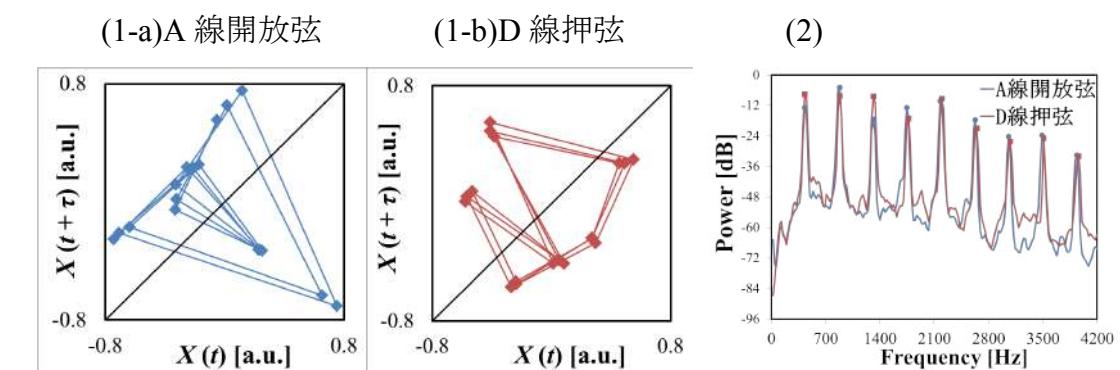
同志社大学大学院 生命医科学研究科 生命物理科学研究室

E-mail address: ctuc0054@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】 音に関する研究ではパワースペクトルが重視されているが、一方で、ヒトの聴覚が単に周波数成分だけを音の情報として信号化しているわけではないことも明らかとされている。音の時間領域の信号はそれ自体、乱雑で無秩序なことが多いが、ある程度の時間間隔で離散的に信号の推移をたどると、時間軸に沿った歪みが顕著に現れることがある。本研究では、これを時間反転対称性の破れと定義し、新たな視点と手法による音色の評価を試みた。

【実験】 バイオリンの A 線開放弦, D 線押弦によって鳴らした 440 Hz の高さ A の音の音色の違いを、いくつかの時間間隔 τ に対する時間反転対称性の破れの情報により評価した。解析にあたり、音圧を $X(t)$ として、音の時間波形を time delay map ($X(t + \tau) - X(t)$ グラフ) に変換する。直線 $X(t + \tau) = X(t)$ の上側領域と下側領域におけるデータ点の数の偏りが、時間反転対称性の破れの尺度となる。

【結果と考察】 あらゆる時間間隔 τ に対し、A 線開放弦と D 線押弦では破れ量（時間反転対称性の破れの度合い）に差が見られた。特に、 $\tau = T/6$ のときには差が大きく、両者の time delay map は図 1-a、図 1-b に示す通りである。一方で図 2 に示すパワースペクトルでは、A 線と D 線で明瞭な差は見られない。本研究により、音色の本質はパワースペクトルでは失われている音の時間的変化のなかにあり、時間反転対称性の破れが深く関係していることが示唆された。



(1)Time delay map of (a) A string, (b)D string and (2)Result of FFT

P25

拮抗的な塩は水中でどれだけ界面活性剤のように振舞うか

土合恭平, 貞包浩一朗
同志社大学生命医科学研究科
E-mail address: kfkf11111@gmail.com

水/有機溶媒/界面活性剤系で様々な秩序構造が形成されるのは、1つの分子の中に水に馴染む部分（親水基）と油に馴染む部分（疎水基）を持つと言う界面活性剤分子の性質（両親媒性）に理由がある。界面活性剤分子は水と油の界面張力が下げるため、界面活性剤を加えることにより水と油が混ざるようになる。

一方、我々は、水/有機溶媒混合系に「拮抗的な塩」（親水性と疎水性のイオンを併せ持つ塩）NaBPh₄を加えることで、溶媒の相溶性が大きくなること、ラメラ構造のような秩序が誘起されることなど、油水混合系に対する界面活性剤に近い現象が生じることを発見している^[1]。すなわち、Na⁺およびBPh₄⁻は、水/有機溶媒混合系において界面活性剤の特徴を有する。このことから、Na⁺およびBPh₄⁻も有機溶媒の非存在下で、水中で界面活性剤のような挙動をすることが予想される。この仮説を検証するために水/NaBPh₄混合物の表面およびバルク構造を調べた。

Figure1 は水/NaBPh₄系の表面張力測定の結果である。300mMよりも高濃度でNaBPh₄を溶解させても表面張力がほとんど変化しないため、300mM付近に臨界ミセル濃度が存在すると示唆される。更に中性子反射率測定により、溶液の表面構造を調べたところ、拮抗的な塩は界面活性剤のように表面に凝集することが分かった。一方、小角中性子散乱と導電率測定の結果からは、300mM以上のNaBPh₄を加えた条件においても、ミセルの形成は確認できなかった。以上により、拮抗的な塩は界面活性剤に近い性質を示しながらも、水中で完全に同じ挙動を示すわけではないことが明らかになった。

[1] K. Sadakane, et al., *Phys. Rev. Lett.*, **103**, 167803 (2009).

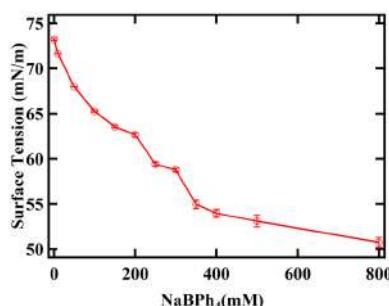


Fig.1 The effect of NaBPh₄ on the surface tension of water.

塩に対する多重小胞膜溶液の反応

中嶋一真, 貞包浩一朗

同志社大学大学院生命医科学研究科・生命物理科学研究所

E-mail address: ctuc0028@mail4.doshisha.ac.jp

我々はこれまでに、有機溶媒水溶液に「拮抗的な塩」（親水性のイオンと疎水性のイオンを合わせ持つ塩）を加えた系では、秩序性の高いメゾ構造（1nm～10μmスケールの階層構造）が自発的に形成されることを発見した。例えば、水と3-methylpyridine(3MP)の混合溶液にNaBPh₄(Na⁺:親水性、BPh₄⁻:疎水性)を加えた混合溶液では、厚さ1nmスケールの膜が形成され、それが10nmスケールの間隔で積層することで、多重膜小胞体構造が形成される。⁽¹⁾

ここで、これらの溶液に更に「別の物質」を加えても、秩序構造の安定性が保たれるのであれば、応用面でも利用の可能性が広がる。そこで本研究では、H₂O/3MP/NaBPh₄の混合溶液にNaBPh₄に対して逆の性質を持つPPh₄Cl(PPh₄⁺:疎水性、Cl⁻:親水性)という塩を加えることで、多重膜小胞体構造が受ける影響を検証した。図1(a)で示した中性子小角散乱の結果から、PPh₄Clの添加により従来の膜構造が壊れ、サブミクロンスケールでの構造の発達が示唆された。また図1(b)からPPh₄Clの添加によって、有機溶媒(3MP)の半値幅が狭まることから膜の揺らぎが大きくなり、膜構造が崩れていくことが示された。以上からPPh₄Clの添加によりイオンと液相間のイオン電荷のバランスが変化し、有機溶媒相の形成する膜構造が崩壊していく事が示された。

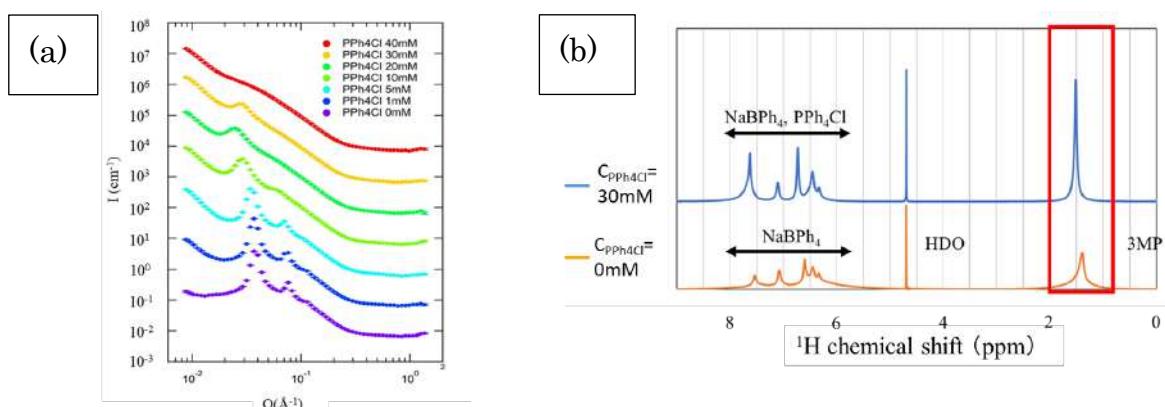


図1 (a) D₂O/3-methylpyridine/NaBPh₄にPPh₄Clを添加した際のSANSの解析。

(b) PPh₄Cl濃度0mMと10mMの各混合溶液のNMR解析の比較。

参考文献 (1) K. Sadakane, et al., Phys. Rev. Lett., 103, 167803 (2009).

直流電流源駆動型無接点マイクロモーター構築の試み

-電極形状変化による影響-

生命医科学部 松村拓哉, 岡田和也, 吉川研一, 理工学部 塩井章久

同志社大学大学院生命医科学研究科 生命物理科学研究室

E-mail address: tm.science1108@gmail.com

【緒言】我々の研究グループでは、界面活性剤を含む有機溶媒において直流電圧を印加することでプラスチック粒子（PE 粒子）が電極の中心鉛直方向の場所において 2 ロールの公転運動を起こすことを明らかにしてきた。^{[1] [2] [3]} 本実験では、同様の系で電極形状を変形させて実験を行った。すると PE 粒子の公転運動に変化が見られた。

【実験】 Fig. 1(a) のように先端を屈曲させた電極を用いた実験系において、アニオン性界面活性剤を含むシリコンオイルに定常直流電圧を加え、Fig. 1 (b) のように負極を水平方向に移動させたときの油相中の PE 粒子の公転運動の変化を観察した。

【結果と考察】 負極の配置位置が正極先端の左側であった時は PE 粒子の公転運動の分岐点は、針状電極対称配置時と同じ正極先端に現れた。Fig. 2 (a), (b) 正極先端の右側に負極を配置すると 負極位置を正極末端方向に移動させるのに合わせて右側にシフトした。Fig. 2(c) また、運動の公転半径が安定し負極から正極、正極から負極に向かう PE 粒子の角速度変化量が減少した。

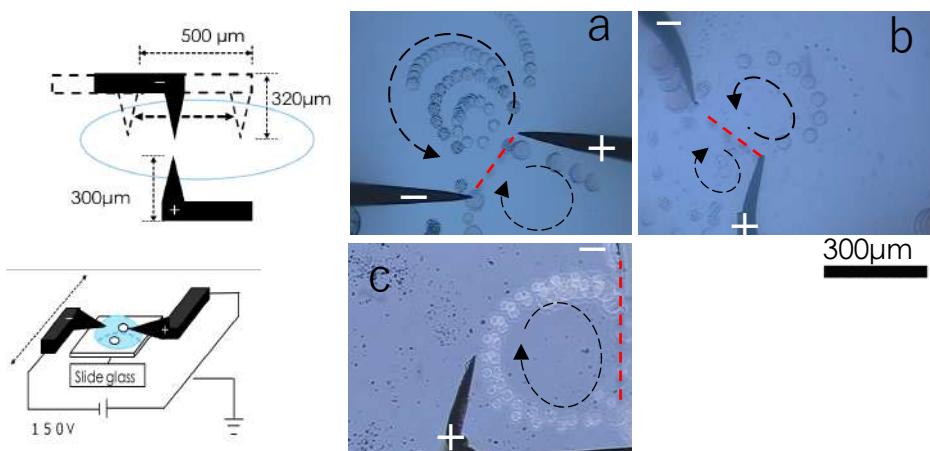


Fig.1 (a),(b) Experimental setup

Fig.2 Rotaion of plastic particles.(a) electrodes needle type.

(b) Negative electrode is on the left side.

(c) Negative electrode is on the right side.

[1] M.Hase, et al., Phys.Rev., 74, 046301(2006). [2]. M.Takinoue, et al., Appl.Phys.lett., 96, 104105(2010) [3] T.Kurimura, et al., J.Phys.Chem **145**, 034902 (2016).

組織切片の伸展性応答：病態に依存したひび割れパターン形成

大社奈摘，中村直彦，井口公太，池川雅哉，剣持貴弘，吉川研一

同志社大学生命医科学研究科 生命物理科学研究室

E-mail address: ctuc0037@mail4.doshisha.ac.jp

従来の病理診断法は、作成した組織切片を光学顕微鏡で観察し、細胞や核の形態および細胞数を評価することが標準的な手法である¹⁾。しかし、目視による判断であり、定量的な指標に基づかない。また、初期の癌など判断が難しい対象もあり、病理医によって診断が異なる場合があるといった問題がある。そこで、今日では、従来の診断手法のみならず、より多くの診断手法が求められている。

本研究では、病態マウスの肝臓組織切片に張力を印加し、発生するひび割れパターンを定量的に画像解析することで、新たな病理診断法の開発を目指す。図1に伸縮性シートに接着させた組織切片の張力印加後の観察画像を示す。また、(a) Control (健常な肝臓)，(b) Simple-steatosis (単純脂肪肝)，(c) NASH (非アルコール性肝炎)，(d) HCC (肝炎) であり、病態の進行する順である。図1より、病態の進行につれひび割れが増加し、かつ微細化する傾向がみられた。そこで、このひび割れパターンの面積比の解析を行った。図2にひび割れパターンにおける面積比の解析結果を示す。解析結果より、Control, Simple-steatosis, NASH, HCC の値が、それぞれ 0.19, 0.23, 0.24, 0.31 となり、病態の進行につれ、ひび割れ部分の面積比が増加していることがわかった。また、従来の顕微鏡観察による診断手法では判断の難しいとされている NASH と HCC において、有意水準 5% で有意差が認められた。組織切片のひび割れパターンを画像解析により定量化することで、ひび割れパターンを新しい指標とした更に信頼性の高い病理診断を行うことが可能である。

※ 檀野氏（2018年3月修士修了）との共同研究

※ International patent (PCT-JP2017-026690), Japan patent (2016-145435)

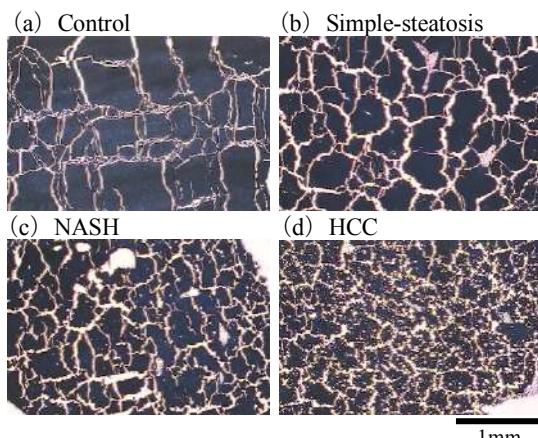


Fig. 1 Cracking pattern on the slices of mice liver as the result of stretching.

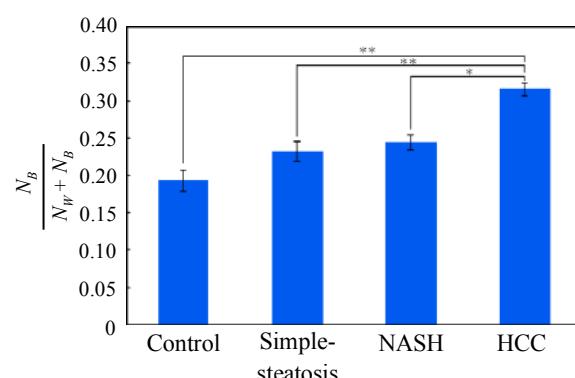


Fig. 2 Change of the parameter of area ratio for different pathological stages.

水/有機溶媒/塩の混合溶液で形成される結晶構造

加藤僚, 伊藤尚充, 高椋利幸, 貞包浩一郎

同志社大学大学院生命医科学研究科 生命物理科学研究室

ctuc0018@mail4.doshisha.ac.jp

有機溶媒水溶液中に NaCl のような塩を加えると, 電離した陽イオン・陰イオンがともに親水的な挙動を示し, 水と有機溶媒の相分離を促進する. 一方で, 電離したイオンがそれぞれ親水性と疎水性を示す塩「NaBPh₄」を加えると, 混合溶液の濃度や温度変化により, 多重膜小胞体やゲル状構造, 結晶構造のような秩序的階層構造が形成されることが分かっている¹⁾ (Fig. 1).

本研究は有機溶媒水溶液に NaBPh₄ を加えた混合溶液中に形成される秩序的階層構造の中でも結晶 (Fig. 1(a)) を対象としている. この結晶は NaBPh₄ と有機溶媒が 1 : 1 結合しているものだとされている. 一方で, 格子定数や, 晶系などの内部構造, 構造形成のメカニズムは明らかとなっていない.

そこで結晶構造を明らかにするために, 粉末 X 線回折法と ¹H NMR 法を行った. 粉末 X 線回折法では, 内部構造の解明を目的としている. ¹H NMR 法では, 溶液の組成比を調べることができる. そこで, 結晶を除去した混合溶液の組成比を測定し, 理論値と比べることで, どの分子がどれだけ結晶に変化したのかを求める.

粉末 X 線回折法により, 結晶の晶系は混合溶液中で形成された結晶は直方晶系, 単斜晶系, 正方晶系のいずれかであることが分かったが, それ以上結晶構造を同定することは難しかった. 単結晶を生成し, 単結晶 X 線回折法により解析する必要がある. これまで混合溶液中で形成される結晶の組成比は 1 : 1 と推定されていたが, ¹H NMR 法により, 組成比は溶液の濃度比により異なっていることが判明した (Fig. 2). 溶液ではなく, 結晶を解析して組成比を検証する必要がある.

Fig. 1

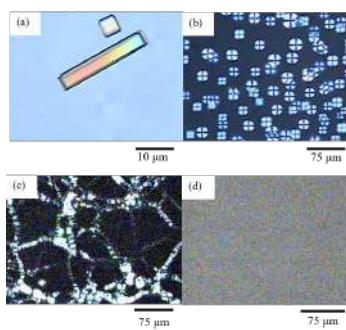


Fig. 2

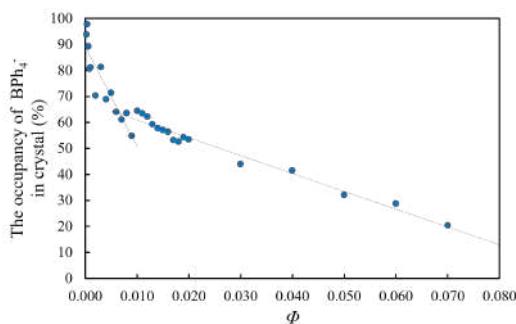


Fig. 1 秩序的階層構造 (a)結晶構造, (b)ラメラ構造, (c)ゲル構造, (d)等方性

Fig. 2 濃度変化に伴う結晶の組成比変化 (横軸: 2, 6-Lu の体積分率, 縦軸: BPh₄⁻の占有率)

参考文献 : 1) K. Sadakane, et al., J. Solution Chem., 43, 1722, (2014).

シスプラチンとトランスプラチンによる DNAの高次構造と機能への影響の比較研究

岸本幹史, 吉川祐子, 貞包浩一朗, 剣持貴弘, 吉川研一
同志社大学大学院生命医科学研究科生命物理科学研究室
E-mail address: kishimotodoushisha@gmail.com

【緒言】シスプラチンは高い抗腫瘍活性を有し、抗がん剤治療で中心的な役割を果たしている白金製剤である。一方で、立体異性体であるトランスプラチンは抗がん作用を示さないことが知られている。抗がん剤のヒトへの作用については、薬物の体内移動、細胞膜透過、細胞内での作用、抗がん活性やそれ以外の副作用など多くの過程があり、それらの作用メカニズムを明らかにするために、抗がん剤やその候補が細胞内でゲノムDNAにどのように作用するのかを *in vitro* 系での実験を通して、解明することは重要な課題となっている。従来の薬物とDNAとの相互作用の研究では、取り扱いの容易な数百から数千塩基対程度(bp)の短鎖DNAを用いた研究が中心で、100kbp以上の長鎖DNAの性質に関して研究が進んでいない。そこで本研究では、長鎖DNAであるT4 DNA(166kbp)を用いて、シスプラチンとトランスプラチンによるDNAの高次構造と機能への影響を比較し、解明することを目的とする。

【実験】本実験では、シスプラチンとトランスプラチンを用いて、*in vitro* での遺伝子発現実験に加え、長鎖DNAを用いての蛍光顕微鏡観察、さらにnmスケールの構造観察やCDスペクトル測定を行い、薬物によるDNA構造への影響を調査した。

【結果と考察】遺伝子発現実験の結果から、シスプラチン、トランスプラチントともに濃度が高くなるにつれ、遺伝子発現を強く抑制していることがわかった。また、この結果を semi log のグラフにプロットすると直線上に分布していることがわかった (Fig. 1)。さらに、この直線の関数を求めるときシスプラチン、ト

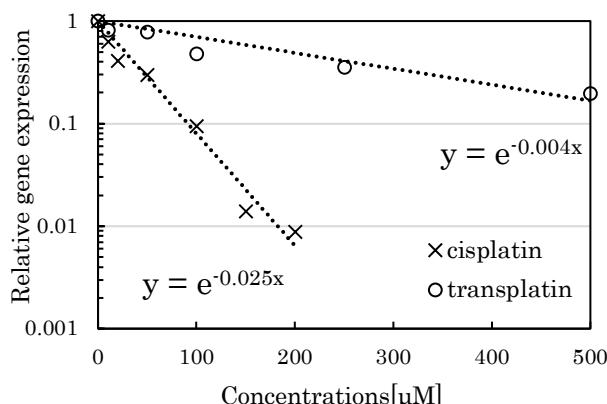


Fig. 1 Depletion of gene-expression activity dependent on the concentrations of cisplatin or transplatin.

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
 私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
 2017年度 成果報告会

ランスプラチニンはそれぞれ $y = e^{-0.025x}$, $y = e^{-0.004x}$ と求められた。この時、 x の係数が反応速度係数と等しいことから、各反応での抑制速度が求められる。シスプラチニンの反応速度係数が 0.025, ランスプラチニンの反応速度係数が 0.004 であることから、幾何異性体という構造の差だけで遺伝子発現抑制に 6 倍もの違いが生じることが明らかとなった。

蛍光顕微鏡観察において、シスプラチニンとランスプラチニンの濃度が数十 μM 程度ではほとんど差はみられなく、2 mM と極めて高い濃度になって DNA の凝縮能力に大きく差が現れた (Fig. 2)。

これに対し、AFM 画像 (Fig. 3) では、10 μM でも網目状構造に違いがみられた。ランスプラチニンでは、より並行に並んだ構造が確認できたのに対し、シスプラチニンでは、際立った網目状の構造となった。発現実験 (Fig. 1) でも数十 μM 程度で 6 倍の遺伝子発現の抑制の速度差が現れていることから、数十 μM 程度でも DNA の高次構造と遺伝子発現へ影響を与えていていると考えられる。

- 【参考文献】[1] S. Komeda, et al., Inorg. Chem., 52, 802(2017).
- [2] Y. Shimizu, et al., Chem. Phys. Lett., 678, 123(2017).
- [3] Y. Yoshikawa et al., Inorg. Chem., 50, 11729 (2011)

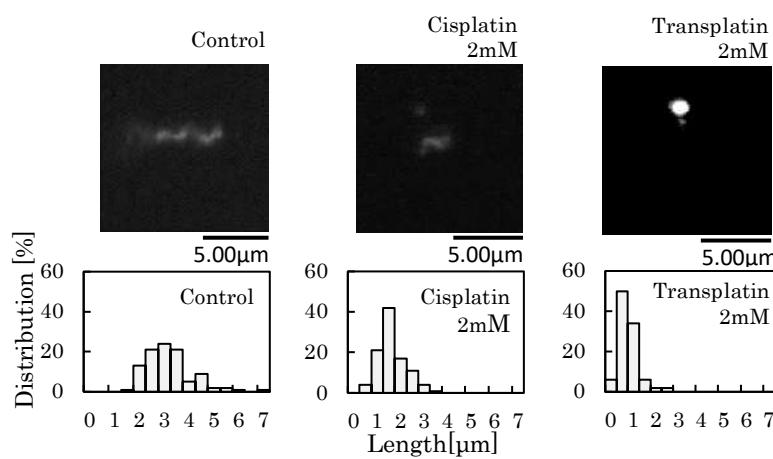


Fig.2 Distribution of long-axis length L of DNA in the presence of cisplatin or transplatin, and fluorescence microscopy observation of single T4 DNA(166 kbp) molecules in bulk solution at different material concentrations.

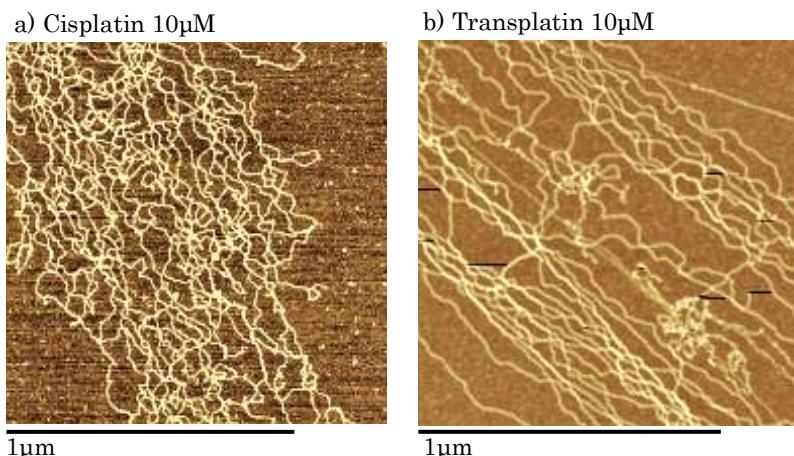


Fig.3 AFM images of DNA(166 kbp) in the presence of each concentrations of cisplatin or transplatin.

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業
「細胞自在操作のための分子化学技術の
開発拠点形成」

2018年度・成果報告会

講演プログラム・要旨集

2019年4月20日（土）

同志社大学京田辺キャンパス

恵道館 KD202・KD204

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

私立大学戦略的研究基盤形成事業

「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」2018年度・研究成果報告会

主催：同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター

開催日時：2019年4月20日（土）10時-17時

開催場所：同志社大学京田辺キャンパス恵道館202および204

プログラム

研究成果報告会1【10:00-12:00】 恵道館KD202

開会の挨拶

研究センター長：小寺政人

講演1. レーザーによる細胞・ソフトマター系の秩序形成

貞包 浩一朗（同志社生命）

講演2. 不均一構造中での溶質分子の動的挙動：イオン液体からモデル細胞膜へ

遠藤 太佳嗣（同志社理工）

講演3. ポリADPリボシル化酵素PARP-1によるDNA修復—Trp残基の共同的分子間相互作用に基づくDNA修復のフィードバック機構—

根木 滋（同志社女子大薬）

講演4. ヘムが関与する生体内シグナルセンシングおよびシグナル伝達

青野 重利（分子科学研究所）

メンバーミーティング（SC622, 昼食）

特別講演会【13:30-15:00】 恵道館KD202 座長：塩井 章久

講演題目「哺乳類細胞の概日リズム制御系成立プログラム」

講師：八木田 和弘 先生（京都府立医大・教授）

研究成果報告会2【15:20-17:00】 恵道館KD204 <ポスター形式>

ポスター発表題目一覧

P1. がん細胞の特異環境で DNA を選択的に切断する二核銅錯体の開発

角谷優樹・畠 真知・人見 穂・小寺政人

P2. 細胞導入を目的とする二核銅錯体の化学的修飾

畠 真知・角谷優樹・斎藤 樹・人見 穂・小寺政人

P3. 細胞内可視化を目的とする BODIPY 修飾錯体の合成

田中芳樹・角谷優樹・人見 穂・小寺政人

P4. カルボキシルアミド配位を有するルテニウム錯体の合成と物性

和村聰士・小寺政人・人見穂

P5. トリプチセン構造を有する鉄(III)カルボキシルアミド錯体

足立弘樹・小寺政人・人見穂

P6. アルカン酸化を目的とする鉄(III)カルボキシルアミド錯体

上田純平・小寺政人・人見穂

P7. キノリン骨格を有するレシオ型亜鉛蛍光プローブの開発

岡村麻美・小寺政人・人見穂

P8. 生体内一酸化炭素の選択的除去による概日リズム乱れ

北岸宏亮・峯岸彩夏・佐上郁子・根木滋・加納航治

P9. 生体内における内因性 CO の簡便な定量法の開発

毛 齊悦・北岸宏亮

P10. 細胞膜透過性の高い CO 放出分子の開発

高山実花子・北岸宏亮

P11. Sp1 亜鉛フィンガータンパク質における酸化反応の速度論的解析

岸 果苗・鳥見 優・河原由佳・杉浦幸雄・根木 滋

P12. エレクトロスピニング法を適用した放出制御型製剤の調製：アセトアミノフェン

含有ナノファイバー錠の薬学的評価

羽森真美・芝田信人

P13. タンパク質様の単鎖フォールディングを目指したマルチブロック型ペプチド-ポリ

マー・ハイブリッドの設計

西村慎之介・東 信行・古賀智之

P14. GFP を構造モデルとする四分岐型ペプチド-ポリマー・コンジュゲートの合成とそ

の特性

太田奈恵・東 信行・古賀智之

P15. pH 勾配で駆動される分子集合体運動の解析

中尾友紀・名和愛利香・山本大吾・塩井章久

P16. ガラス管内で油水液滴が示す運動の同期現象

笠井柾宏・名和愛利香・山本大吾・塩井章久

P17. 直流電場下での油相中粒子の運動

柿本一朗・名和愛利香・山本大吾・塩井章久

P18. エマルジョンシステムを利用した新しいドラッグデリバリー

田原義朗・松本道明

P19. p-アミノフェニルチルラジカルの分光測定からみたイオン液体の溶媒和過程

藤井香里・遠藤太佳嗣・木村佳文

P20. Photoactive Yellow Protein の構造および光サイクル反応に対する水和イオン液体の

効果

梅崎詩菜・遠藤太佳嗣・木村佳文

P21. 蛍光相關分光法によるイオン液体中のタンパク質の揺らぎ観測の試み

川口匠吾・中谷祐也・木村佳文

P22. 時間遅れを伴う非線形発振回路の光結合

齋藤美和・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一

P23. 細胞のミクロ液滴界面への自己組織的配置

宮崎幹・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一

P24. 血管系と神経系を用いた複合組織体構築の試み

柳原伸伍・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一

P25. 荷電高分子によるミクロ液滴の安定化

伊藤立樹・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一

P26. 高分子鎖折り畳み転移の実空間モデル：機械的ゆらぎによる秩序形成

吉川裕高・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一

P27. ナノ金属粒子懸濁液に対するレーザー的作用

庄野真由・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一

P28. 微細藻類スピルリナの形態変化と運動モード分岐

田中瞭斗・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一

P29. ポリアミン異性体のDNA構造・活性に対する特異性

北川智規・貞包浩一朗・剣持貴弘・吉川研一

懇親会 18:00 ~ 20:00

「黄桜カッパカントリー」

近鉄京都線 桃山御陵前駅 下車徒歩8分

TEL: 075-611-9919

HP: <http://kizakura.co.jp/restaurant/country/index.html>



特別講演 1

哺乳類細胞の概日リズム制御系成立プログラム

八木田和弘^{1,2}

京都府立医科大学大学院医学研究科¹統合生理学、²地域生涯健康医学

「概日時計」による概日リズム制御系は、地球の自転周期に伴う環境変化へ生体機能を適応させるチューニング・システムである。概日時計は、バクテリアから哺乳類および高等植物に至る、ほとんどの生物が普遍的に有している生命機能であり、朝や夜が来るのを予測することで先んじて生体機能を変化させる。来たるべき外界の自然環境変化に内部環境を能動的に適応させる概日時計は、際立った特性をもつ生命システムとして生物学的にも医学的にも想像以上の広がりを持つテーマとなってきた。事実、環境周期との不適合は様々な疾患リスクと関連することはが指摘されており、現代社会が抱える喫緊の課題となっている。

哺乳類の概日リズムの中核は視床下部にある視交叉上核(SCN)であるが、我々はこれまでに、線維芽細胞などの培養細胞でも視交叉上核と同様の概日時計が備わっていることを示し (*Science*, 2001)、概日時計が全身に個々の細胞レベルに備わる普遍的細胞機能であることを明らかにした。さらに我々は、多能性幹細胞であるマウスES細胞には概日時計が存在しないこと、しかし、in vitroで分化誘導することで細胞自律性に概日時計が形成されること、さらに、分化した細胞をiPS細胞へとリプログラミングすることで再び概日時計が消失すること、を明らかにし「概日時計は細胞分化と密接に関連する」という新たな事象を発見した (*PNAS*, 2010; *PNAS*, 2014)。概日時計の分化に伴う形成機構がマウス個体発生においても共通することを突き止め(*FEBS Lett.*, 2013)(*PNAS*, 2017)、これまであまり知られていなかった哺乳類における概日時計成立過程の理解を推し進めるとともに、地球の自転周期への適応プログラムが発生過程を通して全身の細胞レベルで機能し始めることを明らかにした。

本講演では、これまで我々が進めてきた概日時計成立機構の解明に向けた研究を概説するとともに、環境周期との関係性から概日リズム制御系の成り立ちを改めて捉え直す新たな取り組みを紹介したい。

【参考文献】

- [1] Umemura Y, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, E7479-7488, 2017.
- [2] Umemura Y, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, E5039-48, 2014.
- [3] Inada Y, et al, *FEBS Lett.*, 588, 459-465, 2013.
- [4] Yagita K, et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 3846-3851, 2010.
- [5] Yagita K, et al, *Science.*, 292:278-81, 2001

講演 1

レーザーによる細胞・ソフトマター系の秩序形成

貞包 浩一朗

同志社大学生命医科学部

ksadakan@mail.doshisha.ac.jp

【近赤外レーザーを活用した細胞 3D 組織化】

iPS 細胞や ES 細胞などの万能細胞を医療に応用するためには細胞同士を接着させ、機能を有する組織を人工的に形成するような技術の創出が不可欠となっている。細胞胞組織体を人工的に構築する上では、現在ゲルなどの人工的な基盤を用いて細胞同士を接着さる方法が主流となっている。この手法は、二次元的な細胞組織体を構築することは可能であるが、臓器のように複雑な形状をもつ三次元細胞組織体を構築することは困難である。

これに対し本研究では、光ピンセットを利用して細胞を 3 次元に配置させ、安定な細胞組織体を構築することのできる新手法を開発した [1-3]。図 1 は、マウスの乳腺上皮細胞 (NMuMG) 同士を光ピンセットでマニピュレートし、様々な形状の組織体を構築した結果である。このような組織体は、媒質に 40mg/mL 程度の高分子 (PEG やデキストラン) を溶解させたときに最も安定して形成することが確認されている。本講演では、細胞に対する力学測定の結果も踏まえ、細胞組織体が安定化するメカニズムについて議論する。

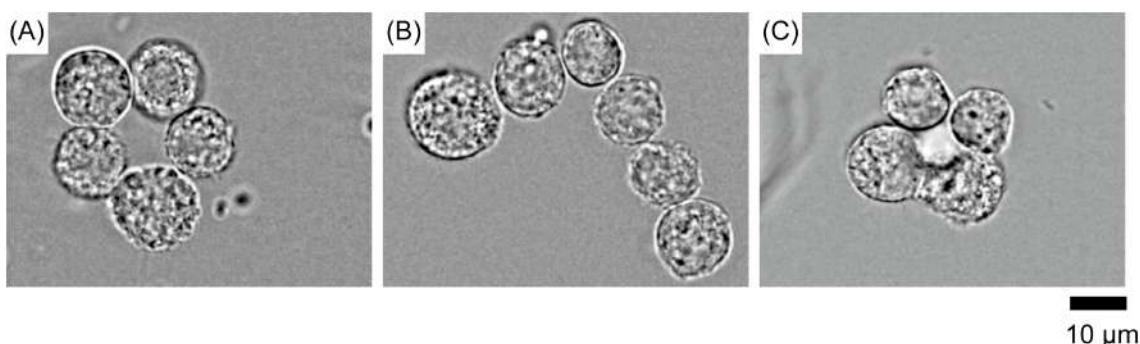


図 1: マウスの乳腺上皮細胞 (NMuMG) の組織体の顕微鏡写真。媒質には 40mg/mL のデキストランを溶解している。(A) ドーナツ構造、(B) L 字型構造、(C) ピラミッド型構造。

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
2018年度 成果報告会

【相分離液滴を用いた光駆動型マイクロポンプ機構の構築】

我々はこれまでに、相分離温度近傍の一相領域にある水/有機溶媒混合溶液に集光させたレーザーを照射すると、焦点近傍で局所的な相分離が誘起されることを明らかにしている[4]。本研究では、レーザー照射点付近に障害物を配置する事で、一方向に流れを有した相分離液滴が生成することを見出した[5]。

【レーザーによる cm サイズの固体物体の運動制御】

光ピンセットでは、操作可能な物体のサイズの上限が数十 μm 程度である。これに対し、我々は最近、水面に浮かべたアルミ箔に波長 532 nm のレーザー光を照射することで、並進運動や一定周期の振子運動が生じることを明らかにした[6]。また、水面に浮かべたオレイン酸液滴上にスクリュー型の形状のアルミ箔を乗せて、波長 532 nm のレーザー光を照射したところ、時計回りや反時計回りの回転運動が生じることも発見した(図 2)[6]。以上の現象は、レーザー照射に伴う温度上昇により、照射位置近傍の界面張力の低下し、周りの溶液との界面張力差が生じたことによるものであると解釈した。

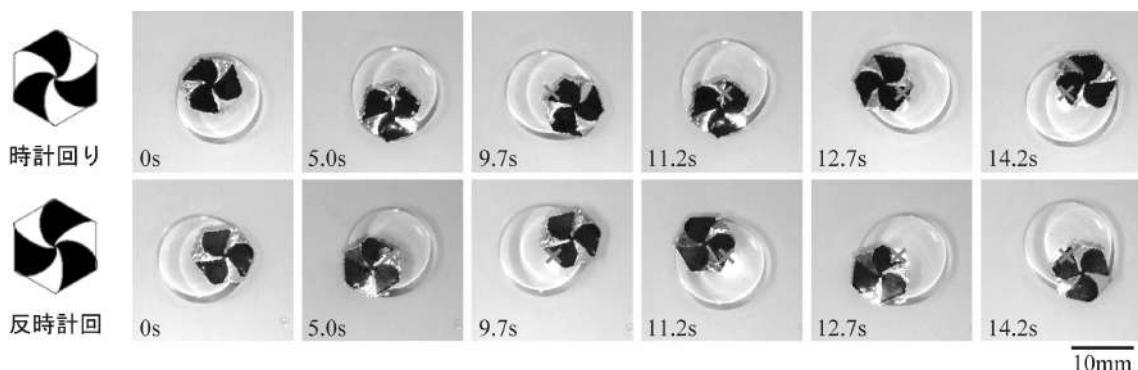


図 2: 水面に浮かぶオレイン酸液滴上における、スクリュー型アルミ箔の回転運動。

- [1] S. Hashimoto, et al., *Chem. Phys. Lett.*, **655**, 11-16 (2016)
- [2] A. Yoshida, et al., *Polymers*, **9**, 319 (2017)
- [3] T. Yamazaki, et al., *JoVE*, e57815 (2018)
- [4] K. Sadakane, et al., *Phys. Rev. E*, **78**, 046214 (2008)
- [5] H. Sakuta, et al., *J. Phys. Chem. Lett.*, **9**, 5792-5796 (2018)
- [6] Y. Harada, et al., *J. Phys. Chem. C*, **122**, 2747-2752 (2018)

講演 2

不均一構造中での溶質分子の動的挙動
：イオン液体からモデル細胞膜へ

遠藤 太佳嗣

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

E-mail address: taendo@mail.doshisha.ac.jp

室温付近で液体状態の塩と定義されるイオン液体では、その融点を下げるため、多くの場合、長いアルキル側鎖が導入されている。そのため、リン脂質と同様、イオン性の高い親水部と疎水性が高いアルキル鎖部同士がそれぞれ集まりやすく、ベシクルや、液晶相、更にはナノレベルでの相分離構造といった、種々の不均一構造が発見されている。

本研究では、イオン液体を細胞膜のモデル場として採用し、溶質分子が細胞膜のような不均一構造とどのような相互作用・ダイナミクスを持つのかを明らかにすることを目的とした。具体的には、長さや導入様式が異なるアルキル鎖を持つ種々のイオン液体を合成し、そのイオン液体中での、小分子の相互作用・ダイナミクスを、NMR 法を中心に観察した。

図 1 には、アルキル鎖の総炭素数の異なるイオン液体中での、一酸化炭素(CO)の回転速度を、アルキル鎖の総炭素数でプロットしたものを示す。値は全て同じ η/T (η : 粘度、 T : 温度) のものを用いているため、古典的な Stokes-Einstein-Debye の式から考えれば、溶質の運動は、イオン液体種に依存しない結果が得られるはずだが、実際は、アルキル鎖中の炭素数が多いほど、より CO の回転速度が速くなっている。即ち、炭素数が増えれば、CO の周囲の環境が大きく変わっていることを意味する。分子動力学計算の結果から、CO は疎水性の高いアルキル鎖部を中心存在し、中でも、アルキル鎖末端部分を好むことが示唆された。これは、不均一構造は、単純に「親水部」、「疎水部」で 2 分割できるものではなく、例え疎水部でもその性質に勾配を持つことを意味する。

発表では、その他の溶質や、イオン液体自身の細胞膜との相互作用についても触れる。

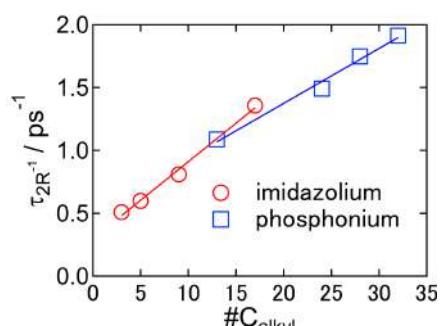


図 1. イオン液体中の CO の回転速度におけるアルキル鎖中の総炭素数依存性。

講演3

ポリ ADP リボシル化酵素 PARP-1 による DNA 修復—Trp 残基の共同的分子間相互作用に基づく DNA 修復のフィードバック機構—

根木滋・太田志織・奥永望月・鶴田みどり・間下雅士
 (同志社女子大学薬学部・医療薬学科)
 E-mail address: snegi@dwc.doshisha.ac.jp

[序] PARP-1 は、DNA 結合領域(DBD、亜鉛フィンガードメイン)、自己修飾領域(AD)、ポリ ADP リボシル化(PAR 化)反応に関与している触媒領域(CAT)を含む領域(WGR/CAT)の 3 つの機能性ドメイン領域を有する多機能酵素であり(Fig. 1A)、損傷を受けた DNA や特異的配列をもつ DNA と結合し活性化される。活性化された PARP-1 は NAD⁺を担体として標的核関連タンパク質中の Glu、Asp および Lys 残基部位をポリ PAR 化すると共に(Fig. 1B)、PARP-1 自身も構造中の被 PAR 化領域である Lys (K498, K521 および K524)を PAR 化する。Fig. 1B からも分かるように、PAR は負電荷を帶び生体高分子であり、PARP-1 は自己 PAR 化により核酸と同様に表面に高い負電荷を帶びることにより正電荷を帶びているヒストンタンパク質に結合し、クロマチン構造のコンパクションや DNA 転写反応の調節に関与している¹⁾。このように、転写、DNA 修復、アポトーシスなど多岐にわたる細胞機能に関与している PARP-1 は、様々な疾患との関わりやそれに対する特異的阻害剤を含めた新しい創薬の標的タンパク質として注目されている。近年 Pascal らは X 線構造解析の結果から、PARP-1 と DNA との結合において WGR に存在する疎水性アミノ酸残基と DNA との相互作用が重要性であると指摘している。そこで本研究では、WGR 領域に存在する疎水性アミノ酸の 1 つである W589 に注目

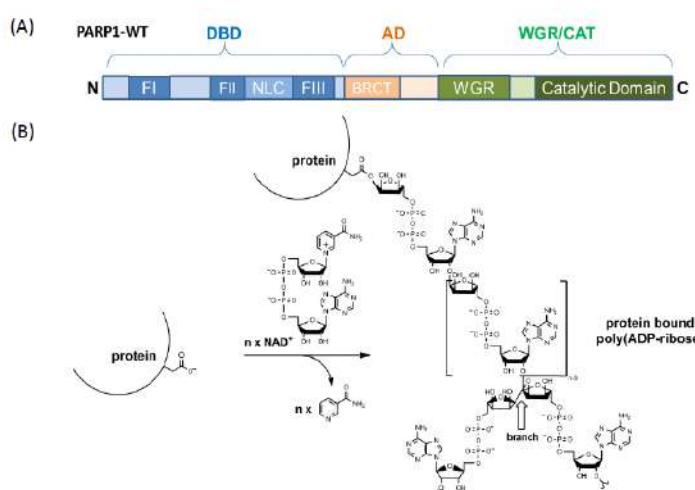


Figure 1. (A) Schematic representation of PARP1 domain structures.
 (B) PARP-1 creates the glycosidic bond of NAD⁺ between nicotinamide and ribose followed by the covalent modification of acceptor proteins with an ADP-ribosyl unit.

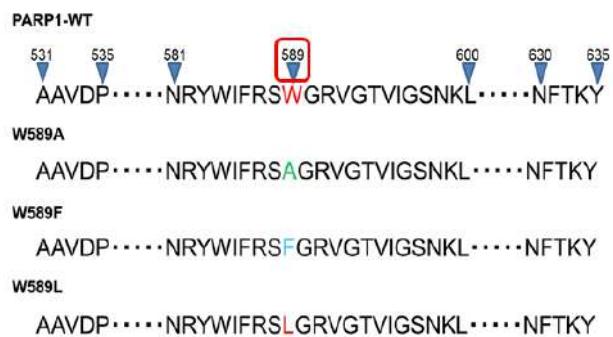


Figure 2. Partial primary sequences (531-635) of PARP-1 wild-type (PARP1-WT) and its mutants having point mutation at W589 site (W589A, W589F, W589L).

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
 私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
 2017年度 成果報告会

し、野生型 PARP1-WT および野生型と同じ芳香環の側鎖であるフェニル基側鎖を持つ W589F、脂肪族の疎水性側鎖を持つ W589L、さらに小さい側鎖を持つ W589A の点変異体を作製し(Fig. 2)、野生型 PARP1(PARP1-WT)と点変異体との自己 PAR 化反応性について比較検討し、自己 PAR 化反応における塩基部分とのπ-π相互作用、水素結合、静電相互作用および疎水性相互作用の共同的な相互作用の重要性について検討を行った。

[実験] PARP-1 WT タンパク質発現ベクターの構築、PARP-1WT および点変異体 (W589F, W589L, W589A) タンパク質の発現および精製、さらにこれら 4 つの PARP-1 の mCherry 融合タンパク質の作製を行った。試験管内および細胞核内における PARP-1 タンパク質の自己 PAR 化反応について、ウェスタンブロッティングおよび細胞核へのレーザー照射後の蛍光強度変化から検討を行った。

[結果・考察] 試験管内の実験で自己 PAR 化反応を行った。ウェスタンブロッティングを用い自己 PAR 化反応の追跡を行った (Fig. 3)。WT および W589F では、PAR 化が進行するにつれて高分子量の PAR が生成した(Fig. 3A)。一方、脂肪族の疎水性側鎖を持つ W589L および W589A の場合では、高分子量の PAR はほとんど生成されず、PARP-1 タンパク質に低分子の PAR が付加したもののが認められた(Fig. 3B)。次に Hela 細胞を用いて細胞核内における各 PARP-1 の挙動について検討を行った。DNA 損傷を与えるために 405 nm のレーザーを核に照射し、照射部位における蛍光強度の時間変化から PAR の集積量および結合能を解析した。その結果、DNA 損傷部位への集積量は同程度であるが、DNA からの解離は疎水性が小さくなるにつれて速くなることが明らかとなった(Fig. 4)。

以上の結果から、未修飾の各 PARP-1 の DNA 結合能は同程度であると予想されるが、PAR 化されることにより PAAR-1 と DNA のリン酸骨格部分との静電反発が大きくなり、結果、芳香環のない、より疎水性の低い W589L および W589A は DNA から解離し PAR 化反応の進行が止まると考えられる。以上のことから DNA 修復タンパク質のフィードバック機構の調整に複数の分子間相互作用の共同的な働きが非常に重要な役割を果たしていることを示すことができた。

[引用文献]

1. M.-F. Langelier, J. L. Planck, S. Roy, J. M. Pascal, *Science*, **336**, 728-732 (2012).

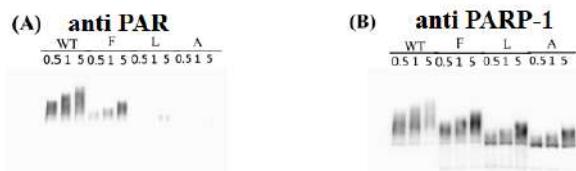


Figure 3. Western blot analysis of automodification assay of PARP-1WT, F, L, A. Total proteins analyzed by immunoblotting with an anti-PAR antibody(A) and anti-PARP antibody(B).

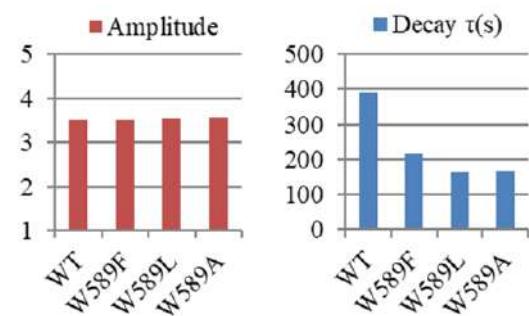


Figure 4. Different dynamics of PARP-1 WT-mCherry and its mutants to DNA lesions after micro-irradiation.

講演4

ヘムが関与する生体内シグナルセンシングおよびシグナル伝達

青野重利

自然科学研究機構 生命創成探究センター・分子科学研究所

E-mail address: aono@ims.ac.jp

生物が、様々な外部環境変化に対応して恒常性を維持するためには、外部環境変化を感知するためのセンシングシステムと、感知した変化に対応した適切な応答システムが必要不可欠である。生体中には、多くのセンサーパク質が存在しており、これらのセンサーパク質が外部環境シグナルのセンシングに重要な役割を果たしている。本講演では、これらのセンサーパク質の中でも特にヘムが関与するセンサーパク質について、我々の研究成果を中心に紹介する。

(1) 走化性制御系で機能する酸素センサーパク質 : HemAT、Aer2

走化性制御系においては、シグナルトランスデューサータンパク質が外部シグナルを感じた後、一連のシグナル伝達タンパク質 (CheA、CheYなど) 間でのリン酸基転移反応が進行し、最終的にベン毛モーターの回転方向が制御されることにより、外部シグナルに応答した運動性変化が誘起される。酸素分子に対する走化性 (aerotaxis) 制御系において、酸素センサーとして機能するシグナルトランスデューサータンパク質 HemAT および Aer2 は、ヘムを活性中心として利用している。

枯草菌に存在する HemAT 中のセンサードメインは、グロビン構造を有しており、分子中に含まれる b 型ヘムが酸素センサーの本体として機能する。HemAT 中のヘムは休止状態において 5 配位構造を有しており、酸素、CO、NO いずれも配位可能であるが、HemAT は、ヘムならびにヘムに結合した気体分子とその周囲のアミノ酸側鎖との水素結合を利用して酸素と他の気体分子を識別している。すなわち HemAT の場合、ヘムに酸素が結合した場合のみ、ヘムプロピオン酸と His86 との間に水素結合が形成されることによりヘム周辺 (CE ループ、E ヘリックス) のコンフォメーション変化が誘起される。その結果、ヘム遠位ポケットに存在する Thr95 と酸素の間に特異的水素結合が形成され、これが酸素の選択的認識に重要な役割を果たしている。

Aer2 は、679 アミノ酸残基よりなる可溶性タンパク質であり、N 末端より poly HAMP ドメイン、PAS ドメイン、di HAMP ドメイン、MCP ドメインの 4 つのド

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
2018年度 成果報告会

メインから構成されており、ヘム含有 PAS ドメインが酸素センサードメインとして機能している。これまでに、poly HAMP ドメイン、PAS ドメイン、di HAMP ドメインからなる HPH-Aer2 (1–384 残基)、および PAS ドメイン、di HAMP ドメインからなる PH-Aer2 (173 – 384 残基) の結晶構造解析に成功している。本講演では、これらの構造を基に、Aer2 による酸素センシング機構についても議論する。

(2) 酸素により活性制御される cyclic-di-GMP 合成酵素 : HemDGC

cyclic-di-GMP は、各種バクテリアのバイオフィルム形成、抗生物質耐性、病原性発現などに関与するセカンドメッセンジャーとして機能する。好冷性硫酸塩還元菌 *Desulfotalea psychrophila* 中に存在する HemDGC は、N 末にグロビン構造を有するセンサードメインを、C 末に cyclic-di-GMP 合成酵素として機能する GGDEF ドメインを有している。グロビンドメイン中のヘムには、酸素、CO、NO が結合可能であるが、ヘムに酸素が結合した場合にのみ、酵素活性 (cyclic-di-GMP 合成) を示す。酸素化型 HemDGC では、ヘムポケットに存在する Tyr55 と Gln81 が、ヘムに結合した酸素に水素結合を形成することで、酸素を選択的に認識し、ヘムポケットのコンフォメーション変化を誘起している。ヘム周辺のコンフォメーション変化が、C 末領域の GGDEF ドメインの構造変化を誘起することで酵素活性を制御していると考えられるが、構造変化的詳細については未だ不明な状況である。

(3) ヘムセンサーとして機能する転写調節因子 : HrtR

乳酸菌 (*Lactococcus lactis*) はヘム生合成系を欠損しているが、外部からヘム分子を取り込むことにより酸素呼吸により生育可能である。しかし、必要量以上に取り込まれたヘム分子は、活性酸素産生などにより細胞毒性を示すため、細胞内のヘム濃度は厳密な制御を受けている。ヘムセンサー機能を有する転写調節因子 HrtR が、この細胞内ヘム濃度制御の中心的な役割を担っている。HrtR はリプレッサーとして機能し、ヘム排出トランスポーター遺伝子の発現を制御しており、その DNA 結合能は、ヘム分子の結合・解離により制御されている。すなわち、ヘムを結合していないアポ型 HrtR が標的 DNA に対する特異的結合能を有しており、HrtR にヘムが結合することにより、その特異的 DNA 結合能が失われ、標的 DNA から解離する。本講演では、アポ型 HrtR/DNA 複合体、およびホロ型 HrtR の結晶構造を基に考察した、HrtR によるヘムセンシング、およびヘムによる HrtR の機能制御機構について議論する。

がん細胞の特異環境で DNA を選択的に切断する二核銅錯体の開発

角谷 優樹・畠 真知・人見 穂・小寺 政人
 同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻
 E-mail address: cyjc1702@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】

現在抗がん剤として臨床利用されているシスプラチンやオキサリプラチンなどの白金(II)錯体は DNA と強く結合し、複製阻害して抗がん活性を示す。しかし、これらの抗がん剤は正常細胞にも同様に作用し、深刻な副作用を起こすことが問題である。そこで、がん細胞内の特異環境で DNA を切断する金属錯体の開発が盛んに研究されている。これまで我々は、がん細胞の周辺が正常細胞よりも低い pH であることに注目し、既知の methylene-tether 配位子 Hbcmcp の二核銅錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcmcp})](\text{ClO}_4)_2$ (**1**) が低 pH 領域で DNA の加水分解切断を特異的に促進することを報告した^[1]。本研究では、過酸化水素濃度が正常細胞よりもがん細胞内で高いことに注目し、過酸化水素による DNA 酸化切断を促進する錯体の開発を試みた。今回、2つの新規 amide-tether 配位子を開発し、その二核銅錯体が高い DNA 酸化切断活性と抗がん活性を示すことを見出したので報告する。

【結果と考察】

環状アミン 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen) を *p*-cresol の 2,6 位に amide-tether で導入した新規配位子 Hbcamide を開発し、 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcamide})](\text{ClO}_4)_2$ (**2**) を合成した。錯体 **2** は、過酸化水素による DNA の酸化切断を大きく促進した。これは配位子の amide-tether により、過酸化水素と **2** の反応が促進されたためと考えられる。またペンドント基を cyclen から dipyridylmethylamine (dpa) に置換した amide-tether 配位子 Hbdpamide を開発し、 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})_2(\text{bdpamide})](\text{OAc})_2$ (**3a**) を合成した。錯体 **3a** の対イオンを水溶液中で過塩素酸に置換したところ $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OAc})(\mu\text{-H}_2\text{O})(\text{bdpamide})](\text{ClO}_4)_2$ (**3b**) が得られ、これは単結晶を形成したので、X 線構造解析により構造を決定した。その構造は Fig 1 に示す様に、二核銅が水分子と酢酸イオンにより架橋されている。また *p*-cresol の 2,6 位に dpa を methylene-tether で導入した既存の Hbpmp 配位子を用いて $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bpmp})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**) を合成した。過酸化水素による DNA 酸化切断活性を錯体 **1**, **2**, **3a**, **4** で比較したところ、**3a** が最も高い活性を示すことがわかった。これは、amide-tether と架橋構造の効果と考えられる。さらに、これらの錯体を用いて HeLa 細胞を用いた細胞毒性の実験を行ったところ、DNA 酸化的切断活性が高い錯体ほど細胞毒性が高いことがわかった。これらの結果から、高い細胞毒性を示す錯体は細胞内に入り、核内の DNA を酸化的に切断して細胞死を誘導していることが示唆された。

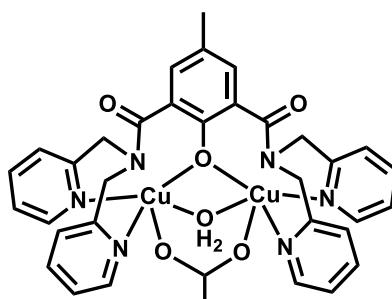


Fig. 1 Chemical structure of complex **3a**.

【参考文献】

- [1] M. Kodera, Y. Kadoya, et. al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Selected paper, **2019**, 92, 739–747.

P02

細胞導入を目的とする二核銅錯体の化学的修飾

畠 真知・角谷 優樹・齋藤 樹・人見 穂・小寺 政人

同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻

E-mail address:@mail4.doshisha.ac.jp

【緒言】これまでに我々は、大環状アミン tacn や cyclen を *p*-cresol の 2,6 位に methylene-tether で導入した既報の配位子 Hbcm, Hbcc の銅錯体 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcm})](\text{ClO}_4)_2$ (**1**), $[\text{Cu}_2(\text{bcc})](\text{ClO}_4)_3$ (**2**)を合成し、これらが低 pH 領域で DNA の加水分解切断を促進することを報告した^[1]。本研究では、より高いDNA 切断活性の発現を目指して cyclen を amide-tether で導入した新規配位子 Hbcamideを開発し、 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcamide})](\text{ClO}_4)_2$ (**3**)を合成した。錯体 **1**, **2** と異なり、**3** は過酸化水素存在下、pH 8.2 で plasmid DNA (Form I)を 1 時間でほぼ定量的に Form II に変換し、高いDNA 酸化切断活性を示した。しかし、**3** は高い親水性のために細胞膜を透過せず、細胞毒性を示さなかった。そこで、**3** に細胞膜透過能を持たせるために、疎水性が高く、インターフェーラーとしても作用するフェナントレンを Hbcamide に導入した新規二核化配位子 Hbcamide-phen を開発し、 $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{bcamide-phen})](\text{ClO}_4)_2$ (**4**)を合成した。

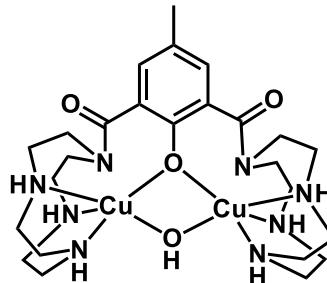


Figure 1. Structure of **3**.

【結果と考察】錯体 **3** を用いて H_2O_2 による plasmid DNA の酸化切断実験を行い、Form I, Form II, Form III の割合をゲル電気泳動法で定量した。また HeLa 細胞に対する毒性を MTT assay により測定した。さらに **3** の上部にフェナントレンを導入した **4** を合成し、**3** と同様に plasmid DNA の酸化切断とゲル電気泳動法による定量および MTT assay による HeLa 細胞への細胞毒性を測定した。錯体 **3** が **1**, **2** よりはるかに高いDNA 酸化切断活性を示した事から、amide-tether が酸化活性を向上させたといえる。しかし、**3** は HeLa 細胞に対して毒性を示さなかった。錯体 **3** が高い DNA 酸化切断活性を持つにも関わらず細胞毒性を示さないのは細胞導入に問題があると考えられた。そこでフェナントレンを導入した **4** を用いたところ、細胞毒性が飛躍的に向上した。これらの結果から、芳香族性で高い疎水性を示すフェナントレンは細胞導入基として有効であり、膜透過性を向上させる事により **4** に抗がん活性を付与したといえる。

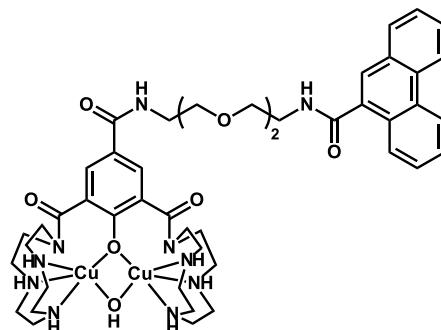


Figure 2. Structure of **4**.

【参考文献】

- [1] M. Kodera, Y. Kadoya, et. al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Selected paper, **2019**, 92, 739–747

細胞内可視化を目的とする BODIPY 修飾錯体の合成

田中 芳樹・角谷 優樹・人見 穢・小寺 政人
 同志社大学大学院理工学研究科 応用化学専攻
 E-mail address: ctwd0760@mail4.doshisha.ac.jp

抗がん剤として cisplatin などの白金錯体が広く臨床利用されている。これらは DNA と結合し、DNA の複製を阻害して細胞死を誘導する。しかし cisplatin は正常細胞の DNA にも同様に結合し、強い副作用を示す。そこで、がん細胞の特異環境の 1 つである高い H₂O₂ 濃度に注目した。H₂O₂ による DNA 酸化切断を促進する金属錯体は選択的にがん細胞を死滅させる抗がん剤の開発につながると考えた。Fig 1 に示す 2,6-bis[bis(2-pyridylmethyl)carbamoyl]-4-methylphenol (Hbdpamide) を新規配位子として合成した。その二核銅錯体 [Cu₂(μ-OAc)(μ-H₂O)(bdpamide)](ClO₄)₂ (**1**) が H₂O₂ と反応して DNA 酸化切断に対して高活性を示すことを見出した^[1, 2]。錯体 **1** は HeLa 細胞に対して高い細胞毒性を示した。これは **1** が細胞導入されたためと考えられる。そこで本研究では、**1** の DNA 酸化切断や細胞内挙動を可視化するため、周辺環境に影響されにくく高い蛍光量子収率をもつ蛍光物質であるボロンジピリロメテン(BODIPY)^[3]を化学結合でつなぎ新規二核化配位子およびその二核銅錯体(**2**)を設計し合成した。錯体 **2** の構造を Fig. 2 に示す。錯体 **2** を用いて細胞導入実験を行ったところ、錯体の細胞内への導入が確認された(Fig. 3)。また細胞毒性を評価したのでこれを報告する。

参考文献

[1]廣畑 敦洋氏, 2017 年度 同志社大学理工学部卒業論文

[2]角谷 優樹氏, 2016 年度同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻修士論文

[3] Allen J. Bard.; Joel Rosenthal *J. Phys. Chem. C* 2013, 117, 5599-5609

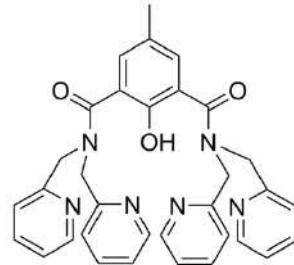


Figure 1 Structure of Hbdpamide

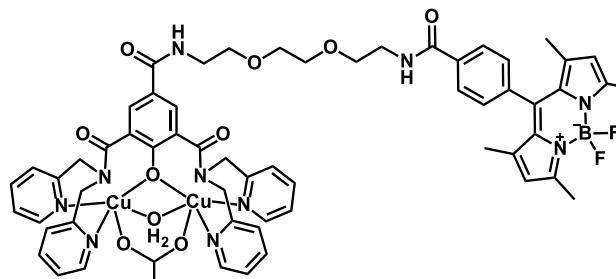


Figure 2 Chemical Structure of 2

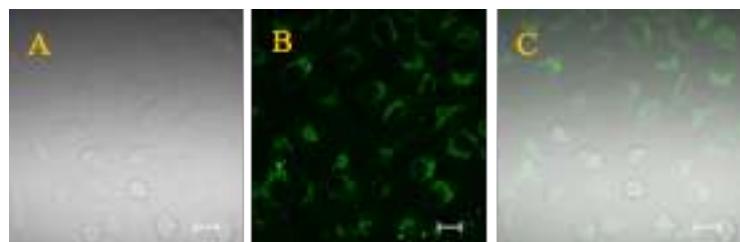


Figure 3 Confocal microscopic images of BODIPY-modified dicopper complex (5 μM). (A) Bright field transmission image of HeLa cells. (B) Fluorescence image of HeLa cells. (C) Merged image of A and B. Images were taken with a fluorescence microscope equipped with FITC filters. Scale bar are 20 μm.

カルボキシルアミド配位を有するルテニウム錯体の合成と物性

和村 聰士、小寺 政人、人見 穣

同志社大学理工学研究科応用化学専攻

E-mail address: ctwd0770@mail4.doshisha.ac.jp

ルテニウムオキソ種は安定であるが強力な酸化剤にもなり、C–H 結合の酸化が可能である。小島らはルテニウム(IV)オキソ種による C–H 活性化を支配する因子を調べるために tpa、6-COOH-tpa、N4Py などの多座配位子を用いてルテニウム(IV)オキソ種の生成に成功している[1]。本研究では、五座モノカルボキシルアミド配位子を有する鉄錯体である Fe-dpaq が過酸化水素存在下において、形式 5 倍の鉄オキソ種を発生し、選択的なアルカン酸化触媒として機能する。アニオン性 dpaq 配位子からの電子供与により、鉄オキソ種の酸化電位が低下する一方、オキソ配位の塩基性度を強めると期待されるが、キノリン環の 5 位に置換基を導入した dpaq 誘導体を用いた系統的な研究から、低電位化によって起こる酸化力の低下はオキソ配位の高塩基性度により補償されることが分かっているが[2]、定量的な議論ができていないかった。本研究では、より安定なオキソ種を与えると期待できるルテニウムオキソ種の調製を目指した[3]。具体的には、Ru-dpaq 誘導体を合成し、構造上類似の配位子を有する一連のルテニウム(IV)オキソ種の酸化還元電位およびオキソ塩基性に対してアニオン供与が及ぼす影響について調べたので報告する。

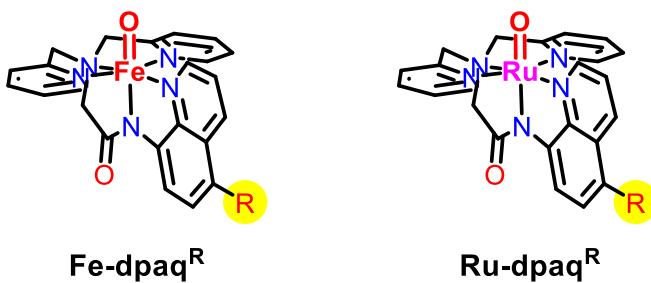


Figure 1. Iron- and ruthenium-oxo species supported by dpaq ligands ($R = H$ or NO_2).

参考文献

- [1] T. Ishizuka, H. Kotani, T. Kojima, *Dalton Trans.*, **45**, 16727 (2016).
- [2] Y. Hitomi, K. Arakawa, M. Kodera, *Chem. Eur. J.*, **19**, 14697 (2013).
- [3] Y. Hitomi, K. Arakawa, T. Funabiki, M. Kodera, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 3448 (2012).

トリプチセン構造を有する鉄(III)カルボキシルアミド錯体

足立弘樹, 小寺政人, 人見穣

同志社大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻

ctwd0701@mail4.doshisha.ac.jp

P450 に代表される金属依存性酸化酵素は限定された反応空間に基質を適切に取り込み, 酸化活性種である鉄オキソ種によって基質の位置選択な C-H 酸化を達成している。既に, 鉄錯体やマンガン錯体を用いて過酸化水素による選択的なアルカン C-H 酸化が可能であることが報告されているが, これらの錯体触媒に基質酸化のための反応空間を導入し, 選択的なアルカン酸化に成功した例は未だない[1]。我々は, 鉄(III)カルボキシルアミド錯体 Fe-dpaq が, 過酸化水素を酸化剤とする選択的なアルカン酸化の触媒となることを報告している[2]。本研究では, 優れた基質選択性の発現を目指し, トリプチセン構造を有する鉄(III)カルボキシルアミド錯体 Fe-dpaq^{ip3} を合成したので、その合成方法とともにアルカン酸化触媒反応を報告する。

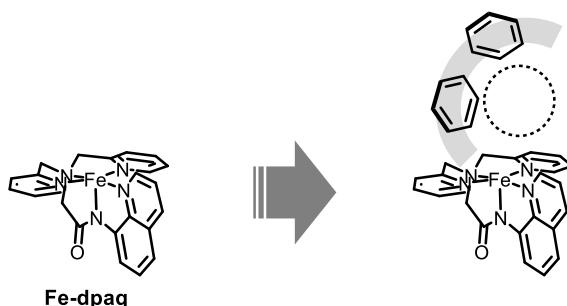


Figure 1. Construction of a reaction space surrounded by benzene rings.

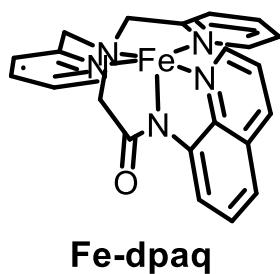
- 1) Fe/Mn complexes fused to a calixarene/resorcinarene receptor have been reported. N. Ségaud, C. De Thomasson, C. Daverat, K. Sénéchal-David, A. Dos Santos, V. Steinmetz, P. Maître, J.-N. Rebilly, F. Banse, O. Reinaud, Chem. Eur. J. 2017, 23, 2894; V. Diego, M. Costas, A. Lledó, ACS Catal. 2018, 8, 3667.
- 2) Y. Hitomi, K. Arakawa, T. Funabiki, M. Kodera, Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 3448.

P06

アルカン酸化を目的とする鉄(III)カルボキシリアミド錯体

上田 純平・小寺 政人・人見 穣
同志社大院理工学研究科応用化学専攻
E-mail address: ctwd0766@mail4.doshisha.ac.jp

生体内では、様々な鉄依存性金属酵素によって炭化水素の酸化が達成されている。そのため、金属酵素を模倣した鉄錯体による選択的アルカン酸化が多く報告されている。酵素同様に、これらの錯体は触媒サイクルにおいて鉄オキソ種を発生し、これを活性種として、基質のC-H結合を活性化する。この際の水素原子引き抜きステップの自由エネルギー差は、鉄オキソ種の酸化還元電位およびオキソ基の塩基性によって決定される。また、その活性化エネルギーは極性効果によっても影響を受けると考えられている。我々は、カルボキシリアミド鉄(III)錯体Fe-dpaqが過酸化水素による炭化水素の酸化に対して良好な選択触媒として機能することを報告している[1]。dpaq配位子のキノリン部位の5位に置換基を導入した結果、dpaq配位子のアニオン供与によって低下した酸化還元電位は、オキソ基の高い塩基性度によって補償され、C-H酸化能力を獲得すると結論している[2]。本研究では、鉄オキソ種による基質のC-H結合活性化の活性を大きく変化させるために、異なる構造を有するカルボキシリアミド鉄(III)錯体を合成した。



- 1) Y. Hitomi, K. Arakawa, T. Funabiki, M. Kodera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3448.
- 2) Y. Hitomi, K. Arakawa, M. Kodera, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 14697.

キノリン骨格を有するレシオ型亜鉛蛍光プローブの開発

岡村麻美, 野村章子, 小寺政人, 人見穣

同志社大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻

ctwd0744@mail4.doshisha.ac.jp

亜鉛イオンは蛋白質の高次構造の安定化や加水分解反応などの触媒活性点として機能するだけでなく、蛋白質に配位していない亜鉛イオンの濃度変化を通して情報伝達物質としても機能していることが判明している。情報伝達の機構を理解するためには、生理学的環境下で亜鉛イオンを迅速に検知し定量できる分子ツールが必要とされる。レシオ型蛍光プローブは、そのような分子ツールの一つであり、これまでに ZnAF-R2 [1] や ZNP1 [2] をはじめとするレシオ型亜鉛蛍光プローブが既に報告されているが、いずれも蛍光量子収率が低い。たとえば、ZnAF-R2 および ZNP1 の蛍光量子収率は、非結合型及び亜鉛結合型のいずれにおいても 0.2 以下である。我々は最近、キノリンを有する H-dpaq 配位子の誘導体に亜鉛イオンを添加すると、その蛍光スペクトルが長波長シフトすることを見出した。さらに、蛍光量子収率を測定した結果、非結合型においては 0.36、亜鉛結合型では 0.54 と既報のレシオ型亜鉛蛍光プローブよりも高いことを見出している。本研究では、H-dpaq 誘導体を基本骨格とし、細胞膜透過性を有する新たな亜鉛蛍光プローブの開発を行ったので報告する。

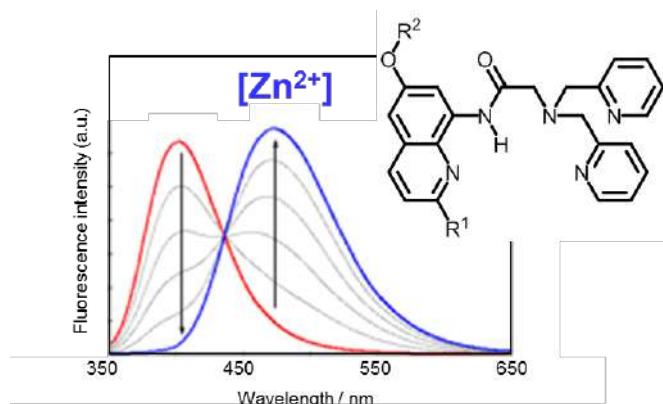


Figure 1. Fluorescence spectral changes of H-dpaq^R upon addition of zinc ions.

[1] S. Maruyama, K. Kikuchi, T. Hirano, Y. Urano, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10650

[2] C. J. Chang, J. Jaworski, E. M. Nolan, M. Sheng, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 1129.

生体内一酸化炭素の選択的除去による概日リズム乱れ

北岸 宏亮・峯岸彩夏・佐上郁子・根木 滋・加納航治
 同志社大学理工学部機能分子・生命化学科
 E-mail address: hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】

動物の体内には内在性の一酸化炭素(CO)が存在する。内在性 CO にはさまざまな生理機能があると提唱されているが、その全容は明らかではない。なぜならば CO はヘム代謝の際の副産物として产生するため、遺伝子ノックアウトによる欠失状態を作ることが困難であるためである。我々はこれまで生体内で CO を選択的に除去できる化合物 hemoCD を開発し、その利用について報告してきた。今回、内在性 CO の選択的除去が生物リズムを司る時計遺伝子の発現リズムに大きく影響を与えることを見出したので、報告する。

【実験】

hemoCD の PBS 溶液をマウスに腹腔投与し、主に肝臓内の時計遺伝子の mRNA 定量を行った。コントロール群として、hemoCD の中心に鉄を持たない Fb-hemoCD を同量投与したマウスを使用した。

【結果と考察】

hemoCD 溶液を投与すると、内在性 CO が除去されて、時計遺伝子群(*Per*, *Cry*など)の発現リズムがいずれも大きく変動した。時計遺伝子の発現には、CO 結合性転写因子タンパク質である NPAS2 が関わっている。そこで NPAS2 の活性を投与の前後で比較した結果、NPAS2 による転写活性が CO の濃度に依存して大きく変化していることが明らかとなった。さらに動物の血中 CO を除去すると、炎症性サイトカインである TNF- α の產生が誘発され、それによる生体内リズムの変動も観測された。一時的な CO の低減は、その後約 19 時間にわたって時計遺伝子の発現に影響することが明らかとなった。

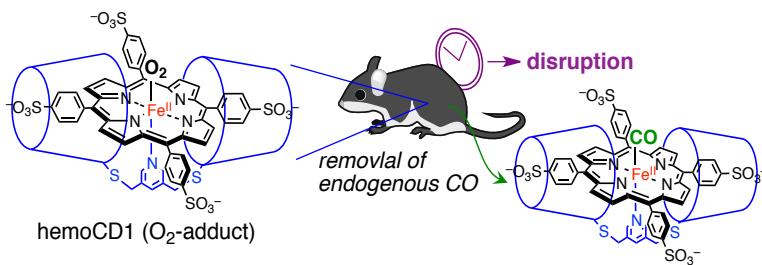


Fig. 1. A flowchart of this study.

【参考文献】

- [1] S. Minegishi, I. Sagami, S. Negi, K. Kano, H. Kitagishi, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11996 (12 pages).

生体内における内因性COの簡便な定量法の開発

毛 齊悦・北岸宏亮

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

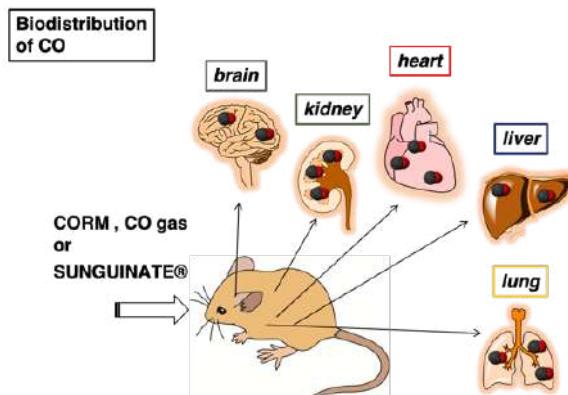
E-mail address: hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】

我々の研究室では以前に高親和性COレセプター分子であるhemoCDを用いて、生体内COの除去およびそれによる生体内反応について検討を行ってきた^{1,2}。hemoCDは生体内のどのヘムタンパク質よりもCO親和性が高いために、内在性CO等も捕捉し、その量を吸収スペクトル変化により簡便に定量できる。本研究では、hemoCDを用いて動物体内的内在性COを定量するとともに、CO放出試薬であるCORMを動物に投与した際に、どの臓器にどれくらいのCOが送達できるのかについて、hemoCDを用いて測定することを試みた。

【実験】

マウスの各臓器のサンプルを摘出し、それらを超音波破碎した。そこへhemoCDの水溶液を加え、その後限外ろ過により不溶性成分やタンパク質を除去した。ろ液の吸収スペクトルを測定し、溶液中に含まれるCO-hemoCDを定量することによって、各臓器に含まれるCOを定量した。さらにCOガスおよびCORM-401を経口投与した後のマウスについても、同様の測定を行った。



【結果と考察】

マウスの内在性CO量はhemoCDを使って測定可能であった。CORM-401を投与すると、各臓器におけるCO量は有意に上昇した。一方、COガスを吸入させたマウスでは、各臓器における有意なCOの増加が観測されず、血液中のCOが上昇するのみであった。このことは、経口投与されたCORMは各臓器に到達されてからCOを放出している可能性があり、COガスでは不可能な臓器へのCOデリバリーを行っていることが、今回のhemoCDを用いた測定により明らかとなった。

【参考文献】

- Kitagishi H., Minegishi S., Yumura A., Negi S., Takiuchi S., Amagase Y., Mizukawa Y., Urushidani T., Sugiura Y., Kano K., *J. Am. Chem. Soc.*, **138**, 5417–5425 (2016).
- S. Minegishi, A. Yumura, H. Miyoshi, S. Negi, S. Takiuchi, R. Motterlini, R. Foresti, K. Kano, H. Kitagishi, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 5984–5991 (2017).

細胞膜透過性の高いCO放出分子の開発

高山実花子・北岸宏亮
 同志社大学理工学部機能分子・生命化学科
 E-mail address: hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】

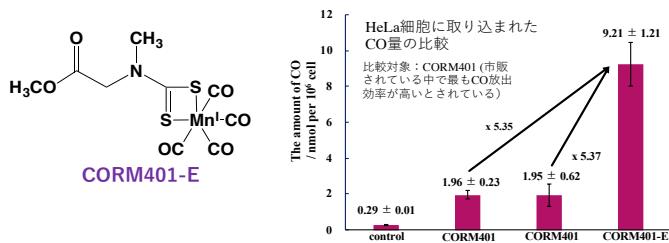
一酸化炭素(CO)放出分子(CORM)は、生体内で微量のCOを放出する分子であり、生体内COによる生理活性の研究に用いられている¹。特にCORM-401(Figure)は水溶性の高いCORMであり、高い生理作用を示すことが報告されている²。しかし水中におけるCORM-401からのCO放出量は明確ではなく、細胞内への導入率も定かではなかった。以前に我々は当研究室で開発した高親和性COレセプターであるhemoCD³を用いて、細胞におけるCORM-401のCO送達量を測定した。その結果、CO送達効率が低く、膜透過性に関して機能改善の余地があると考えた。そこで本研究ではCORM401のカルボキシ基をメチルエステル化することによって細胞膜透過性を向上させたCORM-401^{Me}の合成および機能評価を行った。

【実験】

CORM-401^{Me}はCORM-401にトリメチルシリルジアゾメタンを反応させることによって合成した。得られたCORM-401Meの同定をNMR, MS, IRスペクトル測定により行った。また溶液および細胞内におけるCO放出量の定量をhemoCDを用いて行った。

【結果と考察】

水溶液中においてCORM-401^{Me}はCORM-401と同等のCO放出能を示した。すなわち1分子のCORM-401Meから約3分子のCOが放出されることが、水中におけるhemoCDを用いた吸収スペクトル測定により明らかとなった。CORM-401^{Me}を細胞に加え、その後細胞に取り込まれたCO量をhemoCDによって定量すると、メチルエステル化前のCORM-401と比べて約5倍のCOが取り込まれていることが明らかとなった。これはCORMの膜透過性がメチルエステル化によって向上したことによると考えている。現在はCORM-401Meのさらなる構造解析として単結晶の作成に取り組んでいる。さらに生体内におけるCORM-401^{Me}の詳細なCO放出挙動およびその効果について、動物(マウス)を用いた共同研究により取り組んでいる。



【参考文献】

- Motterlini, R. et al., *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2010**, 9, 728-743.
- Motterlini, R. et al., *Dalton Trans.* **2011**, 40, 4230-4235.
- Kitagishi, H. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 5984-5991.

細胞内CO送達効率
 (細胞内CO/加えたCORM)
 従来のCORM: 2.0%,
 CORM401-E: 10.8 %

Sp1 亜鉛フィンガータンパク質における酸化反応の速度論的解析

岸 果苗¹, 鳥見 優¹, 河原 由佳², 杉浦 幸雄¹, 根木 滋¹

同志社女子大学薬学部 医療薬学科¹, 兵庫県立大学大学院 生命理学研究科²

E-mail address: ykh048@dwc.doshisha.ac.jp

[序] 亜鉛フィンガータンパク質 (ZEP) は真核生物の転写因子に見られる DNA 結合モチーフの一つである。近年、ZEP がレドックス応答を通して細胞内部の酸化還元状態に大きく関与していることが示唆されている。そこで本研究では、3 つのフィンガーを持ち、レドックス反応への関与が言われ

ているヒト転写因子由来の Sp1ZEP (Fig. 1) を用い、その中の 3 番目のフィンガードメインである F3 に特に着目し H₂O₂ との酸化反応について速度論的解析法により検討を行った。

[実験] 各フィンガードメインは、Fmoc 固相合成法により島津 PSSM-8 ペプチド合成機にて合成した。H₂O₂ による酸化反応生成物および酸化反応速度を TOF-MASS および HPLC をそれぞれ用いて検討を行った。

[結果・考察] 一般的に、タンパク質のフィンガードメインを酸化すると、フィンガーによって酸化される速度が異なり、F1 では単純な一次反応の曲線を描き、F2, F3 では逐次反応的な反応曲線がみられ、酸化反応に対する応答性に差が見られることが明らかになった。また、酸化反応のあと HPLC でピークを分取し、分子量を確認すると各フィンガーで約 2 の分子量の減少がみられ、このことから、分子内でジスルフィド結合が生成していることが明らかになった。そのほかに F2, F3 では分子量が 16 増加した、酸素付加が起こっていると考えられる別の生成物が得られた。F2, F3 で酸化される場所としてシステイン残基の他にメチオニン残基があるが、酸素付加のパターンとしてシステイン残基間のジスルフ

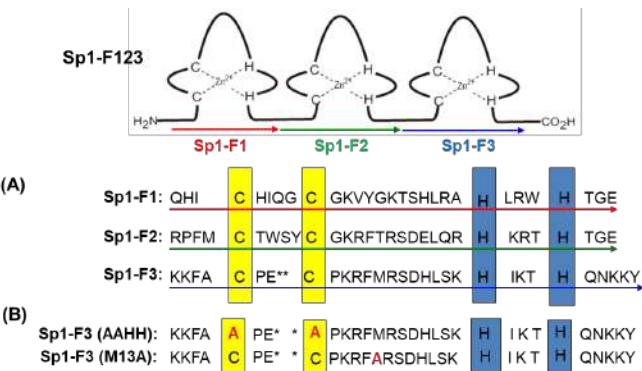


Figure 1. Sp1 zinc finger protein (Sp1-F123) with 3 zinc finger domains. Each domain has a typical Cys₂His₂-type zinc finger motif as a DNA-binding domain. (A) Primary sequence of each Sp1 finger domain (Sp1-F1 (red), Sp1-F2 (green), and Sp1-F3 (blue)). (B) Primary sequence of mutant peptides of Sp1-F3 (Sp1-F3(AAHH), and Sp1-F3(M13A)). Mutated amino acid residue is highlighted by red color. Cys and His residues participating the Zn(II) coordination are yellow and blue boxed, respectively.

イド結合に酸素付加が起
 こると、メチオニン残
 基に対して酸素付加が起
 こる二通りが考えられ
 る。そこで酸素付加の場
 所を特定するために、シ
 ステイン、メチオニンを
 それぞれアラニンに置換
 した変異体を作製し、そ
 れに対して酸化反応を行

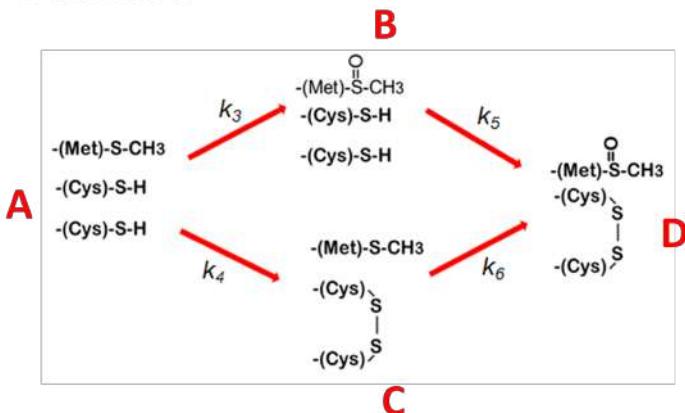
うことで、従来報告されていたシステインに対して酸素付加が起こるのではなく、メチオニン残基に酸素付加が起こっていることが明らかになった。

本研究では、F3 をターゲットとしてシステインとメチオニンの酸化反応のメカニズムをより詳しく検討するため、システインとメチオニンが併発して酸化していく反応モデルを考え (Scheme 1)、それぞれの反応について速度定数を算出した。どちらかの残基が還元された状態で、もう一方のアミノ酸の酸化を個別に観察することはできないので、システインとメチオニンの変異体を酸化させることで近似的な速度定数を求め、反応途中の生成物を得られる反応経路に関しては直接速度定数を算出した。この速度定数を用いて野生型の酸化のシミュレーションを行い、実際に F3 の野生型を酸化させたプロットに対してフィッティングを行った結果、考えた反応モデルに則した速度定数を得ることができた。

[引用文献]

- (1) Xu, Y and Wilcox, D. E. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120, 7375–7376.

Scheme 1



(エレクトロスピニング法を適用した放出制御型製剤の調製：
アセトアミノフェン含有ナノファイバー錠の薬学的評価)

(○羽森 真美, 芝田信人)

(同志社女子大学薬学部医療薬学科)

E-mail address: mhamori@dwc.doshisha.ac.jp

【緒言】

エレクトロスピニング (ES) 法は、数十から数百ナノメートルオーダーのナノファイバーを形成する技術である。この方法は、古くから繊維業界においてナノメートルサイズの不織布の製造方法として研究してきた。一方、薬剤学の分野においてドラッグデリバリー (DDS) の概念により、医薬品製剤に吸収促進や放出制御の製剤設計を施す研究がなされ、深刻な副作用の軽減や患者のノンコンプライアンスの改善に多大な寄与を果たしてきた。

演者らは、ES 法により高分子溶液から調製されるナノファイバーを薬物放出制御の支持体として、提供できるのではないかと考えてきた。そこで、ES 法によるナノファイバーを調製する手法を開発し、調製したナノファイバーを製剤中の薬物放出の支持媒体として利用する新規の放出制御型製剤の開発を行ってきた。本研究では、ES 法によりアセトアミノフェン (AAP) 含有ナノファイバーを調製し、調製したナノファイバーから錠剤への応用を試み、*in vitro* 溶出試験およびラット *in vivo* 十二指腸投与試験を実施し製剤評価を行った。

【実験】

ナノファイバーを調製するための高分子に pH 7.0 以上で溶解するメタクリル酸コポリマー S (MAC) を使用し、ES 法による AAP 含有ナノファイバーの調製を行った。その後、ナノファイバーを直接打錠法にて打錠することにより放出制御型製剤の設計を行い、薬剤学的評価を実施した。評価として、打錠圧を変えた場合および溶出相の pH を変えた場合の *in vitro* 溶出試験により薬物溶出挙動を調べた。さらに、ラット *in vivo* 十二指腸投与試験により、投与後の体内動態を検討するとともに X 線 CT により消化管内移動を追跡することで、放出制御型製剤としての有用性を確認した。

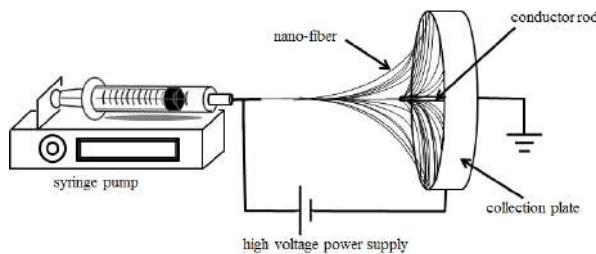


Fig. 1 Device and principle of the ES method

【結果・考察】

ES法を利用して AAP 含有 MAC ナノファイバーから錠剤を調製し、薬剤学的検討を行った。SEM 画像からナノファイバー錠剤（NFT）表面にはナノファイバー間相互の絡み合いによる網目構造が観察された。加えて、打錠圧の増加にともない、ナノファイバー間の隙間がより緻密になることが観察された。*In vitro* 薬物溶出試験では、コントロールである単純混合物錠剤（PMT）と比較して NFT の初期溶出速度は抑えられ、薬物放出制御が認められた。また、ラット *in vivo* 十二指腸投与試験では、NFTにおいて試験時間中での明確な血漿中薬物濃度のピークを捉えることはできなかったものの、PMT に比べて薬物血中濃度の持続性に著しくすぐれた特徴を有することが分かった。これは、MAC が pH 感応性の高分子であること、NFT では薬物がナノファイバー内にアモルファス状態で包埋されていることに起因すると考えられた。すなわち、低 pH 領域では、水分による浸潤のみが NFT 表面から徐々に膨潤することで薬物溶出するものと考えられた。一方、pH 7.0 以上の領域においては、MAC 自身が溶解することから、水分による膨潤に加え MAC の溶解に起因する薬物溶出の占める割合が高くなるものと考えられた。

【結語】

ES法により調製した AAP 含有 MAC ナノファイバー錠は、打錠時に添加剤を添加することなく簡便に錠剤調製することを可能にし、またナノファイバーを錠剤にすることで放出制御型かつ徐放化製剤の設計に有用であり、DDS 設計において MAC ナノファイバーは放出支持体としての応用性を提供するものと考えられた。

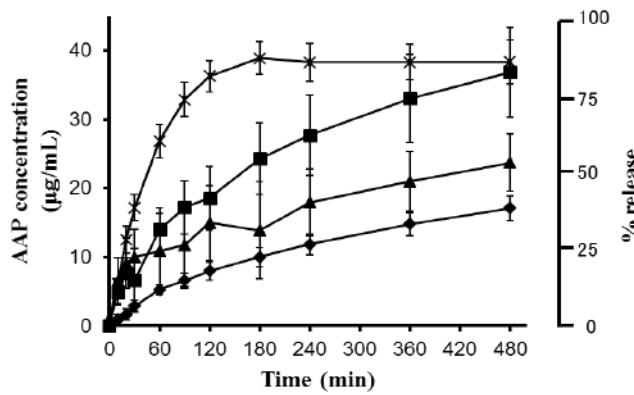


Fig. 2 *In vitro* dissolution profiles of AAP

Key: ◆, NFT; ■, NFT_{adso}; ▲, NFT_{half}; ×, PMT.

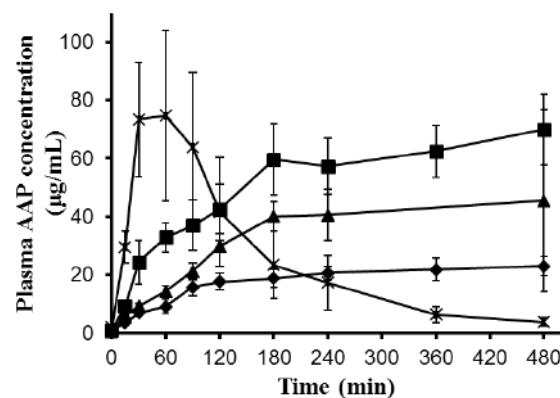


Fig. 3 Plasma concentration-time curves of AAP after

intruduodenal administration

Key: ◆, NFT; ■, NFT_{adso}; ▲, NFT_{half}; ×, PMT.

タンパク質様の単鎖フォールディングを目指したマルチブロック型ペプチド-ポリマー・ハイブリッドの設計

西村 慎之介・東 信行・古賀 智之

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

E-mail address: tkoga@mail.doshisha.ac.jp

[緒言] 一本の高分子鎖が折り畳まれて形成されるナノ粒子は、DDS キャリヤーや触媒、生体高分子モデルとしての可能性を秘めた新しいナノマテリアルである。本研究では、 β -シート性のテトラロイシンと温度応答性のグリシン由来ビニルポリマーからなるマルチブロック型ハイブリッド ($[(\text{Leu})_4-b-\text{PNAGMe}_n]_m$) の単鎖フォールディング形成について報告する (Fig. 1)。これまでに、環状ペプチド開始剤を用いたニトロキシド介在重合 (NMP) によるマルチブロック型ハイブリッドのワンステップ合成法を開発してきた¹⁾。この手法により温度応答性の $[(\text{Leu})_4-b-\text{PNAGMe}_n]_m$ を合成し、水中でのフォールディング挙動について検討した。

[実験方法、結果及び考察] 環状テトラロイシン開始剤を用いた NMP により NAGMe の重合を行った。SEC 測定より、 $[(\text{Leu})_4-b-\text{PNAGMe}_n]_m$ の M_n は 80400 g mol^{-1} , $D=2.89$ であった。また、ラジカル交換反応によるフラグメント化実験より、構成するジブロックユニットの M_n は 12100 g mol^{-1} , $D=1.25$ (マルチブロック数 $m=7$) であることがわかった。このマルチブロックポリマーは水中で LCST 挙動を示し、昇温-降温サイクルを繰り返すことで β -シート形成が促進された。そこで、温度サイクル後のモルフォロジーを AFM 及び TEM により評価した (Fig. 1c)。均一な形状・サイズのナノ粒子が観察され、基板上での形態(半楕円球)を基に溶液中の粒子径を算出したところ、 19.3 nm となった。この値は DLS 測定より評価された 20 nm と良く一致する。また、Nile Red をプローブに用いた蛍光分析から、温度サイクルに伴い疎水性ポケットが形成されることを確認した。以上より、このマルチブロック型ハイブリッドは、疎水性 $(\text{Leu})_4$ ブロック間の相互作用により折り畳まれ、親水的な PNAGMe ブロックが表面を覆うように単鎖フォールディングすることが明らかとなつた (Fig. 1b)。

1) S. Nishimura, N. Higashi, T. Koga, *Polym. Chem.*, **2019**, *10*, 71-76.

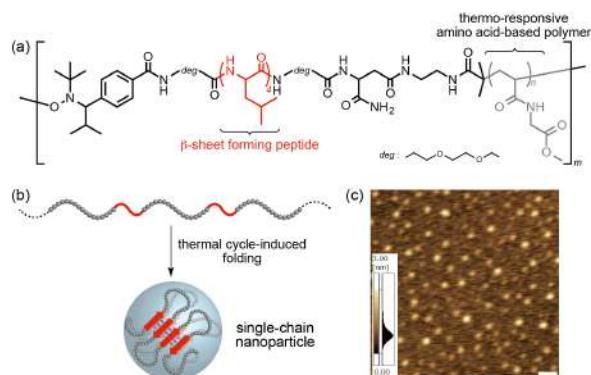


Figure 1. (a) Chemical structure of a multiblock hybrid polymer composed of alternating aligned tetraleucine and thermo-responsive Gly-derived vinyl polymer. (b) Schematic illustration of the folding process to from single-chain nanoparticles via intramolecular cross-links among the peptide multiblocks. (c) Tapping-mode AFM image of the folded hybrid polymer on mica; scale bar = 200 nm . [Polymer] = 0.05 wt%.

GFP を構造モデルとする四分岐型ペプチド-ポリマー・コンジュゲートの合成とその特性

○太田奈恵、東 信行、古賀智之
 同志社大学理工学部機能分子・生命化学科
 E-mail address: nhigashi@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】緑色蛍光タンパク質 (GFP) は生物分野や医学分野で広く応用されている蛍光標識である。GFP は三次構造 (β -バレル構造) の形成に基づいて、コアセグメント (FSYGV 配列) がその内部の疎水的な環境に置かれ立体規制がかかることで蛍光種を形成する。本研究では、これまでに当研究室で得た知見を発展させ、ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドを四分岐型の構造にすることで FSYGV ペプチド周囲の環境がより疎水的になり、より効率的な立体規制をかけることができると期待した (Fig. 1)。具体的には、疎水性セグメントに LSCT 型のポリ N-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAM)、親水性セグメントにポリアクリル酸 (PAA) を用いた。RAFT 重合法を用いた四分岐型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合成と、水中での蛍光発光特性について報告する。

【結果と考察】ペプチド固相合成法により 4 つの RAFT 部位を持つペプチド連鎖移動剤を合成した。次にこれを用いて NIPAM 及びアクリル酸 *tert*-ブチル (tBA) を順に RAFT 重合した。最後に *tert*-ブチル基の脱保護することで **1** (m, n) を得た。

まず、水中での温度応答性を検討した。PAA ブロックをもたない FSYGV-(*b*-PNIPAM₉₆)₄ では約 29°C に LCST を示したが、**1** ($m = 96, n = 148$) では 60°C まで溶解した状態であった。また、AFM 像および TEM 像からも Fig. 1b のような単分子ミセル様の分子内会合形態を形成していると考えられる。次いで、pH 12 での蛍光特性を調べた。PNIPAM ブロックの LCST 29°C を挟む 4°C と 60°C の間でサーマルサイクルを行うと、見事に 460nm に青緑色蛍光を示し、且つ蛍光強度が上昇することがわかった。FSYGV ペプチドセグメントが蛍光種形成に適切な環境を作り出したためであると考えられる。

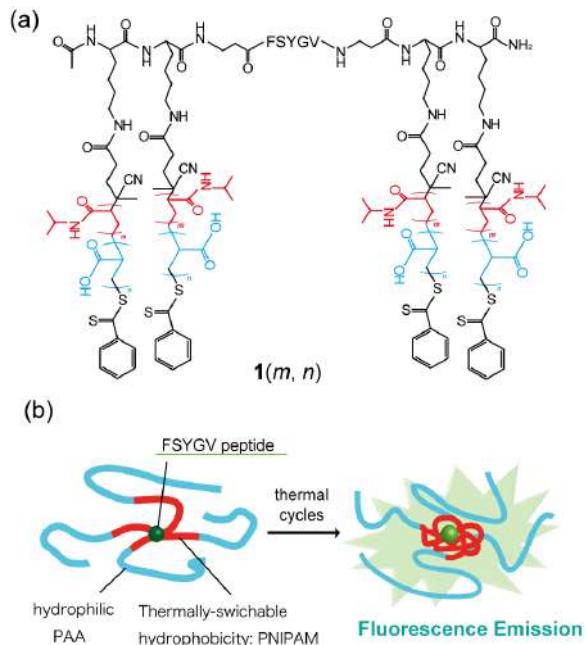


Figure 1. Chemical Structure of four-armed thermo-responsive hybrid polymer (a) and its schematic model for fluorescence emission mechanism (b).

P 1 5

pH 勾配で駆動される分子集合体運動の解析

中尾友紀¹, 名和愛利香², 山本大吾¹, 塩井章久^{1*}

(¹ 同志社大学院理工学研究科, ² 同志社大学研究開発推進機構)

ashioi@mail.doshisha.ac.jp

我々のグループでは、これまで pH 勾配下で安定した周期的運動を示すベシクルについての研究を行い¹⁾、昨年度までの研究でベシクルを動かす駆動力の大きさについて見積もることを行った。本年度は、この駆動力の大きさの pH 勾配に対する依存性をより正確に評価し、駆動力がなす仕事をについての考察から見積もった膜弾性率の妥当性を光ピンセットを用いた実験により検討した。その結果、両者の方法で評価した膜弾性率の値がほぼ一致し、見積もったベシクルの駆動力の大きさが妥当であることがわかった。

ベシクルはストマトサイト様の構造をしており、pH 勾配に起因する駆動力は Fig.1 のように作用していると考えられる。 f_s , f_b の両方において、駆動力の大きさは 10^{-1} pN のオーダーと見積もられることは、昨年度の成果報告会で発表したとおりである。この力によってベシクルは Fig.1 のように回転し、これによって $(f_s + f_b)d$ のポテンシャルを失う。しかし、回転後に図に示す反転運動がおこりポテンシャルを回復する。この反転は膜弾性により駆動されるとすると、膜弾性率を κ として $(f_s + f_b) \times d \sim \kappa(1/d)^2 \times \pi d^2$ が成り立ち、実験結果より $\kappa \approx 1-10 k_B T$ と見積もられる。

一方、光ピンセットでポリエチレン粒子を動かしてベシクルを変形させ、その後の形状回復の速度を測定した。このとき、ポリエチレンビーズが動く速度に Stokes の抵抗則を適用して、これがベシクル膜の弾性力に等しいと近似し、この過程でベシクル膜がなす仕事を評価した。この方法で膜弾性率を評価したところ、やはり $\kappa \approx 1-10 k_B T$ と見積もられた。

これらの結果から、ベシクル運動の駆動力の評価は妥当であったと結論できる。

(1) E. Nawa et al., *Soft Matter*, vol.9, 7832-7842, 2013.

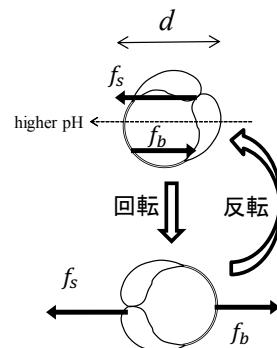


Fig.1 pH 勾配下でのベシクルの回転と反転



Fig.2 光ピンセットによるベシクルの変形と膜弾性による回復

ガラス管内で油水液滴が示す運動の同期現象

P 1 6

笠井恆宏¹, 名和愛利香², 山本大吾^{1*}, 塩井章久¹

(¹ 同志社大学大学院理工学研究科, ² 同志社大学研究開発推進機構)

E-mail address:dyamamot@mail.doshisha.ac.jp

[緒言]

油水液滴の自発運動は、ガラス壁面と油水界面接触線近傍で、水相に存在するガラス壁面上のカチオン性界面活性剤と油相に存在するアニオンが反応することで生じる運動である。この運動は化学反応を直接運動エネルギーとして変換しており、生態系と類似したエネルギー変換システムとして注目されている。また、同期現象とは、何らかの相互作用によって、異なる振動子の振動のリズムが揃う現象である。同期現象は生命現象によくみられ、その研究は、生命現象を理解する助けになるとともに、ミクロな動力の增幅原理となるため工学的応用が期待される。現在同期の数理モデルは発展しつつあるものの、実験サイドからの研究は進んでいないのが現状である。そこで本研究では、同期について実証的研究を行い、同期についての理解を深めることを目的とした。

[実験方法]

水相は、カチオン性界面活性剤であるトリメチルステアリルアンモニウムクロリド(TSAC)濃度が 50 mM となるよう超純水を用いて調製した。油相は、トルエンとニトロベンゼンを体積比 6:4 で混合した溶液に、ヨウ素濃度が 20 mM となるように入れ、ヨウ化カリウムを飽和させて調製した。Fig. 1 で示すように、水平に置いたガラス管内で水相の両端に油相を接触させると、油・水・油で連結した液滴(油水液滴)がガラス管内を漏れ出すことなく往復運動する現象が観察された。この往復運動を 4 本のガラス管内でそれぞれ発生させ、水上に浮かべた発泡スチロール板(船)の上に置き、相互作用させることで同期の実証的研究を行った(Fig. 2)。相互作用は液滴運動が誘起する船の運動によって発生する。

[結果と考察]

結果を Fig. 3 に示した。1.5 s 付近ではそれが独立であった液滴の往復運動が、30 s 付近では位置をそろえた状態で運動していることが分かる。液滴がガラス管内を 1 往復するごとに位相が線形的に 2π 増加するとして、ガラス管 i ($i = 1, 2, 3, 4$) から ${}_4C_2$ 通りの位相差 $\Delta\phi(t)$ を計算した。これにより求めた $\Delta\phi(t)$ を 2π の剰余として $-\pi \sim \pi$ の範囲で示し ($\Delta\phi'(t)$)、経過時間に対してプロットした (Fig. 4)。 $\Delta\phi'(t)$ は、液滴の往復運動の周期が一致すれば一定値をとり、ガラス管方向に沿った位置も一致すれば 0 となる。水上に置かれたガラス管内の液滴間の位相差は 10~60 s(約 70 往復)の間およそ 0 付近で一定値を保っており、同位相で同期していることが分かる。ガラス管内での液滴運動を水上で同期させた相互作用は、2 つに大別できると考えられる。1 つは運動量保存により、液滴の運動に伴って船が液滴とは逆位相で前後運動することで生じる慣性力であり、もう 1 つは液滴の重さによって液滴と同位相で上下に傾くことで生じる重力の影響によるものである。これらの相互作用が周期的に液滴に発生することによって液滴運動が同期したと考えられる。

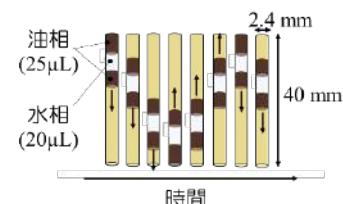


Fig. 1 液滴の往復運動

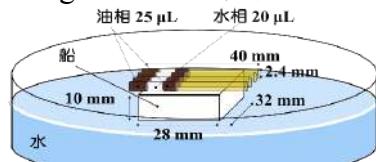


Fig. 2 実験概略図

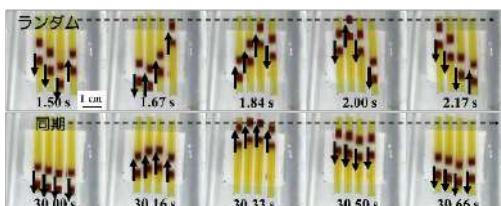


Fig. 3 実験結果

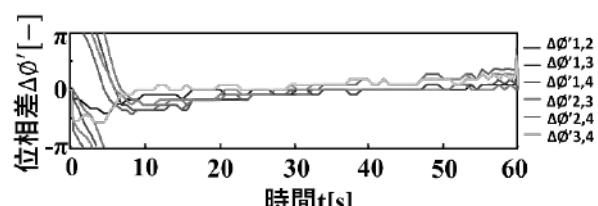


Fig. 4 位相差

直流電場下での油相中粒子の運動

柿本一朗¹, 名和愛利香², 山本大吾^{1*}, 塩井章久¹

(¹同志社大学大学院理工学研究科, ²同志社大学研究開発推進機構)

E-mail address: dyamamot@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】 近年、微細加工技術によるマイクロデバイスの研究開発が盛んに行われておる、微小空間で効率的に駆動する動力の構築が必要となつてゐる。しかし、液相の微小空間ではレイノルズ数が極めて小さく粘性支配の空間となるため従来の動力システムをスケールダウンした際、粘性摩擦によりエネルギー効率が著しく低下する問題が生じる。この問題を解決するために新たな動力システムの開発を目的とし、本研究室は界面活性剤を含む油相中に電極と微粒子を設置し直流電圧を印加することで起る周期的運動に着目している。本研究では微小空間における直流電場下での粒子の運動および対流の特性の解明を試みている。これまでの研究でコイル形状のスピルリナ粒子がコークスクリュー運動や振動運動を示すことから、今回はスピルリナ粒子を炭化させた際に運動がどのように変化するかを観察した。また、過去の研究で電極間距離を変化させることで運動モードと液相の対流が変化したことから、トレーサーを用いて電極高さによる対流の変化を観察した。

【実験方法】 実験装置の概略図を Fig.1 に示す。分散媒にシリコンオイルを用いてアニオン性界面活性剤 Di-(2-ethylhexyl)phosphate が 0.5 M になるように調製した溶液に微粒子を分散させた。スピルリナを 300 °C の温度まで加熱することで炭化させたコイル粒子（提供：防衛医科大学 鎌田香織講師）を用いて運動を観察した。また、対流を観察するために、トレーサーとして平均粒子径 11 μm のポリエチレン(PE)粒子を用いた。粒子分散溶液に針状電極を挿し込み一定の直流電圧を印加した後、光学顕微鏡を用いて粒子の運動を観察した。

【実験結果と考察】 炭化コイル粒子が電極間を移動する振動運動の一例を Fig.2 に示す。Fig.2 の (a) は振動運動 1 周期分のスナップショット、(b) はコイル粒子のある一点と陰極先端との距離の時間変化である。Fig.2 (b) に注目すると陰極から陽極へ炭化コイルが運動する際、粒子が加速していくことが見て取れる。また、陽極から陰極へ粒子が移動する方が逆向きの動きよりも速いこともわかる。さらに、陰極に接した際には陰極に止まる時間が存在しているが、陽極に接触している時間は極めて短いこともわかる。また、炭化コイルの振動運動を観察できた際の振動数とその際の電場の強さの関係を Fig.3 に示す。電場は電極間距離からコイルの長さを引いた距離で印加電圧を割ったものとした。比較的低電場の領域では電場に対して振動数が単調に上昇するが、比較的高電場の領域では振動数にばらつきがあった。ばらつきが生じる原因については現在わかっていないが、スピルリナを炭化する際の温度を変化させて作製した炭化コイルを用いるなど、操作条件を様々な変化させて詳細に検討する予定である。

次に、電極高さの条件を変えたときに観察できた PE 粒子の流れの様子を Fig.4 に示した。両電極の先端の高さが等しい (a) では陽極先端部に粒子が引き寄せられ先端から出ていく渦を巻くような流れが観察された。陰極を溶液上の空气中に出した (b) では陰極は溶液から離れたものの流れは (a) と同様な流れが陽極付近で発生していた。これに対して陽極を溶液上の空气中に出した (c) になると流れは発生しなかつた。さらに陽極がスライドグラスに触れた (d) では陰極の先端から粒子が流れ出る様子が観察できた。陰極がスライドグラスに触れた (e) の場合では (a) や (b) と似た流れが観察できた。この結果から、溶液の流れは陽極から発生すると考えられる。このメカニズムとしては、油相中に含まれるアニオン性界面活性剤 DEHPA の電気泳動によるものと考えられる。しかしながら、このメカニズムでは陰極付近でも同様に流れが発生可能であるにもかかわらず、粒子の流れは観察できなかつたため、対流の発現にはその他の要素が関わっていると考えられる。

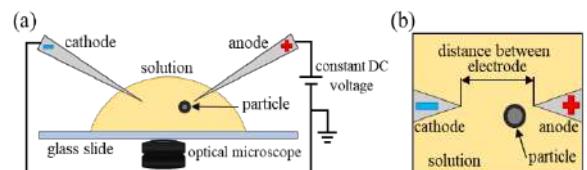


Fig.1 (a) Side view and (b) top view of the experimental

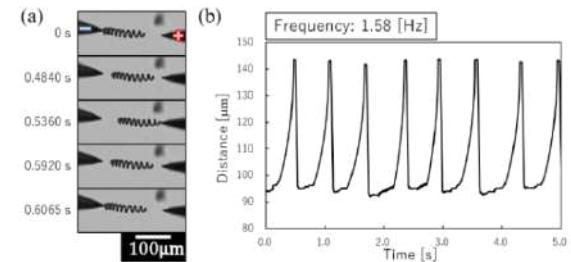


Fig.2 Oscillation motion of a carbonized coil: (a) Snap shots for one period, (b) time change of the distance between the coil and the cathode tip.

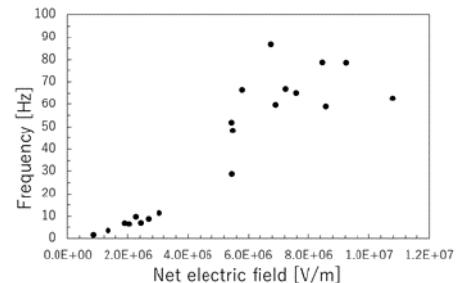


Fig.3 The relationship between the net electric field and the frequency of the oscillation motion with the coil particles carbonized at 300 °C.

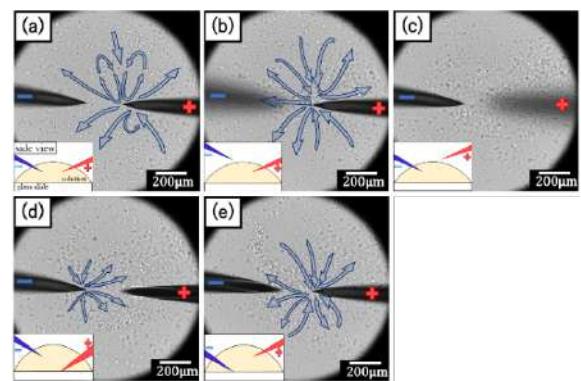


Fig.4 Flow induced by the differences of electrodes position.

エマルションシステムを利用した新しいドラッグデリバリー

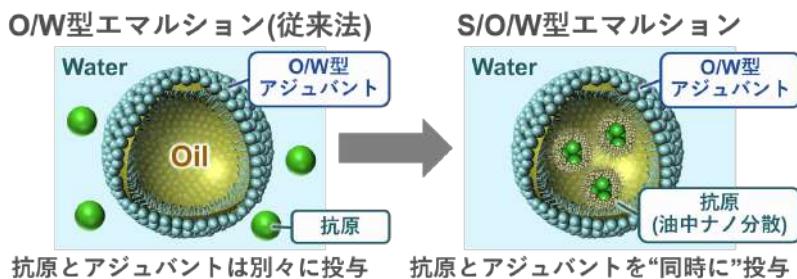
田原義朗、松本道明

同志社大学理工学部化学システム創成工学科

E-mail ytahara@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】

ワクチンとは病原体由来の抗原を体内に投与し、抗原特異的な免疫を増強・記憶させることによって、以後、その病気にかかりにくくすることを目的としている。近年では理工学的な材料設計に基づくワクチンキャリアが報告されており、大きな成果をあげている。本研究ではヒトに投与可能な成分のみで構成されている solid-in-oil-in-water (S/O/W) 型エマルションを開発し、実用性が高く、抗原とアジュバント（免疫活性化剤）を同時にデリバリー可能なシステムの開発を試みた。



【実験・結果・考察】

S/O/W型エマルションを遠心分離によって、水相と油相に分離することで求めた抗原の封入率は約 75% であった。また動的光散乱測定によって平均粒子径は 375 nm と分かり、共焦点顕微鏡観察によって油相内部への抗原の封入も確認された。以上より S/O/W 型エマルションは、抗原を O/W 型エマルションの油相に封入した新規ワクチンキャリアであることが示唆された。さらに抗原提示細胞であるマウス腹腔由来マクロファージ (RAW) 細胞への取り込みについてフローサイトメトリーによって評価したところ、既存の O/W 型エマルションよりも効率よく抗原を細胞へデリバリーできることが分かった。また S/O/W 型エマルションの油相に toll-like receptor リガンドである R848 分子を加え、RAW 細胞へのデリバリー実験を行なった場合、R848 によって共刺激マーカーである CD40 や CD80 を発現した細胞について、より多くの抗原がデリバリーされていることが分かり、抗原とアジュバントの同時送達を達成したことが明らかとなった。

p-アミノチイルラジカルの分光測定からみた イオン液体の溶媒和過程

藤井香里¹⁾、遠藤太佳嗣²⁾、木村佳文^{1), 2)}

同志社大学理工学研究科¹⁾、同志社大学理工学部²⁾

E-mail address: cyjc1701@mail4.doshisha.ac.jp

カチオンとアニオンから構成され、常温で液体であるイオン液体(ILs)中では、一般的な分子性液体とは異なる分子ダイナミクスが数多く観測されている。本研究では、溶質分子の分子内電荷分布の変化に応答して、溶媒である ILs が再配向する過程(溶媒和過程)に着目した。溶質分子として p-アミノフェニルチイルジスルフィド(ATP ジスルフィド、Fig. 1 参照)を用いた。この分子はUVパルスの照射によってS-S結合が開裂し、発光性である ATP ラジカルが生成する。光解離反応に伴って分子の極性が大きく変化することから、周囲の溶媒のドラスティックな配向過程が期待される。そこで、この分子の光解離後の過渡吸収、発光スペクトルの時間変化を二段励起分光測定システムを用いて測定し、光解離反応に伴う ILs の溶媒和過程の解明を試みた。

光解離後のラジカルの吸収、発光スペクトル測定には、ポンプ光(266 nm、285 nm)を照射したのちにプローブ光(白色連続光または 570 nm)を照射する二段励起システムを構築し、測定を行った。ILs にはカチオンのもつアルキル炭素数が異なる数種類のホスホニウム系 ILs を用いた。ILs は使用する前に真空乾燥させた。

Fig. 2 は光解離後の過渡吸収スペクトルの時間変化である。ラジカルのバンド($\sim 17500 \text{ cm}^{-1}$)が時間とともに低エネルギー側にシフトしていることがわかる。解析の結果、ラジカルへの溶媒和により、700 cm^{-1} 程度バンド位置がシフトすることがわかった。Fig. 3 は異なる三種類のイオン液体中に測定したラジカルの発光スペクトルのピーク位置の時間変化である。どの ILs においても、ラジカルの発光スペクトル位置のシフト量は小さく、むしろ時間とともに高エネルギー側にシフトしていることがわかる。これらの得られた結果が光解離生成物に特有の結果であるのかということに着目し、解析を進める予定である。

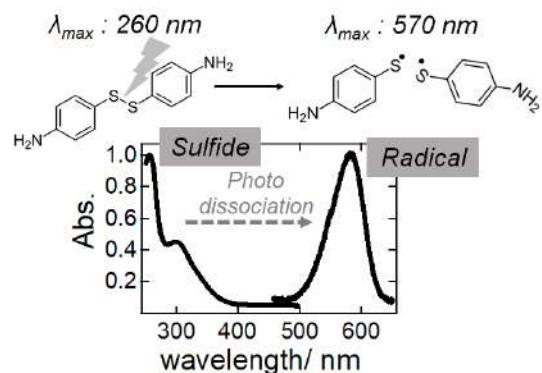


Fig. 1 Spectral shift in the absorption spectrum with the photodissociation of aminophenyl disulfide

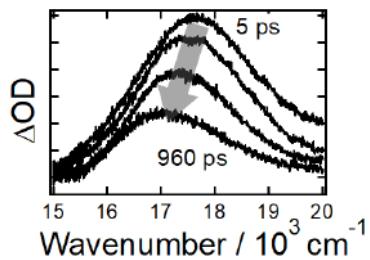


Fig. 2 Transient absorption spectrum of ATP radical in $\text{P}_{2225}^+\text{NTf}_2^-$

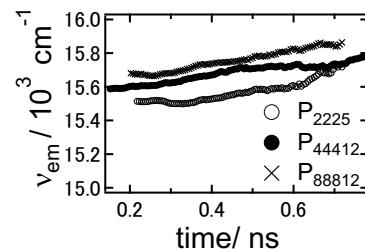


Fig. 3 Emission spectrum shift of ATP radical in ILs

P20

Photoactive Yellow Protein の構造および 光サイクル反応に対する水和イオン液体の効果

梅崎詩菜・遠藤太佳嗣・木村佳文

同志社大学 理工学部機能分子・生命化学科

E-mail address: jt-jjc12@mail.doshisha.ac.jp

近年、イオン液体が生態適合性を有するという報告が多くなされている。その中で、コリニウムカチオンとリン酸二水素アニオンからなる塩([ch][dhp])に水を加えた水和イオン液体(Hy[ch][dhp])は、タンパク質の溶解性が高く、その活性を長期間保存できることが知られている。本研究では、Hy[ch][dhp]のタンパク質構造に対する効果を解明するため、緩衝溶液中と Hy[ch][dhp]中での Photoactive Yellow Protein (PYP)の光サイクル反応に伴う構造変化の違いを過渡回折格子レーザー分光法(TG 法)で観察した。PYP は光受容タンパク質の一種で、青色の光を受容すると Fig.1 に示される光サイクル反応が進行する。過去の研究から、PYP の N 末端 α -ヘリックスが光サイクル反応の過程 (pR₂→pB) で一度解け、基底状態に戻る際 (pB→pG) に巻き戻ることが分かっている。

緩衝溶液中の PYP の TG 信号を Fig.2 上に、
 Hy[ch][dhp] 中での TG 信号を Fig.2 下に示す。これらの図から、緩衝溶液中では三つのピーク(ただし Fig.2 では一つ目のピークは省略してある)が見られる。一つ目のピークは熱の拡散を、二つ目のピークは光サイクル中の吸収変化を、三つ目のピークは pB と pG の拡散を、それぞれ表している。最後のピークは pB と pG の α -ヘリックス構造が異なるために得られるものである。一方で、Fig.2 下の TG 信号は二つのピークしか見られない。過去のモデルを基に、この信号のフィッティングを行った結果、Hy[ch][dhp] 中では pB と pG の拡散係数が同じであることが分かった。この結果から、Hy[ch][dhp] 中では、光サイクル反応において、pB と pG の構造が同じであると考えられる。つまり、
 Hy[ch][dhp] 中では PYP の α -ヘリックス構造が変化しないと考えられる。

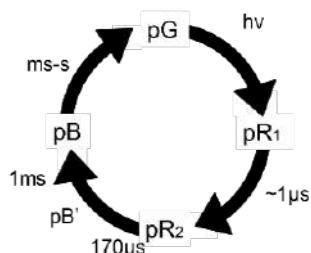


Fig.1. Photocyclic Reaction of PYP

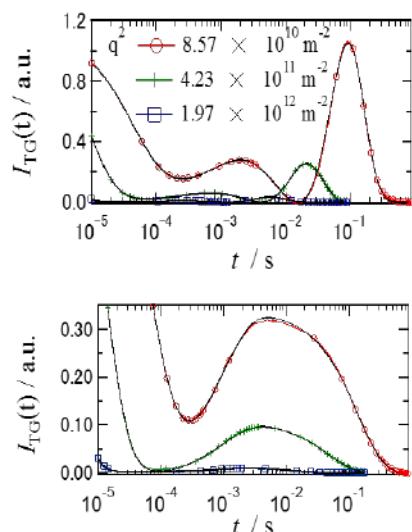


Fig.2 TG signals of PYP at three different q^2 , where $q = 2\pi/\Lambda$, and Λ is the grating fringe space. The upper figure shows the results in conventional buffer solution, and the lower shows the results in Hy[ch][dhp].

蛍光相關分光法によるイオン液体中のタンパク質の 揺らぎ観測の試み

川口匠吾・中谷祐也・木村佳文
同志社大学大学院理工学研究科応用化学専攻
同志社大学理工学部機能分子・生命化学科
yokimura@mail.doshisha.ac.jp

イオン液体は室温付近において液体状態で存在する塩で、難燃性や不揮発性などの特徴を有する。コリン二水素リン酸 ([ch][dhp], Fig. 1) は、水に溶解するとイオン液体様の性質を示す。この“水和された”イオン液体はタンパク質に対して高い親和性をもつことが示されており、近年注目が高まっている。しかし、水和イオン液体がなぜこのような親和性を示すのかは十分明らかになっていない。本研究では蛍光相關分光法(FCS)ならびに蛍光異方性分光法を用いて、水和[ch][dhp]中における牛血清由来のアルブミン(BSA, Fig.1)のダイナミクスを測定し、水和イオン液体がタンパク質の高次構造に与える影響を解明することを目指した。

実験には主に 50 wt% 水和 [ch][dhp] を調製してもらいた。アルブミンは、蛍光測定用に 34 番目のシステイン残基をチオール反応性の Alexa

Fluor™ 488 C₅ Maleimide で標識した。FCS の測定には、共焦点レーザー顕微鏡システム(Nikon A1)を用いた。励起光源には波長 481 nm, 繰り返し 40 MHz のダイオードパルスレーザー(LDH-D-C-485, Pico Quant)を使用した。蛍光異方性も同じシステムで測定した。

Fig. 2 に 50wt%水和 [ch][dhp] 中における FCS から得られた自己相關関数を示す。ラベリングの際にのこったフリーの蛍光色素が十分除去されず、初期ダイナミクスの観測が困難であったが、信号の解析から、タンパク質の拡散係数が水溶液中と比較して大きく変化していることが明らかとなった。

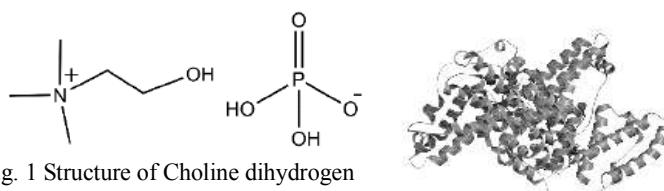


Fig. 1 Structure of Choline dihydrogen phosphate and Ribbon model of Albumin from bovine serum.

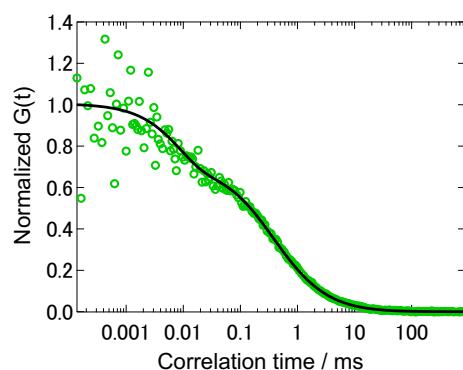


Fig. 2 FCS trace with a fitting curve of Alexa 488 labeled to a side chain of BSA in 50wt% Hy[ch][dhp]. (at 25 °C)

P 2 2

時間遅れを伴う非線形発振回路の光結合

斎藤美和, 吉川研一, 劍持貴弘, 貞包浩一朗

同志社大学大学院生命医科学研究科 医工学・医情報学専攻

E-mail address: (ctud1026@mail4.doshisha.ac.jp)

【緒言】

神経細胞は信号の伝達に、軸索では電気的、シナプス間隙では神経伝達物質を用いた化学的な方法をとっている。シナプス間隙での伝達は軸索でのそれに比べて時間がかかる。この細胞間の時間遅れが、脳での神経ネットワークの情報処理に重要な役割を担っていると考えられるが、その詳細は不明となっている。本研究では神経細胞ネットワークの実空間モデルとして、非線形発振電子回路を取り上げた。

【実験】

実験には、自律的に一定のリズムで矩形波を発振する非線形発振回路を細胞興奮のモデルとし、そのネットワークを構築した。使用した発振回路は抵抗、オペアンプ、コンデンサ、LED で構成される。回路図を図 1 に示す。

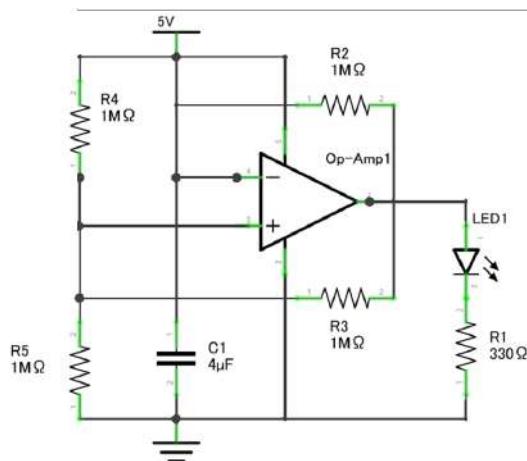


図 1. 非線形発振回路 回路図

この系では神経細胞を振動子、回路の出力は神経細胞の発火、入力は細胞が受ける刺激とみなし、これを複数結合したときにどのような挙動をするのかを観察した。今回は最も簡単な結合系として、2つの発振回路を相互に結合し結合間に遅延回路を組み込むことで、振動子の結合系における時間遅れの影響を

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
2018年度 成果報告会

検討した。実験は時間遅れなし、時間遅れありの場合と、比較のための結合なしの場合で行った。

【結果と考察】

実験では、時間遅れを入れた場合は出力の位相がずれた状態で同期し、その位相差は遅延時間の大きさによって異なることが示された。しかしながら結合がない状態においても、逆相同期が観測された。実験系を検討したところ、同一の電源を用いていることが、振動子同士の同調現象を引き起こしていることが分かった。現在は、このような電源に由来する同調現象への影響を取り除いた結合系の実験を設計して、実験を進めている。今後は、3つ以上の非線形発振回路がしめす多様な同調モードについての研究に発展させることを計画している。

参考文献

- 1) 山下 愛美 ほか「シナプス前終末」『脳科学辞典』
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/シナプス前終末>
- 2) M. I. Kohira *et al.*, *Int. J. Uncomv. Comp.* 5, 103-111 (2008)
- 3) 長家佑輔, 非線形発振回路の相互電気結合による同期現象-神経ネットによる情報処理の新規なモデル-,医工学科卒論 (2017)
- 4) 川上博, 方形波発振回路の相互電気結合について, 内部資料 (2016).
- 5) 吉川研一, 川上博, 情報処理, 33, 4 (1992)

P 2 3

細胞のミクロ液滴界面への自己組織的配置

宮崎幹, 貞包浩一朗, 劍持貴弘, 吉川研一

同志社大学大学院生命医科学研究科生命物理科学研究室

ctud0011@mail4.doshisha.ac.jp

再生医療の発展に、合成ゲルなどの足場を用いずに、三次元細胞組織体を構築する技術の創出が重要な課題となっている。水溶性高分子である dextran と polyethylene glycol を適切な濃度で攪拌するとミクロ液滴が生成される。我々のグループでは、ミクロ液滴内に DNA や細胞が局在することを明らかにしている^{1),2)}。生成されるミクロ液滴に細胞が取り込まれ、界面に局在する現象に着目し、細胞集合体の構築を試みた。具体的には、ミクロ液滴の界面上に細胞集合体の形成したことを確認後、30 分程度静置し、培養液を加え、ミクロ相分離から均質な状態へと転移させたところ、細胞同士の接触が維持され、安定な細胞組織体が得られていることが確認できた。このように、水溶性の高分子存在下で細胞の組織体が自発的に生成し、均質溶液中でその安定性を維持することが明らかとなった。

参考文献

- 1) Tsumoto. K, et al, Does DNA Exert an Active Role in Generating Cell-Sized Spheres in an Aqueous Solution with a Crowding Binary Polymer?, *Life*, vol. 5, (2015), pp.459-466.
- 2) Nakatani. N, et al, Specific Spatial Localization of Actin and DNA in a Water/Water Microdroplet: Self-Emergence of a Cell-Like Structure, *ChemBioChem*, vol. 19, (2018), pp.1370-1374.

P 2 4

血管系と神経系を用いた複合細胞組織体構築の試み

柳原伸伍, 貞包浩一朗, 劍持貴弘, 吉川研一

同志社大学大学院 生命医科学研究科 生命物理科学研究室

tanahaxx21v@gmail.com

近年では、ゲル基盤などを用いた三次元培養が試みられては来ているが、任意の形状の細胞組織体を構築することは、未だ困難である。さらなる再生医療分野の発展には、生体機能を有する三次元細胞組織体を形成する方法論の開発が望まれている。我々の研究グループでは、PEG, Dextranによる水溶性二相系水溶液を作成し、細胞を加え攪拌することで、ミクロ液滴内に細胞を取り込むことを見出して研究を進めてきている。この二相分離液滴を用いた新規的な手法は、高分子溶液環境下であるため、合成ゲルなどの足場を用いる手法に比べ、生体環境に近いと言える。また、容易に数十個規模の細胞組織体が構築できるという点でも優れている。本発表では、神経細胞 N2a, および血管内皮細胞 MS1 をミクロ液滴内に取り込むことで、複合組織体形成に向けての実験を行った。特に、PEG, Dextran 以外の生体高分子共存下での、細胞組織体の構築を試みたのでその結果を報告する。

P 2 5

荷電高分子によるミクロ液滴の安定化

伊藤 立樹, 貞包浩一朗, 劍持貴弘, 吉川研一

同志社大学大学院生命医科学研究科 生命物理科学研究室

rii.aloha.1173@gmail.com

再生医療などの細胞生物学の分野では、三次元細胞組織体の構築が重要な課題となっている。現状では、ゲルなどの人工的足場を用いる手法が一般的である。しかしながら、生体異物を用いることに加えて、三次元的に細胞を配置した組織体の構築は困難であり、新規な手法の開発が必要となっている。我々の研究グループでは、PEG / Dextran などの水溶性の高分子の混合系が水/水の相分離を引き起こすことに着眼し、ミクロ液滴を用いた細胞の三次元配列を試みてきている。しかしながら、ミクロ液滴は、熱搖らぎのなかでより大きな液滴に変化していくといった現象があり、液滴のサイズを安定化させることが重要な課題であった。本研究では、生体由来の荷電高分子を PEG/Dextran の相分離システムに組み込むことでミクロ液滴の安定化を試みた。その結果、荷電高分子存在下では、ミクロ液滴が融合することを抑止する効果のあることを見出したので、その詳細を報告する。

P 2 6

高分子鎖折り畳み転移の実空間モデリング： 揺らぎが作り出す秩序形成

吉川裕高、剣持貴弘、貞包浩一朗、吉川研一
同志社大学大学院生命医科学研究科生命物理科学研究所
ctud1042@mail4.doshisha.ac.jp

細胞内部では、常にエネルギーの消費が行われており、小分子の熱ゆらぎにより大きな高分子がブラウン運動を行っている。そのような環境下で、秩序だった構造や機能が形成されると考えられている。中でも、長鎖の生体高分子であるゲノムサイズの DNA は、水溶液中での高分子濃度が上昇すると、ランダムに広がった Coil 状態から、凝縮した Globule 状態となることが明らかになってきている。このような高次構造変化を調べる方法として、原子力間顕微鏡や電子顕微鏡などが活用されているが、この測定では DNA 分子を基板上に吸着して測定するため、溶液中での熱ゆらぎのある環境での高次構造を観察することは不可能となっている。本報告では、長鎖の高分子の高次構造を、マクロな実空間モデルを用いて調べた結果を報告する。

具体的には、鉛直振動を用いて熱ゆらぎを模した、cm スケールの環境の下、ボールチェーンとセラミックビーズの 2 種類を用いて非常に単純なモデル実験を行った。

その結果、長いボールチェーンではトロイド構造やロッド構造で安定し、短いボールチェーンだと集まって平行配列を見せながら安定構造をとることがわかった。

この研究では、in vitro 実験やシミュレーションによる DNA の凝縮転移に近い描像が確認でき、ミクросケールでの現象をマクロスケールでモデル化することを試みた。今後、マクロで得られる物理情報を解析しミクロに還元することで、長鎖 DNA の物性についても、より本質に迫った知見が得られるものと期待される。

ナノ金属粒子懸濁液に対するレーザの作用

庄野 真由

鷹取 慧, Jose M. Carnerero, 吉川 研一, 貞包 浩一朗

同志社大学生命医科学研究科

E-mail address: ctud1030@mail4.doshisha.ac.jp

ナノ金属粒子懸濁液にレーザを照射し粒子の動きを上から顕微鏡で見ると、照射レーザと同一方向に流体運動が生じていることを発見した。さらに実験を進めていくと偶然ながら逆方向に流れが起きていることを発見した。どのような条件の時に逆方向の流れが起るのか、さらに実験を繰り返した。結果として、界面で全反射が起こるようにレーザの入射角度を調整すると、逆方向の流れが生じることを発見した。これらの結果について報告する。

実験方法

ナノ金属粒子懸濁液にレーザを照射した時の粒子の動きを、顕微鏡で上から撮影した。また、レーザの入射角度を少し変えて照射した時の粒子の動きを顕微鏡で上から撮影した。直径 15nm の金ナノ粒子は、522nm で最大の光吸収する。今回の実験ではその最大波長に近いファイバーレーザ（波長 532nm）を用いた。

実験結果

界面と平行にレーザを照射したとき、レーザの進行方向である順方向に流れが起きた。また、レーザの入射角度を少し変えて全反射を起こしたとき、レーザの進行方向とは逆の方向に流れが起きた。

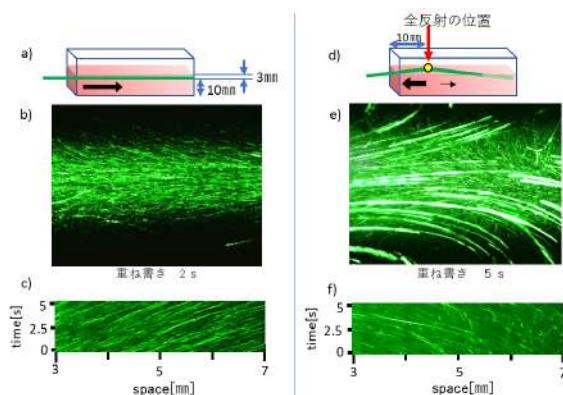


図 1 界面と平行に照射した時の結果と全反射条件で照射した時の結果

a) 界面と平行での実験の様子と流れの方向, b) 重ね書きを 2 秒間行ったもの, c) 5 秒

間の時空間プロット

d) 全反射条件での実験の様子と流れの方向, e) 重ね書きを 5 秒間行ったもの, f) 5 秒間の時空間プロット.

以上のように、界面と平行の場合はレーザ光の進行方向の流れが起こり、全反射条件の場合にはレーザ光の進行と逆方向の流れが起こることを明らかにした。

P28 微細藻類スピルリナの形態変化と運動モード分岐

田中瞭斗, 貞包浩一朗, 吉川研一, 剣持貴弘

同志社大学大学院生命医科学研究科

E-mail address: (ctud0027@mail4.doshisha.ac.jp)

スピルリナ (spirulina) は、30億年前から生息している長さ300～500 μm程のらせん形をした緑色の多細胞微細藻類である。比較的温暖 (25～35 °C) なアフリカのアルカリ性の湖に多く繁殖している¹⁾。従来は、健康食品として利用されてきたが、現在では工業用としての研究が進んでおり、スピルリナの微小コイルは、THz領域の電磁波を吸収することから電磁波シールド材料、検査機器、高速通信など、様々な用途への展開が期待されている¹⁾。

スピルリナは自然界の湖や SOT 溶液²⁾上では 2 次元構造 (図 1 (a)) をとるが、寒天培地等のゲル状の上に乗せると渦巻き状の 3 次元構造 (図 1 (b)) に変化する。本研究では 2 次元構造と 3 次元構造の違いとスピルリナの形態、変化、運動の分岐条件について考察した。

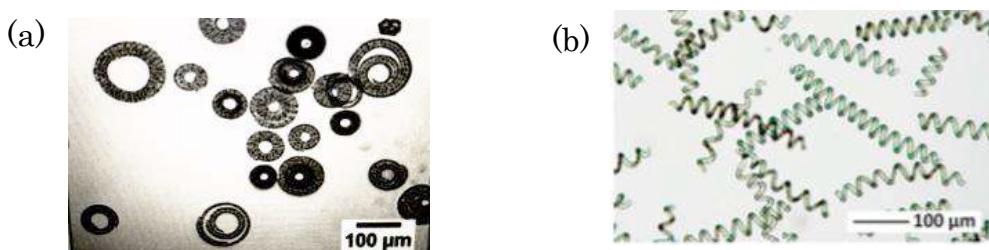


図1 (a)2次元構造 (b)3次元構造

SOT溶液20 mLに寒天0.6 gを混ぜた溶液を電子レンジ (600 W, 30 Sec) で加熱したものを6次のシャーレに入れた。その上に照度2000 lux, 温度24 °Cで培養したスピルリナを10 μL加えた。培地の概略図を図2に示す。

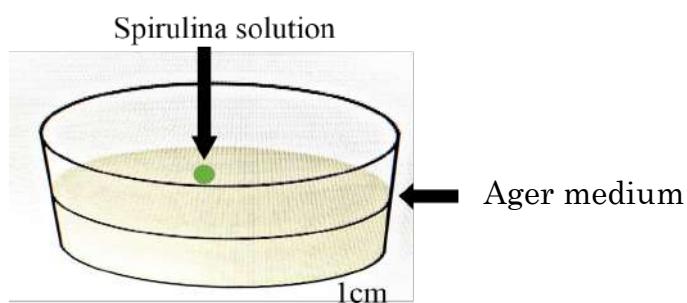


図2 寒天培地の概略図

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
2019年度 成果報告会

3次元構造では、ばねのような伸縮運動を行うが、2次元構造では渦巻き状の真ん中を中心として平均で $0.55\mu\text{m}/\text{s}$ の速度で回転運動をする。また、スピルリナは3次元構造で全て左巻きと確認できたものだけを実験で使用した。しかし、寒天培地上でスピルリナを培養すると左巻きの割合が44%，右巻きの割合が56%と巻き方が混在することが分かった。このとき、2次元構造では上から観察するか下から観察するかで巻き方が反対になるため、上から見た巻き方で定義する。

2次元構造スピルリナに起こった回転方向の変化について考察する。スピルリナの先端が図3のように別のスピルリナに接触することである。接触をすると、一瞬スピルリナが止まる。ほとんどのスピルリナは軌道を修正した後同じ回転方向に回転するが、軌道を修正できない場合逆回転することがある。

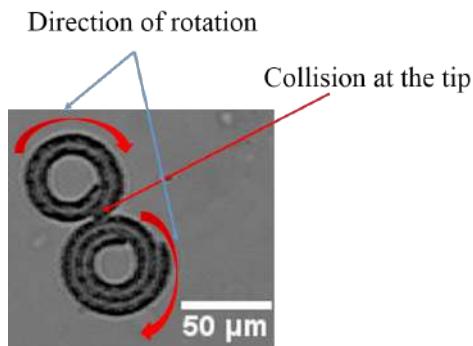


図3 スピルリナの接触

参考文献

- 1) K. Kamata., Z. Piao, T. Iyoda, et al : Spirulina-Templated Metal Microcoils with controlled Helical Structures for THz Electromagnetic Responses, Scientific Reports 4, 4919, (2014).
- 2) T. Ogawa, G. Terui, 1970 studies on the growth of spirulina platensis. J. Ferment. Technol, 48, pp.361-367.

P 2 9

ポリアミン異性体が示す長鎖DNAの構造・活性に対する特異性

北川 智規 剣持 貴弘 貞包 造一朗 吉川 祐子 吉川 研一

同志社大学大学院生命医科学研究科

ctud0008@mail4.doshisha.ac.jp

ポリアミンは2つ以上のアミノ基を有するカチオン性の生体物質である。ポリアミンは真核、原核生物問わず細胞内に分布し、細胞の成長や増殖などさまざまな生物学的機能に重要な役割を持つ。

本研究ではポリアミンの構造の違いに注目し、4 個の正電荷を持ち互いに構造異性体の関係にあるポリアミン 3 種を用い、ポリアミンの構造差による長鎖 DNA に与える影響の違いを追求した。

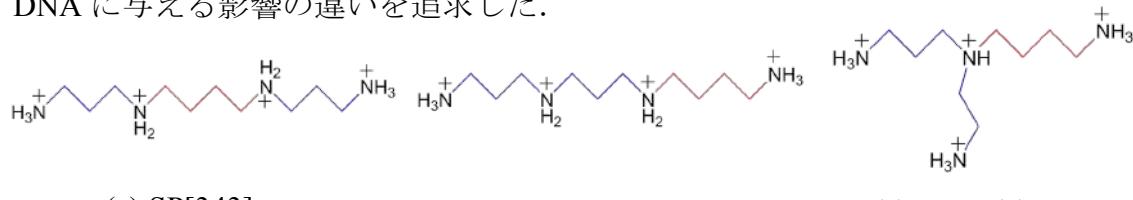


Fig.1 Structures of linear- and branched polyamines examined in this study. Blue and red lines indicate carbon chains of C3 and those of C4, respectively.

(a) SP[343]と(b) TSP[334]は共に直鎖型のポリアミンであり、炭素数4の炭素鎖の位置が異なる。(c) BSP[3(3)4]は3種の中で唯一の分岐鎖型である。これら3種は互いに構造異性体の関係にあり、それぞれ保有する生物が異なる。

各ポリアミン存在下における、蛍光顕微鏡観察を用いたDNA単分子観察、無細胞系の遺伝子発現実験、原子間力顕微鏡を用いたDNA微細構造の観察を行った。SP, TSP, BSPでは、ポリアミンの濃度において最大10倍程度のDNA凝縮能力の差が見られ、その差は遺伝子発現の結果にも影響した。加えて、3種はDNAに対して異なる高次構造の形成をもたらした。図2はSP存在下におけるT4 GT7 DNA単分子の蛍光顕微鏡観察画像である、SP 0 μMではcoil状態、SP 35 μMではglobule状態でDNAが観察できた。図3はT4 GT7 DNAの原子間力顕微鏡による観察画像である。(a) SP 10 μMではDNAのセグメントが平行に配列したflower-like structureを形成した。(b) BSP 30 μMではDNAのセグメントが網目状に交差したmesh-like structureを形成した。

同志社大学ナノ・バイオサイエンス研究センター
 私大戦略「細胞自在操作のための分子化学技術の開発拠点形成」
 2019年度 成果報告会

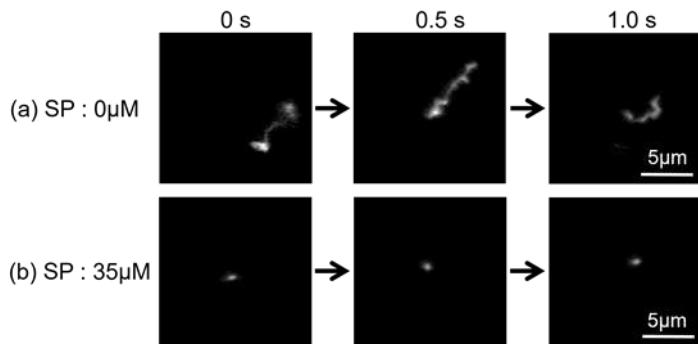


Fig. 2 Real-time monitoring of single T4 GT7 DNA molecules in bulk solution at various concentrations of SP : (a) 0 μM , (b) 35 μM . The time interval between successive images is 0.5 s.

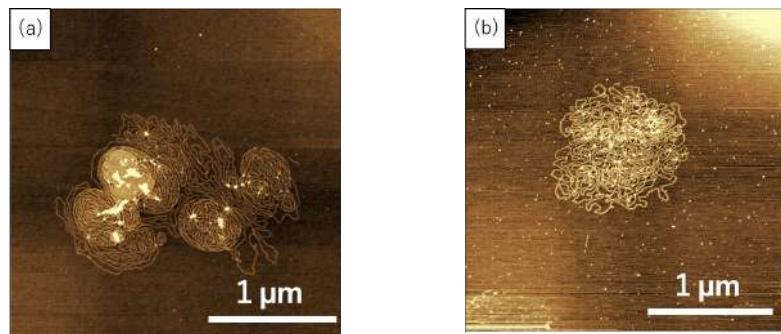


Fig.3 AFM images of T4 GT7 DNA (166 kbp) with polyamines: (a) SP 10 μM ; (b) BSP 30 μM . The DNA concentration is 0.2 μM in nucleotide units.

分岐鎖型のポリアミンである BSP は直鎖型に比べ、DNA に対してより小さい面積で接触し結合する。そのため DNA の電荷の中和がされにくく、DNA 凝縮能力が低い、また分岐鎖型の立体的な構造が DNA 同士の架橋を助け、網目状に見える高次構造を有する凝集体の形成もたらすと考える。直鎖型の SP と TSP について、これらは炭素数 4 の炭素鎖の位置が異なるという構造の違いで、DNA 凝縮能力において 3 倍の差が見られ、遺伝子発現において SP は TSP より活性をもたらした。これは正に帶電したアミノ基の位置に関する電荷の偏りが影響していると考える。このようにポリアミンの僅かな構造の違いは DNA との相互作用において、その機能や効果に特異性をもたらした。今回得られた知見はポリアミンの構造という点からポリアミン作用のメカニズムや、生細胞におけるポリアミンの機能や役割について、さらなる洞察を深めていけると期待される。

2nd Nano/Bioscience International Symposium

**Research Center for Nano-Bioscience
Doshisha University**

Nano/Bioscience International Symposium

Ryoshin-kan RY305, Doshisha University, Imadegawa Campus

Friday, 7 June 2019

10:00 Opening Remarks

Masahito Kodera (Doshisha University)

10:10–11:10

Chemo-Enzymatic Catalysts made from surface functionalized laccases

Thierry Tron (Aix-Marseille Universite)

11:10–12:10

Understanding the mode of action of metal-containing enzymes by combined enzymatic and bio-inspired model studies

Jalila Simaan (Aix-Marseille Universite)

(Lunch)

13:30–14:30

Artificial metalloenzymes: design and applications

Gerard Roelfes (University of Groningen)

14:30–15:30

NIR responsive Fluorescent paradigms for Specific Manipulation of Cellular Functions and Precise Profiling of Pathological Dynamics

Bengang Xing (Nanyang Technological University)

(Coffee Break)

16:00–17:00

Live cell protein labeling for conditional proteomics

Itaru Hamachi (Kyoto University)

18:00– Banquet

Saturday, 8 June 2019

9:40–10:50 Young Scientist (Student/Postdoc) Session

(1) Why is 2-propanol adapted for the isolation of DNA?

Yue Ma

(2) An aqueous biomimetic model of myoglobin with a distal polar functionality

Qiyue Mao, Bernard Boitrel, Hiroaki Kitagishi

(3) Transition between cracking and peeling in drying aqueous layer of co-solutes with starch and glucose

Hikari Baba

(4) Development of Dicopper Complexes Accelerating Oxidative Cleavage of DNA with Hydrogen Peroxide and their Cytotoxicity

Yuki Kadoya, Machi Hata, Yoshiki Tanaka, Yutaka, Hitomi, Masahito Kodera

(5) Solvation dynamics in a heterogeneous environment of ionic liquids viewed from the photodissociation of aminodisulfide

Kaori Fujii, T. Fukui, S. Okazoe, T. Endo, Y. Kimura

(6) Effect of a hydrated ionic liquid on the photo-cycle and dynamics of photoactive yellow protein

Utana Umezaki, K. Onodera, S. Kim, Y. Nakasone, M. Terazima, T. Endo, Y. Kimura

(7) Cascade from stationary to chaos on a single candle flame: Revisit to Faraday

Satoshi Takatori

(Coffee Break)

11:10–12:10

Heme oxygenase as a target for drug discovery

Roberto Motterlini (Universite Paris-Est)

12:10–13:10

Bioinorganic Cu-complexes : redox activity, stability and metal transfer

Peter Faller (University of Strasbourg)

13:10 Closing

Access



Address: Imadegawa Campus : Karasuma-higashi-iru, Imadegawa-dori, Kamigyo-ku, Kyoto-shi 602-8580

良心館 (Ryoshin-kan) RY305



Banquet (要・事前申し込み)

casa bianca (カーサビアンカ Kyoto)

Address: 〒602-0832 京都府京都市上京区今出川通寺町西入大原口町 214

Phone: 0120-82-3131



START: 18:00

END: 20:00

Abstracts

–Invited Lectures–

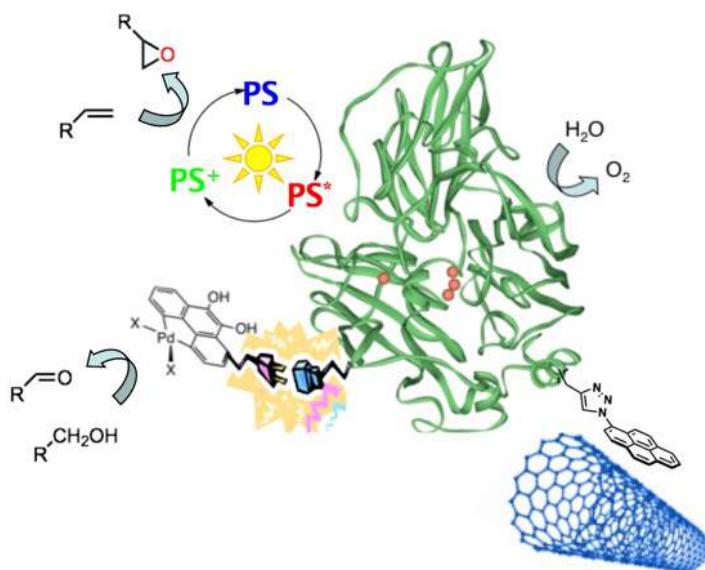
Chemo-Enzymatic Catalysts made from surface functionalized laccases

Thierry Tron

Aix Marseille University, Marseille, France

E-mail: thierry.tron@univ-amu.fr

Laccases are well known biocatalysts with great robustness, high oxidation power and substrate versatility.^[1] Their unique set of copper centres - a near-surface located mononuclear type 1 and an embedded tri-nuclear cluster (TNC) made of a type 2 and a binuclear type 3 - couple the oxidation of substrates (organic or metal ions) to dioxygen reduction.^[2] We shape new catalysts based on oriented functionalizations of a laccase surface with different “plugins”. From our initial demonstrations on bi-molecular systems - a sensitizer/laccase system coupling the light driven four-electron reduction of dioxygen to water^[3] to the photo-oxidation of styrene^[4] or a Pd(II)/laccase system competent for the aerobic oxidation of alcohol in mild conditions^[5] - we will present our latest architectures based on the oriented grafting of the enzyme surface.^[6,7] Prospects on olefin oxidation catalysts and laccase functionalized electrode materials will be discussed.



References

- [1] T. Tron, in Encyclopedia of Metalloproteins, Springer, New York, 1066 (2013)
- [2] E. Solomon, U. Sundaram, T. Machonkin, *Chem. Rev.*, **96**, 2563 (1996)
- [3] T. Lazarides et al., *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 3095 (2013)
- [4] L. Schneider et al., *Chem. Sus. Chem.*, **8**, 3048 (2015)
- [5] Y. Mekmouche et al., *Chem. Sci.*, **6**, 1247 (2015)
- [6] N. Lalaoui et al., *ACS Catalysis*, **6**, 1894 (2016)
- [7] V. Robert, et al., *Chem. Plus Chem.*, **82**, 607 (2017)

Understanding the mode of action of metal-containing enzymes by combined enzymatic and bio-inspired model studies

A. Jalila Simaan

Aix Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, iSm2, Marseille, France
E-mail: jalila.simaan@univ-amu.fr

1-aminocyclopromane-1-carboxylic acid Oxidase (ACCO) is a non-heme iron(II) containing enzyme that catalyzes the last step of production of ethylene in plants, a phytohormone controlling many physiological and development processes.^[1,2] The reaction catalyzed by ACCO is presented in Figure 1. In the crystallographic structure of ACCO from *P. hybrida*, the C-terminal part, that is essential to the activity, is found directed away from the active site.^[3] This probably does not represent an active conformation of the enzyme and this raises questions on the active conformation and on a possible dynamics of the C-terminal part.

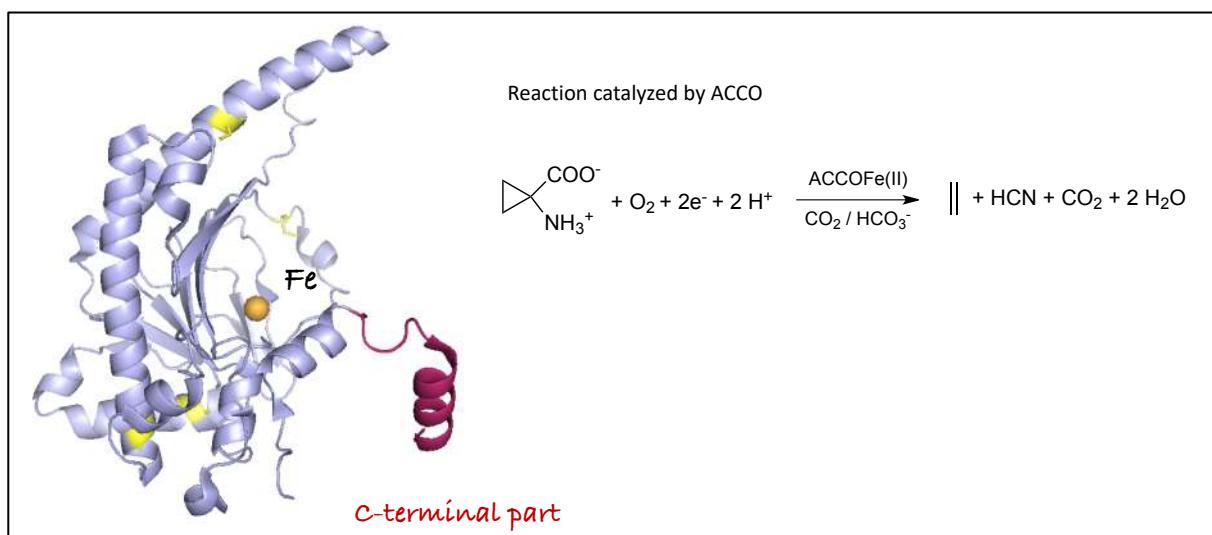


Figure 1. Structure and reaction catalyzed by ACCO

Thanks to an interdisciplinary approach we aim at getting more information on this enzymatic system *via* the preparation of model complexes, the understanding of the interactions between the active site and the different substrates and the conformation and dynamics of the C-terminal part.^[4]

- [1] A. B. Bleeker, H. Kende, (2000) Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 16, 1-18
- [2] M. Réglier, A.J. Simaan, RSC Metallobiology Series No. 3, RSC 2015, Chap. 20, pp 425
- [3] Z. Zhang, J-S. Ren, et. al. (2004) Chem. Biol., 11, 1383-1394
- [4] a) L. Brisson, et. al. (2012) J. Biol. Inorg. Chem. 17, 939 b) M. Sallmann, et. al. (2015) Angew. Chem. Int. Ed., 54 (42), 12325 c) Roux, Y. et. al. (2015) Dalton trans. 44, 5966 d) N. El Bakkali-Tahéri, et. al. (2017) Arch. Biochem. Biophys., 623-624, 34 e) Fournier, E. et. al. submitted

Artificial Metalloenzymes: Design and Application

Gerard Roelfes

University of Groningen, Stratingh Institute for Chemistry

j.g.roelfes@rug.nl

The catalytic efficiency and high selectivities achieved by natural metalloenzymes are a source of inspiration for the design of novel bio inspired catalysts. A powerful approach for creating artificial metalloenzymes involves incorporating a synthetic transition metal catalysts into a protein. We have developed a new concept for the design of artificial metalloenzymes that involves creation of a novel active site at the dimer interface of the transcription factor LmrR (Lactococcal multidrug resistance Regulator).¹ LmrR was selected as the protein scaffold because it contains an unusual large hydrophobic pocket on the dimer interface. Here, two novel classes of LmrR-based artificial metalloenzymes will be presented, involving either supramolecular anchoring of the metal complex^{2,3} or biosynthetic incorporation of an unnatural metal binding amino acid using expanded genetic code methodology.⁴ These artificial metalloenzymes have been applied successfully in catalytic asymmetric C-C bond forming and hydration reactions. Here we will discuss our recent in the evolution and in vivo application of these artificial metalloenzymes.

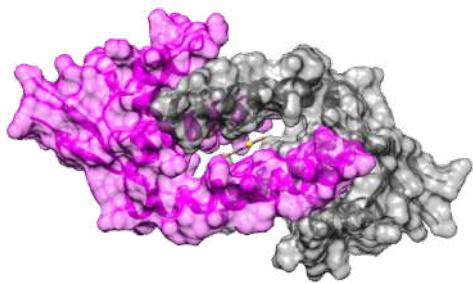


Figure Structure of an LmrR-based artificial metalloenzyme

- (1) Roelfes, G. *Acc. Chem. Res.*, **2019**, *52*, 545. (2) Bos, J.; Browne, W.R.; Driessens, A.J.M.; Roelfes, G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 9796. (3) Villarino, L.; Splan, K.E.; Reddem, E.; Alonso-Cotchico, L.; Gutiérrez de Souza, C.; Lledós, A.; Maréchal, J.-D.; Thunnissen, A. W.H.; Roelfes, G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 7785. (4) Drienovská, I.; Rioz-Martínez, A.; Draksharapu, A.; Roelfes, G. *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 770.

NIR responsive Fluorescent paradigms for Specific Manipulation of Cellular Functions and Precise Profiling of Pathological Dynamics

B. G Xing

Division of Chemistry & Biological Chemistry, School of Physical & Mathematical Science, Nanyang Technological University, Singapore 637371

E-mail: bengang@ntu.edu.sg

In principle, optical imaging including fluorescent and bioluminescent imaging enables such rapid, direct and sensitive visualization, mainly due to their high sensitivity, relative safety, and easily handling, and therefore have become robust and reliable tools in monitoring of subcellular protein dynamics and analysis of tumors or pathogen–host interactions *in vitro*, *in vivo* and even in pre-clinical practice. The systematic imaging investigation of biomolecules activities including enzymes or proteins etc in a complicated environment may offer great possibility for the in-depth understanding of the biological basis conferring diseases status, and importantly, for the facilitating of new theranostics *in vitro* and *in vivo*. In our group, a series of simple and specific small molecules or nano-structure based optical imaging probes have been extensively established to real-time visualize cellular function and activities [1-2], importantly, the intrinsic mechanisms to involve in potent drug activities and relevant pathways to initiate physiological and pathological procession have also been well investigated [3-4].

References:

- [1] X. Ai, Z. M. Wang, H. Cheong, Y. Wang, R. C. Zhang, J. Lin, Y. J. Zheng, Y. M. Gao*, B. G. Xing*. “Multispectral Optoacoustic Imaging of Dynamic Redox Correlation and Pathophysiological Progression Utilizing Upconversion Nanoprobes.” *Nat. Commun.* 10, 1087, 1-11 (2019), Featured by “*X-Mol*” and “*Nature Communications Editors' Highlights*”.
- [2] X. Ai, L. Lyu, Y. Hang, Y. Tang, J. Mu, F. Liu, Y. Zhou, Z. Zuo, G. Liu,* B. G. Xing.* “Remote Regulation of Membrane Channel Activity by Site-specific Localization of lanthanide-doped Upconversion Nanocrystals.” *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 3031-3035 (2017), Featured as “*Backcover*” and Highlighted in “*Advanced Science News, Wiley*” and “*X-Mol*”.
- [3] Ai, X.; Ho, C.-J.; Aw, J. Mu, J.; Wang, Y.; Wang, X.; Wang, Y.; Liu, X.; Chen, H.; Gao, M.; Chen, X.; Yeow, K; Liu, G.*; Olivo, M.*; Xing, B.* “In vivo Covalent Cross-linking of Photon-converted Rare-earth Nanostructures for Tumor Localization and Theranostics.” *Nat. Commun.* 7: 10432, 1-9 (2016), Featured in “*Biodiscover*”, “*ScienceNet*”, and “*X-Mol*”.
- [4] Min, Y, Li, J, Liu, F, Yeow, E*, Xing, BG*. “NIR Light Mediated Photoactivation Pt Based Antitumor Prodrug and Simultaneous Cellular Apoptosis Imaging Via Upconversion Nanoparticles.” *Angew. Chem. Intl. Ed.* 53, 1012-1016 (2014).

Live cell protein labeling for conditional proteomics

Itaru Hamachi

Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry

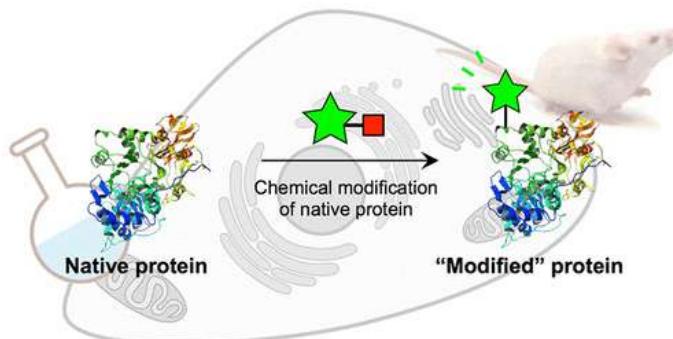
Graduate School of Engineering, Kyoto University

ERATO, JST

Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan

Email: ihamachi@sbchem.kyoto-u.ac.jp

Proteins labeling in live cells can provide valuable tools for deciphering their structure and functions. In addition to genetically modified proteins, naturally occurring (endogenous) proteins should be targeted in chemical biology. Here I would like to briefly describe a chemical strategy for labeling and imaging of endogenous receptor proteins, termed ligand-directed chemistry (LD-chem). LD-chem is driven by proximity effect, which enables to chemically modify endogenous proteins such Carbonic anhydrase, FKBP12, Hsp90, folate receptor, and Glutamate receptors in live cells. This labeling method allows for live-cell imaging of these proteins, construction of biosensors, functional inhibitions under natural habitats.



References

- (a) Yamaura, K.; Kiyonaka, S.; Hamachi, I. et.al., *Nature ChemBio.*, **12**, 822-830 (2016).
- (b) Kiyonaka, S.; Kubota, R.; Hamachi, I. et.al., *Nature Chem.*, **8**, 958-967 (2016).
- (c) Miki, T.; Hamachi, I. et.al., *Nature Meth.*, **13**, 931 (2016).
- (d) Kiyonaka, S.; Hamachi, I. et.al., *Nature Commun.*, **8**, 14850 (2017).
- (e) Tamura, T.; Hamachi, I. et.al., *Nature Commun.*, **9**, 1870 (2018).
- (f) Kubota, R.; Hamachi, I. et.al., *ACS CentSci.*, **4**, 1211 (2018).
- (g) Tamura, T.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.*, (Perspective) **141**, 2782 (2019).

Heme Oxygenase as a Target for Drug Discovery

Roberto MOTTERLINI

INSERM U955, Faculty of Medicine, University Paris Est, Créteil, France

E-mail: roberto.motterlini@inserm.fr

Keywords: carbon monoxide (CO), metal carbonyls, drug discovery

Heme oxygenase enzymes, which exist in constitutive (HO-2) and stress-inducible (HO-1) isoforms, catalyze the degradation of heme to carbon monoxide (CO) and biliverdin [1]. CO serves as a ubiquitous signaling molecule that has also been shown to possess vasodilatory, anti-ischemic and anti-inflammatory properties [1]. From a mere biochemical view point, CO selectively binds with high affinity to transition metals in a specific redox state leading to the formation of stable metal carbonyl complexes. Based on this peculiar feature, we have designed and developed metal carbonyls that function as CO-releasing molecules (CO-RMs) and may have unique therapeutic potentials. Substantial data from our group revealed that CO-RMs mimic the action of endogenous CO by exerting a variety of protective and beneficial effects both *in vitro* and in animal models of disease [1,2,3]. In the last 5 years we have focussed our research on CORM-401, a water-soluble manganese-based carbonyl that has the ability to deliver CO efficiently to cells as well as to tissues when orally administered *in vivo* [4,5]. Our studies provide evidence for the anti-inflammatory effects of CORM-401 in mice challenged with lipopolysaccharide and highlight an important role of CO in counteracting insulin resistance in high fat diet-induced obesity through mechanisms involving the modulation of mitochondria bioenergetics [5,6,7]. More recently, we have successfully conjugated CORM-401 to fumaric ester derivatives known to activate Nrf2, the transcription factor that regulates the expression of HO-1. This resulted in the synthesis of a new class of pharmacologically active hybrid compounds, termed HYCOs, which are able to release CO and simultaneously induce HO-1 in tissues [5]. Thus, the promising data obtained so far with CORM-401 and HYCOs exemplify the feasibility of exploiting the HO-1/CO pathway in the discovery of novel compounds for treatment of disorders as diverse as organ ischemia-reperfusion injury, inflammation and metabolic dysfunction.

References

- [1] R. Motterlini, R. Foresti, *Antioxidant & Redox Signaling*, **20**, 1810 (2014)
- [2] R. Motterlini, L.E. Otterbein, *Nature Reviews Drug Discovery*, **9**, 728 (2010)
- [3] R. Motterlini, R. Foresti, *American Journal of Physiology*, **312**, C302 (2017)
- [4] S. Crook et al., *Dalton Transactions*, **40**, 4230 (2011)
- [5] R. Motterlini et al., *Redox Biology*, **20**, 334 (2019)
- [6] L. Braud et al., *JCI Insight*, **3**, e123485 (2018)
- [7] J.L. Wilson et al., *Free Radical Biology & Medicine*, **104**, 311 (2017)

Bioinorganic Cu-complexes: redox activity, stability and metal transfer

Peter Faller

Institut de Chimie, UMR 7177, CNRS-Université de Strasbourg, 4 rue Blaise Pascal, 67000, Strasbourg, France email: pfaller@unistra.fr

ABSTRACT: Cu-metabolism is very well controlled in biological systems. Transporters and chaperons are responsible to bring the Cu to their target, mostly Cu-enzymes. However, Cu could bind to off-target molecules in case of failure of Cu-homeostasis, or upon Cu-overload. Cu bound to off-target biomolecules could be toxic, often due to uncontrolled catalysis of reactive oxygen species (ROS) production. This has been proposed for the peptide amyloid-beta and alpha-synuclein, two proteins that play a key role in Alzheimer's and Parkinson's disease, respectively.

Cu-complexes are also under investigation as potential drugs, like in cancer or as antimicrobials. We are interested in the question of the reactivity of Cu-protein/peptide and -drugs, in particular their redox activity and the production of reactive oxygen species. Moreover, we investigate which endogenous biomolecules could bind off-target Cu or interact with exogenous Cu-complexes, and if they are able to shuttle these Cu back into the normal Cu circuit.

Glutathione (GSH) and metallothioneins (MT) are known reducing agents and metal chelators, both occurring at quite high concentration in the cytosol and nucleus. Mammalian MTs classically bind up to 7 Zn(II) in two clusters. MTs have also a strong affinity for Cu(I) and can bind up to 12 Cu(I)-ions. Thus they are potentially very active disruptors of Cu(II)-complexes due to their strong reducing and Cu(I)-binding activity.

We show that MTs together with GSH are very potent disruptors of Cu(II)-complexes (endo- or exogenous) and strong competitors for Cu(I)-compounds. Thus MT and GSH can inactivate rapidly inorganic Cu(II)-complexes (like investigated for cancer therapy) and Cu(II)-peptides (e.g. used for artificial nucleases or peptidases), mainly by reducing Cu(II) to Cu(I) and withdrawal of the Cu(I).

KEY WORDS: Copper-transfer reactions, Copper-binding peptides, Cu-drugs, thiolates, metallothionein

REFERENCES

1. E. Atrián-Blasco, A. Santoro, D. L. Pountney, G. Meloni, C. Hureau, P. Faller, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, *46*, 7683-7693.
2. A. Santoro, N.E. Wezynfeld, E. Stefaniak, A. Pomorski, D. Płonka, A. Kręzel, W. Bal, Faller P. *Chem Commun* 2018, **54**, 12634-12637.
3. Santoro A, Walke G, Vileno B, Kulkarni PP, Raibaut L, Faller P. *Chem Commun* , 2018, **54**, 11945-11948.
3. Santoro A, Vileno B, Palacios Ò, Peris-Díaz MD, Riegel G, Gaiddon C, Kręzel A, Faller P. *Metallomics*. 2019, accepted doi: 10.1039/c9mt00061e

Abstracts

–Young Scientist (Student/Postdoc) Session–

Why is 2-propanol adapted for the isolation of DNA?

Yue Ma, Yuko Yoshikawa, Kenichi Yoshikawa

Faculty of Life and Medical Science, Doshisha University, Kyotanabe 610-0394, Japan

Nowadays, structural characterization of genomic DNA is one of the most important trends in medicine, biology and agricultural sciences. The indispensable procedure for the analysis of DNA in living cells is to isolate DNA molecules as precipitates from the crude mixture in rich variety of cellular components. According to the standard experimental protocol in molecular biology and medicinal chemistry, usage of 2-propanol is recommended, seemingly without any reasonable physic-chemical explanation why 2-propanol is desirable. In the present study, we have measured the change of the higher-order structure of genomic DNA molecules in the presence of alcohols by use of single DNA observation with fluorescence microscopy, by focusing our attention to unveil the different effect between 1-propanol and 2-propanol.

We found that, with an increasing concentration of 1-propanol, DNA exhibits reentrant conformational transitions from an elongated coil to a folded globule, and then to an unfolded state. On the other hand, with 2-propanol, DNA exhibits monotonous shrinkage into a compact state. Thus, DNA molecules are more effectively condensed/precipitated with 2-propanol than with 1-propanol. These results indicate that DNA undergoes reentrant transition of coil-globule-coil with 1-propanol, whereas such reentrance phenomenon does not appear with 2-propanol. As a related phenomenon, we have recently reported that ethanol causes reentrant transition on DNA accompanied by the increase of its concentration.¹ The propanol isomers also had different effects on the changes in the secondary structure of DNA, as revealed by circular dichroism (CD) measurements. With 1-propanol, DNA maintains a B-form secondary structure. An A-like conformation appears with the addition of 2-propanol.

[1] Y. Oda, et al., "Highly Concentrated Ethanol Solution Behaves as a Good Solvent for DNA as Revealed by Single-Molecule Observation", *ChemPhysChem*, 17, 471(2016).

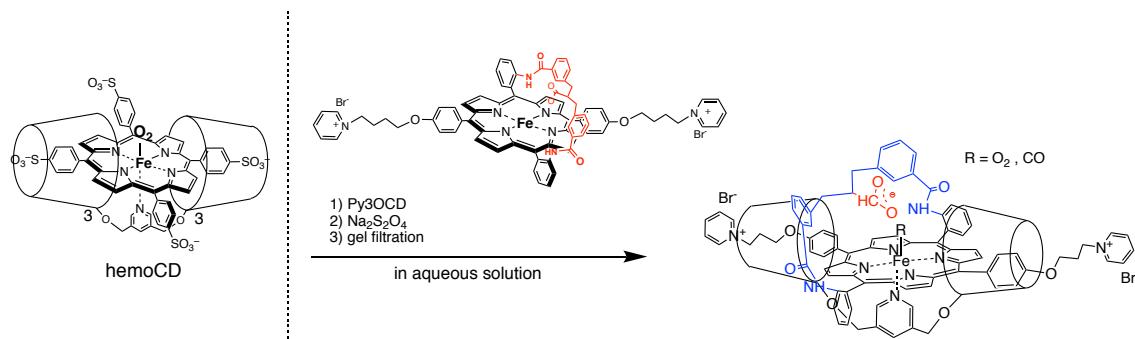
An aqueous biomimetic model of myoglobin with a distal polar functionality

Qiyue Mao,¹ Bernard Boitrel,² Hiroaki Kitagishi¹

¹Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Faculty of Science and Engineering, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto 610-0321, Japan

²Institut des Sciences Chimiques de Rennes (UMR 6226 CNRS), Université de Rennes 1, France

Myoglobin (Mb) reversibly binds oxygen (O_2) in aqueous solution. Modeling the function of myoglobin (Mb) has been actively carried out since the 1970s. Both proximal histidine residue (His F8) and distal histidine residue (His E7) assume a key role between the dioxygen (O_2) and carbon monoxide (CO) selectivity at the active side of Myoglobin (Mb) and Hemoglobin (Hb). In our previous studies, the supramolecular iron porphyrin/cyclodextrin dimer complexes (hemoCDs) which were composed by 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin iron(II) ($Fe^{II}TPPS$) and a per-*O*-methylated β -cyclodextrin dimer having a pyridine linker binds O_2 and CO reversibly in aqueous solution have been reported.^{1,2} In the proximal site, a pyridine ligand coordinates to the central iron atom. However, the hemoCDs don't have a distal side like the native Mb. To improve the hemoCD more closely to the native system, we synthesized a new hemoCD (**1**) with a polar functional group: carboxylic acid hanging over the distal site. The properties of the O_2 and CO complexes was examined by kinetic and spectroscopic (UV-vis, IR). It is shown that, the O_2 complex of **1** was quite stable in aqueous solution. The CO affinity of **1** is significantly lower than the hemoCDs that we have reported. Because of the low CO affinity, the complex **1** shows high O_2 selectivity. Obviously, The CO/ O_2 selectivity (*M* value) of **1** is greatly improved.



REFERENCES.

- 1) K. Kano, H. Kitagishi, M. Kodera, S. Hirota, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 435–438 (2005).
- 2) K. Watanabe, H. Kitagishi, K. Kano, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 6894–6897 (2013).

Transition between cracking and peeling in drying aqueous layer of co-solutes with starch and glucose

Lab. Life Physics, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha Univ.
Hikari Baba

It is well known that drying liquid layer produces rich variety of patterns in a spontaneous manner; e.g., cracking on two dimensional layer, etc. Here, we will report our observation that the transition of the spatial pattern is generated between cracking on a drying layer and peeling accompanied with the formation of thin film. We have adapted the mixing aqueous solution between glucose and starch and have observed the drying process. Figure 1 exemplifies the transition of the drying pattern, where the relative ratio of glucose, α , between glucose and starch is adapted as the control parameter. We will interpret the mechanism of such transition in terms of the effect of negative diffusion through phase-transition, with the help of phenomenological nonlinear partial differential equation.

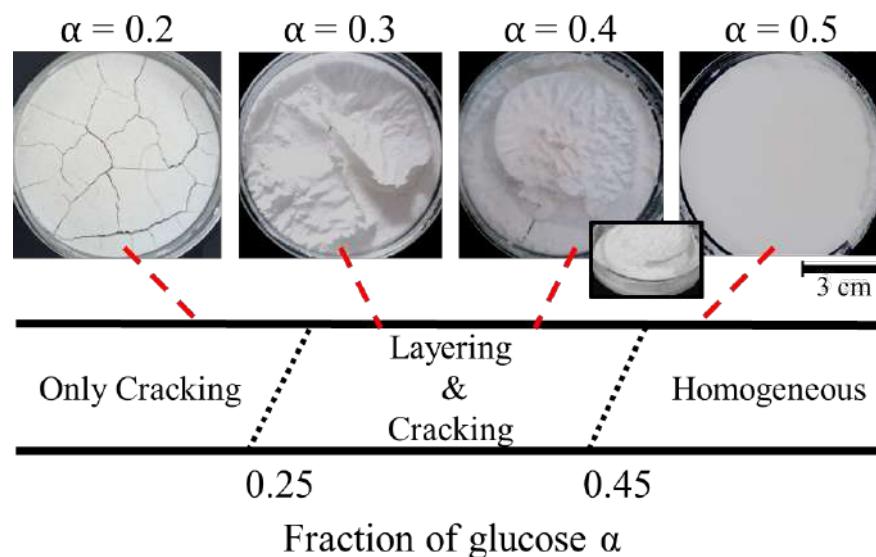


Figure 1 Phase diagram when changing the mixing ratio of glucose and starch. α is the fraction of glucose with respect to the total amount of glucose and starch.

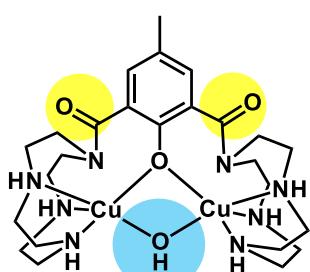
Development of Dicopper Complexes Accelerating Oxidative Cleavage of DNA with Hydrogen Peroxide and their Cytotoxicity

Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University

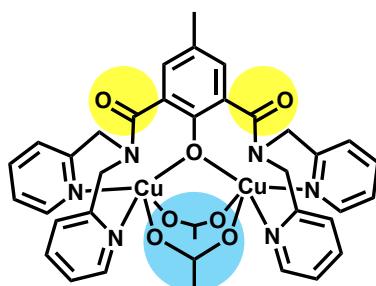
Yuki Kadoya, Machi Hata, Yoshiki Tanaka, Yutaka Hitomi, Masahito Kodera

Cisplatin, oxaliplatin, and related platinum complexes are used as chemotherapeutic drugs against various types of cancers. These drugs, however, are accompanied with serious side-effects because they attack not only normal but also cancerous cells nonselectively. So, we aimed at developing anti-cancer drugs that cleave DNA under specific environments of cancer cells such as low pH, hypoxia, high H₂O₂ concentration, and low nutrition. Previously, we reported a dicopper(II) complex, [Cu₂(μ-OH)(bcmpl)][(ClO₄)₂], that enhances hydrolytic DNA cleavage at relatively low pH 5–6.¹⁾ This complex, however, did not show any ability to cleave DNA with H₂O₂. In this study, we newly synthesized dicopper(II) complexes that specifically enhances the oxidative DNA cleavage activity and show cytotoxicity.

We synthesized new *p*-cresol-derived amide-tether ligands, Hbcamide and Hbdpamide, where two units of cyclen (1,4,7,10-tetraazacyclododecane) or dpa (dipyridylmethylamine) are attached at 2,6-positions of *p*-cresol by amide-tethers, respectively. These ligands form dicopper(II) complexes [Cu₂(μ-OH)(bcamide)][(ClO₄)₂] (**1**) and [Cu₂(μ-OAc)₂(bdpamide)][(OAc)] (**2**). They showed high oxidative DNA cleavage activity and cytotoxicity against HeLa cells where **2** is more effective than **1**. The relatively high ability of **2** may be due to the difference of the membrane permeability because **2** is much more hydrophobic than **1**. Here, we report the oxidative DNA cleavage activity and cytotoxicity of **1** and **2**.



[Cu₂(μ-OH)(bcamide)][(ClO₄)₂] (**1**)



[Cu₂(μ-OAc)₂(bdpamide)][(OAc)] (**2**)

Reference

- 1) M. Kodera, Y. Kadoya, et al. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Selected paper, **2019**, 92, 739-747.

Solvation dynamics in a heterogeneous environment of ionic liquids viewed from the photodissociation of aminodisulfide

Kaori Fujii¹⁾, Teppei Fukui¹⁾, Shinya Okazoe²⁾, Takatsugu Endo²⁾, Yoshifumi Kimura^{1,2)}

1) Doshisha University 2) Kyoto University

Ionic liquids (ILs) have been attracted in a variety of fields because of their unique physicochemical properties. We have focused on the heterogeneous structure of ILs, which is one of the unique properties of ILs as a reaction media. There has been a lot of studies on the heterogeneous structure of ILs viewed from the dynamics of solute molecule measured by the NMR spectroscopy[1] and time-resolved laser spectroscopy. Here we focused on the solvation dynamics of ILs related to the structural dynamics triggered by the change of local polarity or charge distribution. As a solute molecule, we used bis(p-aminophenyl) disulfide (BPADS) which undergoes photolysis by radiating UV pulse and generate radical species[2] (see Fig. 1). Since it shows a dramatical change in the dipole moment by the photolysis, the surrounding solvent should reorient to stabilize the radical species. To capture how cation and anion in ILs respond to the large polarity change in the solution, we monitored the time-resolved absorption and emission spectrum after the photodissociation. We used several phosphonium ILs as a solvent that have various alkyl chain length. All ILs were dried in a vacuum at 65 °C overnight before use.

Fig. 2 is the evolution of absorption spectrum after the photolysis of BPADS in $P_{2225}^+NTf_2^-$ (structure is shown in Fig. 3). The band around 17000 cm^{-1} is due to the radical absorption, and it shifts to the low energy (red-shift) with time. Given that the photodissociation is accompanied by a large increase in the dipole moment, the red-shift could be due to the solvent reorganization of ILs. To extract the time profiles of ΔOD in ILs, the spectrum at each delay times was fit to a log-normal function. Fig. 3 represents the time profile of peak intensity of the absorption spectrum after the photodissociation in $P_{2225}^+NTf_2^-$. For comparison, time profile in THF is also shown in Fig. 3. Concentration of ATP radical in ILs shows a decay with three different time constants, while the concentration in THF does not show a decay. This is because the solvent cage effect²⁾ in ILs caused by the viscous environment around the pair of radicals. Interestingly, comparing the results in ILs with different cation species, the yield of the cage escape is independent of the alkyl chains, which means the solvent cage effect in ILs have no relation with the viscosity. We currently work on the theoretical background supporting these results, and it will be presented at the conference.

[1] *J. Phys. Chem. B*, 119, 15493–15501 (2015) [2] *J. Phys. Chem.*, 100, 19417-19424, (1996)

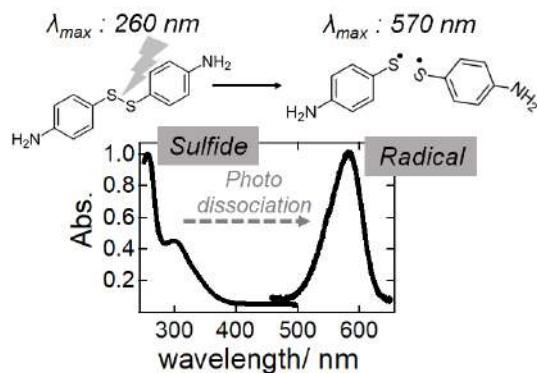


Fig. 1 Spectral shift in the absorption spectrum with the photodissosiaion of aminophenyldisulfide

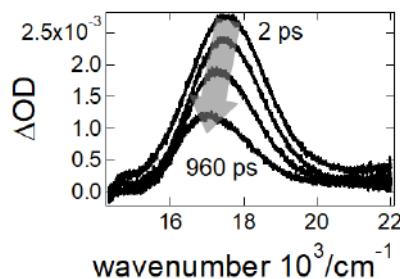


Fig. 2 Transient absorption spectrum of ATP radical in $P_{2225}^+NTf_2^-$

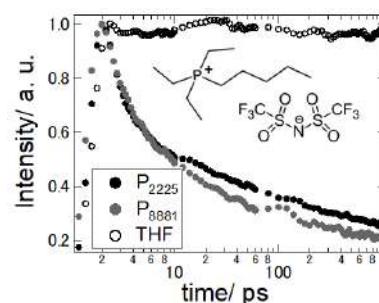


Fig. 3 Time profile of the peak intensity in $P_{2225}^+NTf_2^-$, $P_{8881}^+NTf_2^-$ and THF.

Effect of a hydrated ionic liquid on the photo-cycle and dynamics of photoactive yellow protein

U. Umezaki¹⁾, K. Onodera²⁾, S. Kim³⁾, Y. Nakasone³⁾, M. Terazima³⁾, T. Endo¹⁾, Y. Kimura^{1,2)}

1)Faculty of Science and Engineering, Doshisha University

2)Graduate School of Science and Engineering, Doshisha University

3)Graduate School of Science, Kyoto University

Many recent works show that ionic liquids (ILs) can be biocompatible solvents. For instance, hydrate choline diphosphate (Hy[ch][dhp]) dissolves proteins well and also maintains their activities for a long period[1]. To elucidate the effect of Hy[ch][dhp] towards protein conformation, we have investigated the difference in photocycle reaction of Photoactive Yellow Protein (PYP) between under buffer solution and 30wt% Hy[ch][dhp]. PYP is known as a blue light photosensor protein. When PYP is irradiated by the blue light, photocycle reaction is triggered as shown in Fig. 1. As is indicated by a previous paper, the α -helix in N-Terminal region changes its conformation during the photocyclic reaction from pR to pB[2].

We have investigated the secondary structure change of PYP by addition of [ch][dhp] to buffer solution by circular dichroism spectra. We found that the structure of pG (ground state of PYP) changed depending on the concentration of Hy[ch][dhp]. By adding to [dh][dhp] to buffer solution, at first the intensity of CD spectrum at the α -helix wavelength decreases, suggesting the denaturation of the structure. Interestingly, in 30 wt% Hy[ch][dhp] however, CD intensity recovered to the original intensity, suggesting that pG has the same amount of secondary structure that in buffer solution. Therefore, in this presentation, we focused on the dynamics of PYP in 30 wt% Hy[ch][dhp]. To monitor the conformational change of PYP, we used transient grating spectroscopy (TG). By using TG method, a diffusion coefficient (D) of reactive intermediate with short lifetime can be measured. A typical TG signal of PYP in buffer solution is shown in Fig. 2 (a). It has three growth-decay curves. The first one represents a thermal grating, second one represents the absorption spectrum change between pR₂ to pB, and last one represents the diffusion of pG and pB. The last curve arises due to the difference of the diffusion coefficients between pB and pG derives from the conformation change of α -helix as mentioned above. In comparison with this, the TG signal in 30 wt% Hy[ch][dhp] have only two growth-decay curves (Fig. 2 (b)). At the lecture, the difference of D -values in 30 wt% Hy[ch][dhp] are mainly discussed and the effect of Hy[ch][dhp] on the conformation of PYP is presented.

[1] K. Fujita, D. R. MacFarlane, M. Forsyth, *Chem. Commun.* 4804 (2005).

[2] Y. Hoshihara, Y. Imamoto, M. Kataoka, F. Tokunaga, M. Terazima, *Biophys. J.* 94(6), 2187 (2008).

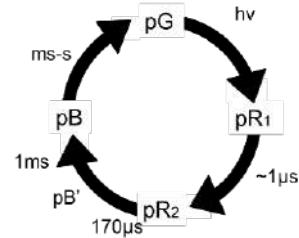


Fig.1. Photocyclic Reaction of PYP

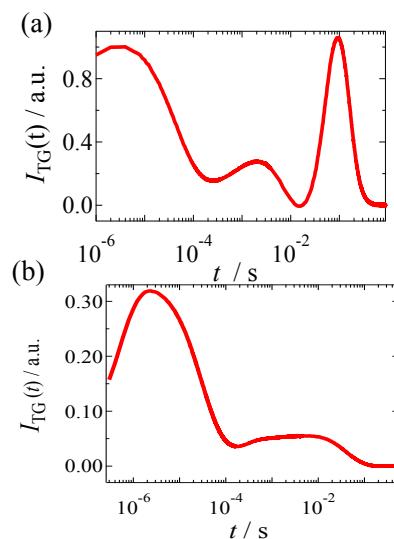


Fig. 2. TG signal of PYP (a) in buffer solution
(b) in 30 wt% Hy[ch][dhp]

Cascade from stationary to chaos on a single candle flame: Revisit to Faraday

**Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto 610-0394,
Japan**
Satoshi Takatori

Under usual condition, burning candle shows stationary combustion. Interestingly, Kitahata discovered that multiple candles exhibit regular rhythmic burning when they are combined in a parallel arrangement. We will report the occurrence of rhythmic combustion with a single candle, when it is situated in a cup as in Fig.1. Fig. 2 shows the spatio-temporal diagram on the combustion of a single candle in a cup, as in the system of Fig. 1. The results on fast Fourier transform have indicated that the fundamental frequency of the combustion was around 10 Hz in Fig. 3.

We will report the cascade of bifurcation “Stationary – Rhythmic – Multi-rhythm - Chaos” by taking the position of the candle in a cup as the control parameter.



**Fig. 1 Candle in cup
(Experimental Setup)**



Fig. 2 Time-Space plot of Oscillation state

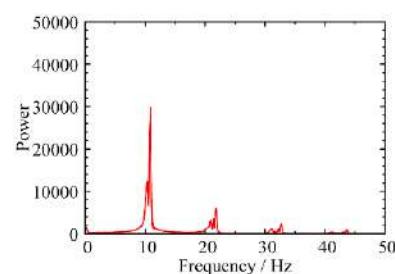


Fig. 3 Power spectrum on the data of Fig.2.

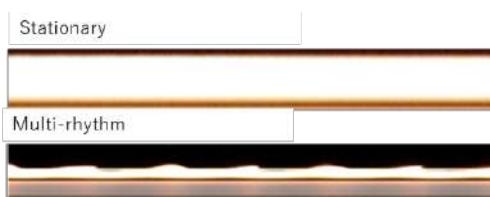


Fig. 4 Cascade of bifurcation of the burning frame caused by the change of the height of the head of candle.