



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.115

2020年1月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<https://www.peptide-soc.jp/>

新年のご挨拶 ～若手の国際化拡大への期待～

新年明けましておめでとうございます。

2020 年いよいよオリンピックイヤーが始まりました。昨年はラグビーワールドカップがあり、ONE TEAM をキーワードに盛り上がりました。この大会は、ラグビーのノーサイド精神をはじめ国際的な友愛思考をたくさん教えてくれ、日本のおもてなし文化を世界に広げる大きな役割を果たしました。オリンピック・パラリンピックは、より大きな国際イベントであり、日本がどのような国際的環境になり、国際的役割を果たせるか、わくわくしますね。

日本ペプチド学会も平成から令和の時代に突入しました。平成までの学会の歴史と国際シンポジウム等の開催状況については、昨年の新年挨拶で記述させていただきました。2019 年 10 月 23 ～ 25 日に東京医科歯科大学で開催された令和初の第 56 回ペプチド討論会は、玉村先生はじめ組織委員等の運営で種々の招待講演も企画され、新しい討論会の様相の引き金となったと思います。2020 年は、鳥取の地で第 57 回ペプチド討論会が河野先生、松浦先生等のお世話により、11 月 9 ～ 11 日の日程にて開催されます。多くの方々のご参加、発表と活発なご討論をお願いいたします。

2018 年の国際ペプチドシンポジウム IPS をはじめ近年の討論会は、英語発表の推奨や韓国 KPPS との連携から始まりアジア諸国や関連学会からの参加者も増加して国際性を増してきています。一方アジア・パシフィック地域での IPS の開催は、2018 年京都の後、2021 年のオーストラリア、2024 年の中国、2027 年の韓国と予定されています。つまり今後 10 年間、日本での大規模な国際的シンポジウムが計画されていないということです。IPS とは別の国際的企画も学会として考案していく必要性が求められています。日本ペプチド学会ではこれまで、約 3 年に 1 度は国際的企画を実行することを謳っています。皆様 아이디어をお願いしたいところです。

国際的企画において必要とされる、また開催によって醸成・発展されるものとして、研究者の国際的なネットワークがあります。日本ペプチド学会には、30 年前に学会を開始された先人等の思いと国際的企



三原 久和

画を支えていた国際ネットワーク、現在の学会執行部世代のそれぞれの国際的関係があります。さらに、若い世代の国際的な友人関係強化への期待があります。近年、中国他の国々と比べて、国内の特に若手の国際的関係の弱さが憂慮されている文章をよく目にします。ペプチド学会の若い世代の世界における友人関係やそのネットワークはどうなのでしょう？論文を読めば、海外研究者の研究内容は理解できますが、その根底にあるアイデアや発想がどのような環境の中で生まれてきたかは、研究者どおしのつながりを作らないと理解することはできません。国際的な良好な関係をより大きく構築していくためには、たとえば海外でのポスドク体験があれば、そこで培ったネットワークを利用し、拡大する。ポスドク経験がなくとも国際会議に積極的に参加し、友人関係構築を模索する。海外での学会前後にペプチド関連研究者のラボを積極的に訪問する。国内に数名程度の海外研究者を招待して小規模のワークショップ等を開催する。国や大学での支援制度を利用する、等々考えられます。これらの取組はひとりで行動しなくても数名の友人を ONE TEAM として話し合い、動くことはできます。国や大学等の特に若手の国際的活動に対する支援も拡大しています。大学等の日々の日課で、そんな国際性を拡大する暇などないですよ、という声が聞こえてきそうですが、このような体験は正直わくわくして楽しいものですし、将来の皆さんの研究の幅や多様性を拡大し、様々な意味での地位を確立していくことに必ず役立ちます。その結果、ある程度の規模の国際的ワークショップやシンポジウムを組織委員等として開催することは、皆さんの国際的な信頼性を大きく増大させてくれます。科学の世界での信頼の獲得は、研究者として成長する上で最も重要な観点のひとつです。令和の時代、若い方々が、ますます国際性を拡大する学会となることを大いに期待しています。

新年早々から年配者の小言のような挨拶になってしまいましたが、ご容赦ください。学会としても皆様の国際的信頼を醸成、向上させるための企画を考えていきたいと思っています。皆様からのご意見も頂戴できれば幸いです。

2020 年も皆様にとって実りの多い国際的研究年となることを祈っております。

みはら ひさかず
第 15 期日本ペプチド学会会長
東京工業大学 生命理工学院
hmihara@bio.titech.ac.jp

第 56 回ペプチド討論会開催報告

第 56 回ペプチド討論会は、日本ペプチド学会 30 周年の記念の年に、令和最初の討論会として、2019 年 10 月 23 日(木)から 25 日(金)の日程で、東京医科歯科大学の玉村が世話人代表として開催させていただきました。会場である東京医科歯科大学は、都心のど真ん中に位置し、東京駅から一番近い国立大学として、東京駅から 4 分でアクセスできる御茶ノ水駅前のロケーションです。ペプチド討論会はここ 3 年、関西で開催されており、また、都心での開催となると、1991 年(世話人鈴木昭憲先生)以来、実に 28 年ぶりとなり、どれくらい参加者を確保できるか心配していました。しかし、実際は、577 名もの方々にご参加いただきました。海外からも韓国、フィリピン、インド、ドイツ、アメリカ、メキシコ等から多数ご参加いただき、感謝いたしております。今回の討論会では、口頭発表 53 題(内訳: 特別講演 1 題、招待講演 6 題、受賞講演 3 題、一般 19 題、若手 24 題)、ポスター発表 162 題の申し込みを頂くことができました。ご講演・ご発表いただきました先生方に重ねて感謝申し上げます。

特別講演は、国立国際医療研究センター研究所所長・理事の満屋裕明先生にお願い致しました(写真 1)。満屋先生は、世界で最初の AIDS 治療薬 3 種類 AZT (ジドブジン)、ddI (ジダノシン)、ddC (ザルシタビン) の臨床研究・開発に中心的な役割を果たされ、また現在世界でファーストラインの HIV 感染症/AIDS の治療薬である「第二世代」のプロテアーゼ阻害剤 darunavir (ダルナビル) の開発にも成功されています。ご講演では、ご自身のスピーカーをご持参いただき、ビデオも交えて、とてもエネルギーギッシュなプレゼンをされ、多くの参加者が感銘を受けたのではないかと思います。招待講演 6 題は、「第 56 回討論会の趣旨」でもあります「国内外の中堅・若手研究者の交流を積極的に図ること」を意図しました。最初の招待講演 2 題は、例年通り



玉村 啓和

韓国ペプチド・タンパク質学会 (KPPS) から Yan Lee 先生 (Seoul National University) と Jeong Kyu Bang 先生 (Korea Basic Science Institute) をお招きしました。韓国からは、現 KPPS 会長の Yangmee Kim 先生 (Konkuk University) を含め、総勢 20 名以上の方々にご参加頂きました。これからも、最も近い国同士の日韓学術交流がさらに発展することを期待しております。また、同じくアジアのインドペプチド学会 (IPS) から、Govindaraju Thimmaiah 先生 (Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research) をお招きし、アメリカからも若手研究者、11th IPS/26th APS2019 (Monterey) において The APS Early Career Lectureship Award を受賞された Monika Raj 先生 (Auburn University) をお招きしました。次世代の日本ペプチド学会の研究者が国際的に交流を深めることを期待しています。さらに、今回の開催地の東京近辺では、これまでペプチド学会には所属していなかったが、ペプチド科学の研究で大きな成果を挙げている中堅・若手の研究者が多数おられますので、その中から生長幸之助先生 (東京大学) と佐藤慎一先生 (東京工業大学) をお招きして招待講演をお願いしました。このような若い研究者をペプチド学会の人たちに広く紹介したいのと同時に、これらの先生方にも是非ペプチド学会を知ってもらい、中堅・若手研究者の交流を積極的に推進していただきたいと思っています。

10 月 24 日に開催されました日本ペプチド学会通常総会において、木曾良明先生 (長浜バイオ大学客員教授) および相本三郎先生 (一般財団法人蛋白質研究奨励会理事長) に「名誉会員証」が授与されました。お二人の先生方に心から御祝い申し上げると同時に、ペプチド科学研究の発展および日本ペプチド学会への多大なる貢献に対して深謝致します。また、令和最初の日本ペプチド学会「学会賞」は、野水基義先生 (東京薬科大学) が受賞され、受賞記念講演をお願い致しました。野水先生の日本ペプチド学会への多大なる貢献に対して心より感謝致しますと同時に、益々の若手研究者の育成にご尽力頂きたいと思っています。「奨励賞」は、吉矢拓先生 (ペプチド研究所) ならびに林剛介先生 (名古屋大学) が受賞され、講演をお願い致しました。両先生の益々のご研究の発展を祈念するとともに、若手研究者の交流の活発化をお願いする次第です。

また、討論会当日の発表による表彰に関しまして通常の討論会世話人および JPS からの賞に加えて、今回はイギリス王立化学会 Royal Society of Chemistry Japan から、Chemical Science 賞と Chemical Communications 賞を授与していただきました。選考にあたっていただきました先生方にあらためて御礼申し上げます。若手口頭発表では、Chemical Science 賞として Sayaka Kanai さん (Waseda University)、最優秀賞 (Excellent Stone Award) として Naoki Kamo さん (The University of Tokyo)、また Chemical Communications 賞として Makoto Nagata さん (Hokkaido University)、優秀賞 (Good Stone Award) として Yuki Kodama さん (Shizuoka University)、Nozomu Nagashima さん (The University of



写真 1 左から、野水基義先生、満屋裕明先生、玉村

Tokyo), Anh Tan Truong さん (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences / University of Southern California), Yasuhiro Fukuda さん (The University of Tokyo) が選ばれました (写真 2)。一方、ポスター発表では、Chemical Science 賞として Hiroto Furukawa さん (Tottori University), Chemical Communications 賞として Yuki Hosono さん (The University of Tokyo) および Keisuke Hamada さん (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences), また JPS ポスター賞として Takahiko Murata さん (KANEKA CORPORATION), Daishiro Kobayashi さん (Tokushima University), Yuki Takechi-Haraya さん (National Institute of Health Sciences), Keisuke Shimizu さん (Tokyo University of Agriculture and Technology), Keisuke Aoki さん (Kyoto University), Kenji Hatta さん (Tottori University), Jungyeon Kim さん (The University of Tokyo), Hee Myeong Wang さん (Pohang University of Science and Technology), Noriko Omura さん (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences), Taka Sawazaki さん (The University of Tokyo), Yamato Komatsu さん (The University of Tokyo) が選ばれました (写真 3)。皆さんに、ご受賞のお祝いを申し上げると同時に、ご研究の益々の発展およびペプチド科学へのさらなる貢献をお願いしたいと思います。

ペプチド討論会の翌日 10 月 26 日 (土) には、東京医科歯科大学生体材料工学研究所にて市民フォーラムを開催致しました。本フォーラムは、アミノ酸・ペプチド・タンパク質に関する科学を、より多くの方々にご理解頂くために、ペプチド討論会年会の開催に合わせて、毎年企画されています。今回の市民フォーラムは、「生命を支えるアミノ酸・ペプチド〜知と癒しの科学」を主題に開催し、産学の第一線で活躍の 4 名の先生に、「アミノ酸・ペプチド」とは一体何か、生命や健康との結びつきや癒しについてわかりやすく解説して頂きました。講演をいただきました野水基義先生 (東京薬科大学), 菊池信矢先生 (味の素株式会社), 大塚製薬株式会社の方, 小出隆規先生 (早稲田大学) に厚く御礼申し上げます。市民

フォーラムには 55 名の参加を頂き、そのうち半数が一般の方々でした。しかし、例年と比べて、年齢層が若く、高齢者の方の参加者はゼロでした。周りに住んでいる人が少ない (千代田区の人口 5 万人、ちなみに平日昼間の人口 90 万人) 上、近くの高級マンションの住民も若い富裕層が占めています。高齢者の市民の方々を集客するには、最悪の地であることがわかり、反省させられました。しかし、若い元気な世代から、「アミノ酸で健康を測るメリットを他の方法と比べて述べてください」や「食べても何にもならないコラーゲンが体に良いと最初に言った人はだれですか?」、「最近なぜ、ペプチドが薬や健康ドリンクで注目されているのですか? 将来性は?」などのペプチド討論会よりも鋭い質問をたくさん頂き、ディスカッションが白熱しました。別の意味で、フォーラムの役割を果たせたのではないかと考えております。

最後になりましたが、本討論会を地価の高い都心のだ真ん中で開催するにあたり多くの企業・財団・個人より、御寄附、協賛、飲料提供、広告掲載、ランチョンセミナー開催、機器展示のお申込みを頂き、多大なご支援を賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、優秀な若手口頭発表とポスター発表に対して、Chemical Science 賞と Chemical Communications 賞を授与していただきましたイギリス王立化学会 Royal Society of Chemistry Japan の浦上裕光博士に厚く御礼申し上げます。さらに、討論会の準備と運営、プログラム編成等にご協力頂きました、京都大学薬品製造出身の野水基義先生 (東京薬科大学), 林良雄先生 (東京薬科大学), 小出隆規先生 (早稲田大学), ならびに三原久和先生 (東京工業大学), 水野真盛先生 (野口研究所) の研究室のスタッフ・学生さんに心より御礼申し上げます。また、鳴海哲夫先生 (静岡大学) と田中智博先生 (東京理科大学) をはじめとする玉村研の OB/OG, 大橋南美先生 (昭和薬科大学), 野村渉先生 (広島大学), 堤浩先生 (東京工業大学) および研究室の学生さん、そして、玉村研の現スタッフの辻耕平助教, 小早川



写真 2 若手口頭発表賞受賞者。一番左は Royal Society of Chemistry Japan 日本マネージャーの浦上博士。



写真3 ポスター賞受賞者

拓也助教、亀井朋恵秘書と研究室メンバーにも感謝致します。また、事務、Web システム取扱に多大なご協力を頂いていた学会事務局の宮嶋令子様、森川和憲様に心より御礼申し上げます。さらに、討論会のノウハウを懇切丁寧に教えて頂きました藤井郁雄先生、藤原大佑先生を初めとする第54回ペプチド討論会組織委員である大阪府立大学の先生方、児島千恵先生、中瀬生彦先生、円谷健先生、道上雅孝先生に心より御礼申し上げます。

今回討論会の趣旨でありました「国内外の中堅・若手研究者の交流を深めよう!」が、今後も推進できること、および日本ペプチド学会とペプチド科学が益々発展することを祈念して、令和元年第56回ペプチド討論会のご報告とさせていただきます。

たまむら ひろかず
東京医科歯科大学 (TMDU)
生体材料工学研究所
メディシナルケミストリー分野
tamamura.mr@tmd.ac.jp

令和元年度日本ペプチド学会賞受賞に際して

この度、日本ペプチド学会賞を「ペプチド科学を基盤とする細胞接着研究」の研究題目で受賞することができ、大変光栄に思うとともに、今後も日本ペプチド学会の発展に貢献できるように努力していきたいと思っています。選考にあたられました委員の先生方および日本ペプチド学会の関連の先生方に厚く御礼申し上げます。また今回の受賞は私の研究を支えていただいた京都大学薬学部、米国国立保健衛生研究所 (NIH)、カナダ国立研究所 (NRC)、北海道大学大学院地球環境科学研究科、東京薬科大学薬学部病態生化学教室の恩師の先生方、先輩、同僚、および卒業生の方々のご協力とご支援の賜物であり、この場を借りて厚く御礼申し上げます。



野水 基義

筆者は1982年に東京薬科大学を卒業後、京都大学大学院に進学し、故矢島治明先生の主宰される薬学部薬品製造学教室にて、ペプチド化学の手ほどきを受けました。そこでは、藤井信孝先生、故船越奨先生、赤路健一先生らにご指導を受けながら液相法でのペプチド合成で学位論文をまとめることができました。その後、キリンビール(株)研究所を経て、1989年より米国 NIH の国立癌研究所 (NCI) の故 Peter Roller 先生の下でペプチドを使ったメディシナルケミストリーの研究に従事しました。その頃、共同研究先の米国 NIH の国立歯科学研究所 (NIDR) の山田吉彦先生の元で「細胞接着」に出会い、大変興味を持ちました。1992年より米国 NIH/NIDR に移り、山田吉彦先生、Hynda Kleinman 先生、Kenneth Yamada 先生らから細胞生物学研究のご指導を直接受け、ペプチド科学を基盤として細胞接着研究を始めました。その後、カナダ NRC を経て、1998年より北海道大学大学院地球環境科学研究科に移り、西則雄先生から高分子化学のご指導を受け、細胞接着研究をさらに進展することができました。2004年より東京薬科大学に異動し、これまでの研究を基盤に更なるチャレンジを行ってきました。このように筆者の「ペプチド科学を基盤とする細胞接着研究」は、京都大学でのペプチド化学、米国 NIH での細胞生物学、北海道大学での高分子化学を融合し、東京薬科大学においてさらに発展させたものです。

以下今回の受賞の対象となった筆者の研究について概説いたします。

(1) 細胞接着ペプチドの探索研究

基底膜は、表皮下や血管周囲、筋肉細胞や神経細胞のまわりなどほとんどの組織に存在しているうすい膜状の細胞外マトリックスで、個体の発生や分化、組織の修復あるいはがんの増殖転移に深く関与しています。基底膜の構成成分には、IV型コラーゲン、ラミニン、パールカン (ヘパラン硫酸プロテオグリカン)、ニドジェンなどの巨大分子が知られており、これらが互いに結合したスプラモレキュラーネットワークによるマトリックスを形成し、細胞に対して作用しています。これらの基底膜構成成分は様々な機能を有しますが、中でもラミニンは細胞接着をと

おして基底膜の生物活性の中心を担っていることが知られています。著者はラミニンの機能部位を合成ペプチドを用いて網羅的に解析することにより複雑なラミニンの機能を個々の機能部位に分けて解明し、さらにそこから得られる様々な活性配列（活性ペプチド）を医薬分野に応用することを目的に研究を行いました。

ラミニンは、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の3種類のサブユ

ニットからなる巨大なヘテロ3量体タンパク質です。現在までに5種類の α 鎖、3種類の β 鎖、3種類の γ 鎖が同定されており、それらの組み合わせにより19種類のアイソフォームが知られており、組織特異的・発生段階特異的に発現しています。筆者は、合成ペプチドによる網羅的スクリーニング法を確立し、図1に示しましたようにラミニン-111 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) のアミノ酸配列を網羅した673種類のペプチドを合成

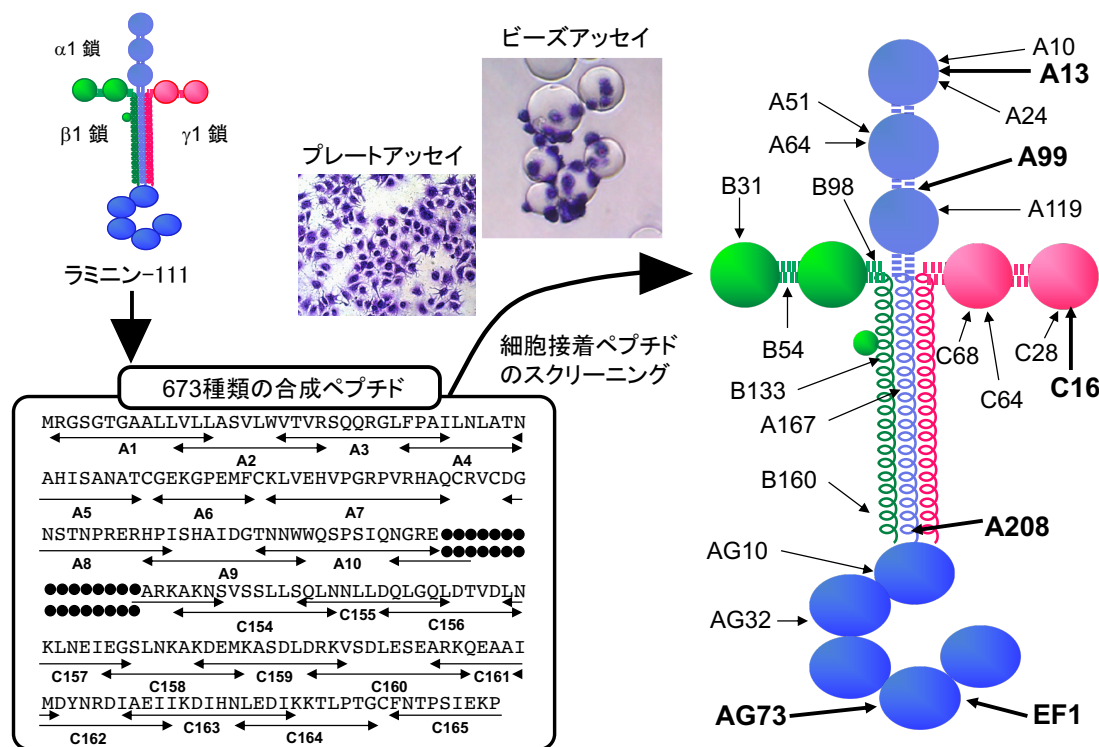


図1 ラミニン-111の細胞接着部位の網羅的解析

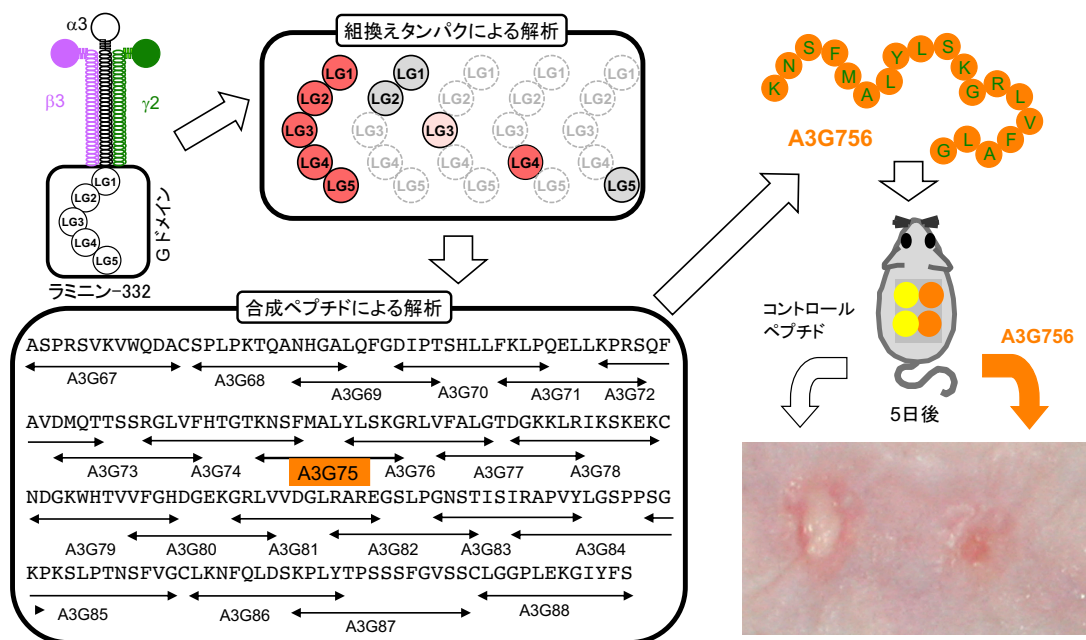


図2 ラミニン $\alpha 3$ 鎖 G ドメインの生物活性部位の探索と創傷治癒活性。細胞接着活性のある組換えタンパクを赤色で示した。写真は5日後のマウス背中の損傷部。

し、種々の細胞を用いて細胞接着活性を測定することにより、約 20 種類の活性ペプチドを同定しました¹⁻⁴。活性ペプチドのなかから細胞の伸展や遊走、神経突起伸長を促進するもの、またインテグリンや膜貫通型プロテオグリカンのシンデカンなどに特異的に結合するものを見いだしました。例えば、 $\alpha 1$ 鎖 G ドメインの配列である AG73 (RKRLQVQLSIRT: マウスラミニン $\alpha 1$ 鎖 2719-2730) は、シンデカンに結合し、強い細胞接着活性を示し、細胞の遊走・浸潤やマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の放出、ヒト唾液腺由来細胞に作用して腺様構造を形成、神経細胞に作用して神経突起伸長を促進させることなど様々な生物活性を持つことが示されました⁵⁻⁸。また、同様に EF1 (DYATLQLQEGRLHFMFDLG: マウスラミニン $\alpha 1$ 鎖 2747-2765) は、 $\alpha 2\beta 1$ インテグリンと特異的に結合し、細胞接着と細胞伸展活性を示すことが分かりました⁹。

組織特異的、あるいは発生段階特異的に様々な 19 種類のラミニンアイソフォームを発現していることが明らかとなってきていますが、これらの特異性に最も関連しているのが α 鎖です。例えば、ラミニン

$\alpha 1$ 鎖を含むアイソフォーム (ラミニン-111) は発生初期やがん組織に多く発現し、ラミニン $\alpha 2$ 鎖を含むアイソフォーム (ラミニン-211, -221 など) は神経組織特異的に、ラミニン $\alpha 3$ 鎖を含むアイソフォーム (ラミニン-332, -321 など) は皮膚に多く、ラミニン $\alpha 4$ 鎖を含むアイソフォーム (ラミニン-411, -421 など) は血管内皮に多く、ラミニン $\alpha 5$ 鎖を含むアイソフォーム (ラミニン-511, -512 など) はほとんどの組織に存在します。これらの機能部位の研究を行うことで、全てのラミニンに共通に保存されている機能部位や、神経や皮膚などの組織特異的に作用する機能部位の同定が期待されます。

例えば、図 2 のように皮膚に多く存在するラミニン $\alpha 3$ 鎖の G ドメインの活性配列の探索では、組み換えタンパクを用いた実験から LG4 モジュールに強い細胞接着が示され、次に LG4 モジュールの一次配列を網羅した合成ペプチドを用いたスクリーニングから、シンデカンを受容体とする細胞接着ペプチドとして A3G75 を同定しました¹⁰⁻¹¹。A3G756 は、皮膚に多く存在するラミニン $\alpha 3$ 鎖由来で、創傷治癒への効果が期待されたため、実際のマウスを用いて評

表 1 主な活性ペプチドの生物活性

ペプチド	アミノ酸配列	受容体	生物活性
A13	RQVFQVAYIIKA	syndecan/integrin $\beta 1$	血管新生
A99	AGTFALRGDNPQG	integrin $\alpha \nu \beta 3$	神経突起伸長、がん転移抑制
A208	AASIKVAVSADR	110-kDa protein	神経突起伸長、MMP放出
AG73	RKRLQVQLSIRT	syndecan	細胞分化、神経突起伸長
EF1	DYATLQLQEGRLHFMFDLG	integrin $\alpha 2\beta 1$	細胞伸展
C16	KAFDITYVRLKF	syndecan/integrin $\beta 1$	血管新生、MMP放出
A2G10	SYWYRIEASRTG	integrin $\alpha 6\beta 1$	細胞伸展
A2G78	GLLFYMARINHA	α -dystroglycan	Not determined
A2G80	VQLRNGFPYFSY	α -dystroglycan	Not determined
A3G756	KNSFMALYLSKGRLVFALG	syndecans	創傷治癒
A5G27	RLVSYNGIIFFLK	CD44	がん転移抑制

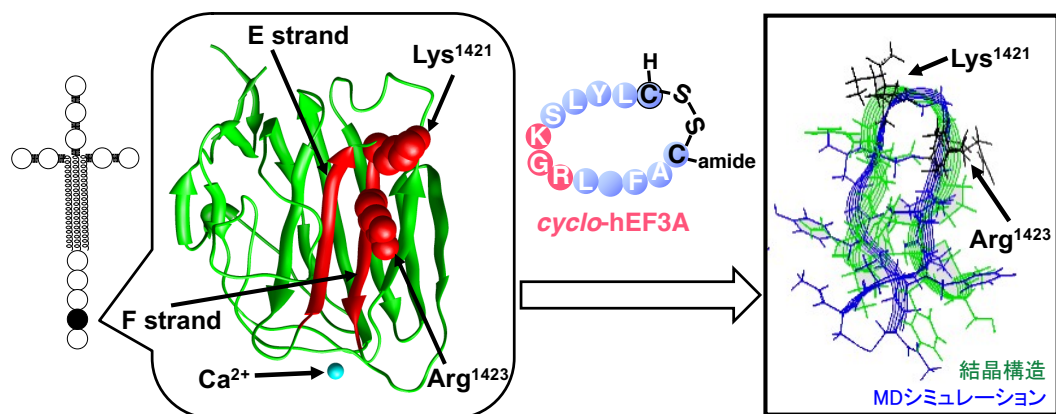


図 3 ラミニン $\alpha 3$ 鎖 LG4 モジュールのループ部位をミミックした *cyclο*-hEF3A の構造解析。環状ペプチドの構造 (青) はタンパク質の結晶構造 (緑) のループ構造に類似。

価したところ、創傷治癒を促進することが示されました¹²。このように鎖特異的な作用が活性ペプチドにおいても保存されていることが示されました。

多彩な生物活性を有しているラミニンアイソフォームには様々な活性部位の存在が考えられます。そこで全ラミニンアイソフォームを構成する5種類の α 鎖、3種類の β 鎖、3種類の γ 鎖の活性部位の網羅的解析を約3,000種類の合成ペプチドを用いて行い、約100種類の活性ペプチドを同定しました⁶⁻⁹。表1に示した代表的な活性ペプチドの様に、インテグリン¹³⁻¹⁹、シンデカン²⁰⁻²⁴、 α -ジストログリカン²⁵⁻²⁶、CD44²⁷⁻²⁸を受容体とするものを発見し、これらの生物学的機能を解明してきました。

(2) 細胞接着ペプチドの構造と活性に関する研究

ラミニンの網羅的スクリーニングで同定した細胞接着ペプチドの構造と活性の関連を解明してきました。多くの活性ペプチドはラミニン分子の表面に出ているループ部位に位置していることがわかってきました。そこで、ループ構造をミミックするために種々の環状ペプチドを作製して活性をみたところ、飛躍的に活性を増大する環状ペプチドが存在することがわかりました²⁹⁻³⁰。図3に示したように、ラミニン $\alpha3$ 鎖のLG4モジュールに存在するhEF3Aを環状化したcyclo-hEF3Aはラミニン分子内でのループ構造に類似した構造をとり、鎖状のhEF3Aに比べ遙かに強い活性を示すことがわかりました³¹。

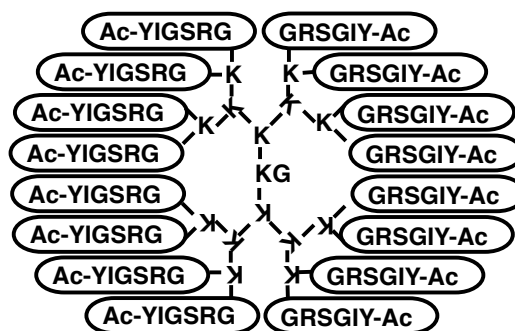
また、IKVAV配列を含むペプチドなどいくつかのペプチドは、アミロイド線維を形成することにより細胞接着活性を発現していることを見出しました³²⁻³⁶。さらに、このアミロイド線維を形成するペプチドにインテグリンに結合し細胞接着活性を示すペプチドを結合させることにより、アミロイド線維を形成しインテグリンを介して細胞に作用するバイオマテリアルの作製に成功しました³⁷。

このように、細胞接着ペプチドの構造と活性に関する研究から、受容体との結合メカニズムの解明や創薬への方向性を示すことができました。

(3) 細胞接着ペプチドの創薬、DDSなど医薬分野への応用研究

筆者は、細胞接着ペプチドが、創薬、DDSなど医薬分野に応用可能であることを示してきました。細胞接着は細胞作用の最初のステップです。この最初のステップを制御する細胞接着ペプチドは創薬研究に有効となります。例えば、図4Aのように、がんの転移を抑制するYIGSRペプチドの生体内での安定性と作用増強を図ってデザインしたmultimeric-YIGSR

A. multimeric-YIGSR (Ac-Y16)



B. AG73-リボソーム

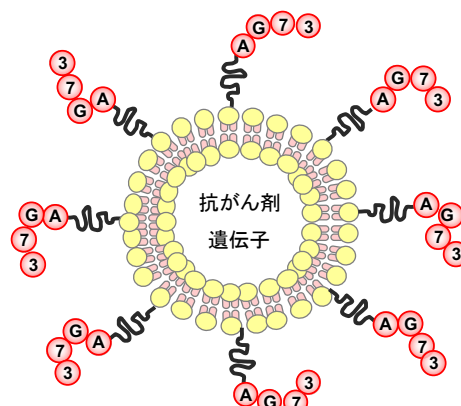


図4 multimeric-YIGSR (Ac-Y16) と AG73 修飾リボソーム

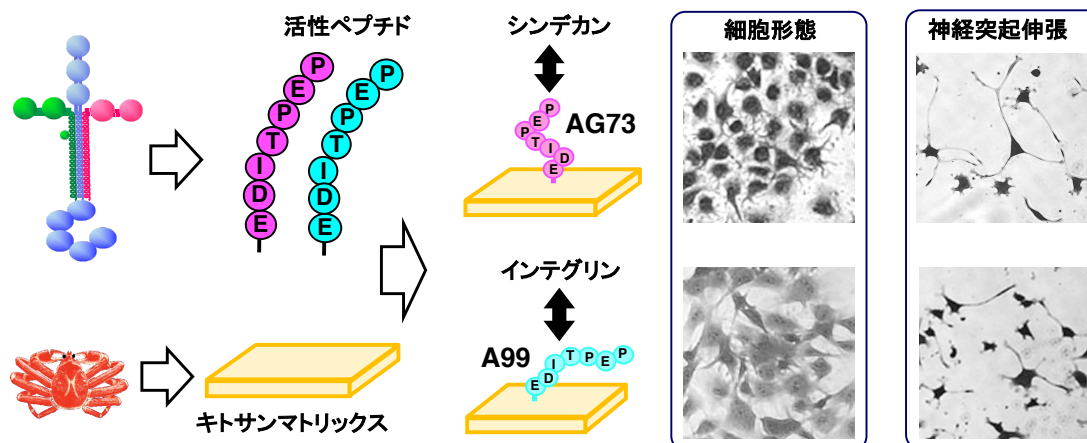


図5 ペプチド-キトサンマトリックスの作製と生物活性

(Ac-Y16)を作成したところ、YIGSRモノマーに比べ遙かに強いがん転移抑制活性を得ることができ、様々ながん細胞に対して有効であることが示されました³⁸⁻⁴¹。また、図4Bのように、AG73を抗がん剤や遺伝子を含むリポソームに修飾することにより、がん細胞に多く発現するシンデカンに対して特異的に結合し、がん細胞特異的に集積するリポソームの開発に成功しました⁴²⁻⁴⁷。これらの研究をとおして、細胞接着ペプチドの医薬分野への応用を行いました。

(4) 細胞接着ペプチドのバイオマテリアルへの応用研究

再生医療や組織工学の発展に伴い、これらへの応用を目的としたバイオマテリアルの開発が必須となってきました。以前より発生や再生を制御するためには細胞外マトリックス、特に基底膜を模倣することが理想的とされ、「マトリゲル」(マウス腫瘍由来の抽出基底膜)が細胞工学実験に汎用されてきましたが、実際の臨床応用は不可能であります。筆者は、マトリゲルの主成分であるラミニンの活性ペプチドを用いたバイオマテリアルへの応用研究を行ってきました。

図5に示したように、ラミニン活性ペプチドを多糖類のキトサンのマトリックスに固定化したペプチド-キトサンマトリックスの開発を行いました⁴⁸⁻⁵⁰。このペプチド-マトリックスは、固定化した活性ペプチドの受容体に特異的に結合し、細胞に対して足場を提供するとともに様々な生物活性を有することが示されました。また、ペプチドをマトリックスに固定化することで細胞に対する作用が飛躍的に増加することが示され、ペプチド-マトリックスがバイオマテリアルとして有用な手法であることが示されました。さらに、多糖としてアルギン酸、ヒアルロン酸、アガロースを用いることにより、ペプチド-マトリックスの応用範囲が広がることを示しました⁵¹⁻⁵²。

ペプチド-キトサン膜を用いヒト表皮細胞をヌードマウスに効果的に移植出来ることなど、実際の細胞移植に有効であることを証明しました⁵³⁻⁵⁷。図6に示したように、AG73-キトサン膜にヒト表皮細胞を接着させて表皮細胞組込み型創傷被覆材とし、ヌードマウスの側腹部に皮膚欠損創を作製し、表皮細胞組込み型創傷被覆材を移植して経時的に組織学的所見を観察しました。3日後のヌードマウス側腹部に

ヒト表皮細胞が生着し、角化していることが観察されました。以上のように、ペプチド-キトサン膜が細胞移植に有効であることが実際の動物を用いた実験から示すことができました。

一般に、細胞接着タンパク質は複数の活性部位を持ち、様々な受容体に作用しています。図7のように、ラミニン $\alpha 1$ 鎖LG4モジュールは、組換えタンパクを用いた実験からインテグリンに結合するEF1部位とシンデカンに結合するAG73部位で細胞に接着し、細胞伸展や神経突起伸長などを促進することを見出しました⁵⁸。次に、ラミニン $\alpha 1$ 鎖LG4モジュールの活性を模倣したペプチド-マトリックスをデザインするため、EF1zz(ATLQLQEGRLHFXFDLGKGR, X:Nle)とAG73をキトサンマトリックスに比を変えて固定化したEF1zz/AG73-キトサンマトリックスを作製しました。EF1zzとAG73を9:1のモル比でキトサンマトリックスに結合したところ、細胞接着活性が飛躍的に増加し、ラミニン $\alpha 1$ 鎖LG4モジュールと同等な細胞伸展や神経突起伸長促進活性を示すことを見出しました⁵⁹。これは異なる受容体に結合する複数のペプチドをマトリックス上に混合して固定化することにより受容体間の相互作用による相乗効果を誘発することが可能であることを示すものとなりました。

さらに、筆者はマトリゲルの主要成分であるラミニン-111の活性を模倣すべく、図8のように(1)ラミニン-111の合成ペプチドを用いた網羅的スクリーニングにより60種類の活性ペプチドを同定し、(2)その活性ペプチドをキトサンマトリックスに固定化したときに活性を有する28種類の詳細な生物活性の解析から5種類のグループに分け、(3)各グループの中で最も強い細胞接着活性を示すペプチドを混合してキトサンマトリックスに固定化した混合ペプチド-キトサンマトリックスを作成しました⁶⁰。この混合ペプチド-キトサンマトリックスは単一のペプチド-キトサンマトリックスより遙かに強い細胞接着活性を示し、人工基底膜ともいえるバイオマテリアルとしての応用が期待されます。本研究は、合成ペプチドを用いた細胞外マトリックスタンパク質の分子解剖とその機能解明、さらには再構築といった新しい流れを示すものであります(図8)。

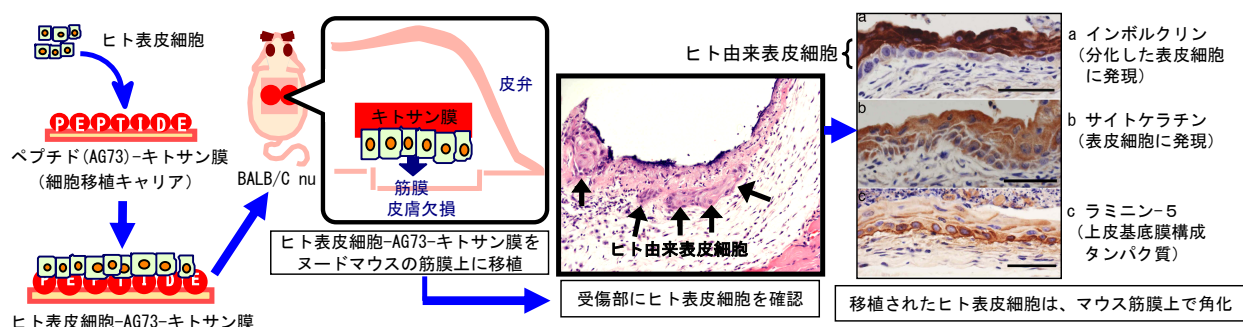


図6 ペプチド-キトサン膜を用いた細胞移植実験。ペプチド-キトサン膜上で培養したヒト表皮細胞をヌードマウスに移植したところ、生着し、マウス筋膜上で角化した。

おわりに

筆者のこれまでの研究を概説させて頂きました。筆者は大学卒業以来、色々なところを転々とし、そこで出会った科学を融合させてきました。その結果、「ペプチド科学を基盤とする細胞接着研究」にたどり着きました。異分野に乗り込んでチャレンジし、それを取り込み、そして新しいものを創造していく、これも科学のひとつの方法ではないかと思います。筆者は旅人のような研究者ですが、ペプチド化学からスタートし、常にペプチドを中心にした科学を展開してきました。これからも旅人のような研究スタイルを続け、後進の指導、ペプチド学会の発展に貢献

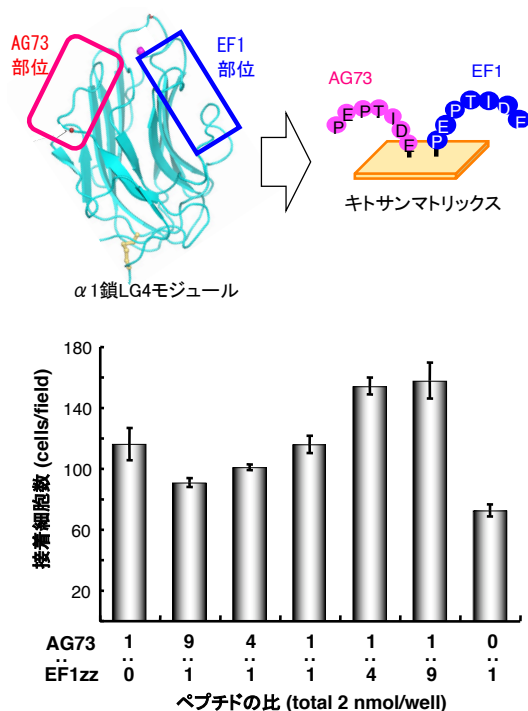


図7 ラミニン α1 鎖 LG4 モジュールの活性をミックスした混合ペプチドキトサン膜とその活性

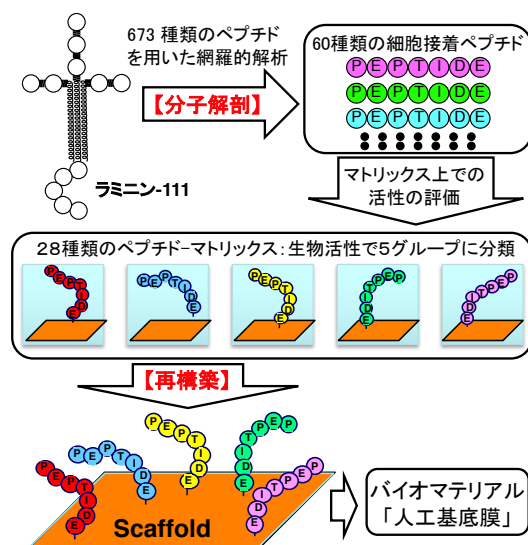


図8 ラミニン-111 の分子解剖と再構築

していきたいと思います。

参考文献

- Nomizu, M. et al. J Biol Chem 1995, 270, 20583–20590.
- Nomizu, M. et al. J Biol Chem 1997, 272, 32198–32205.
- Nomizu, M. et al. J Biol Chem 1998, 273, 32491–32499.
- Nomizu, M. et al. Arch Biochem Biophys 2000, 378, 311–320.
- Hoffman, M. P. et al. J Biol Chem 1998, 273, 28633–28641.
- Kadoya, Y. et al. Dev Dyn 1998, 212, 394–402.
- Hoffman, M. P. et al. J Biol Chem 2001, 276, 22077–22085.
- Suzuki, N. et al. Biochemistry 2003, 42, 12625–12633.
- Suzuki, N. et al. J Biol Chem 2003, 278, 45697–45705.
- Kato, K. et al. Biochemistry 2002, 41, 10747–10753.
- Utani, A. et al. J Biol Chem 2003, 278, 34483–34490.
- Araki, E. et al. Mol Biol Cell 2009, 20, 3012–3024.
- Hozumi, K. et al. Biochemistry 2009, 48, 5375–5381.
- Urushibata, S. et al. Arch Biochem Biophys 2010, 497, 43–54.
- Hozumi, K. et al. J Biol Chem 2012, 287, 25111–25122.
- Katagiri, F. Arch Biochem Biophys 2012, 521, 32–42.
- Katagiri, F. et al. Biochemistry 2012, 51, 4950–4988.
- Katagiri, F. Arch Biochem Biophys 2014, 550–551, 33–41.
- Katagiri, F. et al. Biochemistry 2014, 53, 3699–3708.
- Nomizu, M. et al. Biochemistry 2001, 40, 15310–15317.
- Makino, M. et al. Exp Cell Res 2002, 277, 95–106.
- Okazaki, I. et al. J Biol Chem 2002, 277, 37070–37078.
- Ichikawa, N. et al. Biochemistry 2005, 44, 5755–5762.
- Urushibata, S. et al. Biochemistry 2009, 48, 10522–10532.
- Suzuki, N. et al. Matrix Biol 2010, 29, 143–151.
- Sugawara Y. et al. Sci Rep 2019, 9, 13037.
- Hibino, S. et al. Cancer Res 2004, 64, 4810–4816.
- Hibino, S. et al. Cancer Res 2005, 65, 10494–10501.
- Yokoyama, F. et al. Biochemistry 2004, 43, 13590–13597.
- Yokoyama, F. et al. Biochemistry 2005, 44, 9581–9589.

31. Kato-Takagaki, K. et al. Biochemistry 2007, 46, 1952–1960.
32. Yamada, M. et al. FEBS Lett 2002, 530, 48–52.
33. Kasai, S. et al. Biopolymers 2004, 76, 27–33.
34. Kasai, S. et al. Biochemistry 2007, 46, 3966–3974.
35. Katagiri, F. et al. Arch Biochem Biophys 2010, 500, 189–195.
36. Katagiri, F. et al. Biochemistry 2010, 49, 5909–5918.
37. Ohga, Y. et al. Biomaterials 2009, 30, 6731–6838.
38. Nomizu, M. et al. Cancer Res 1993, 53, 3459–3461.
39. Kim, W. H. et al. Cancer Res 1994, 54, 5005–5010.
40. Iwamoto, Y. et al. Brit J Cancer 1996, 73, 589–595.
41. Yoshida, N. et al. Brit J Cancer 1999, 80, 1898–1904.
42. Negishi, Y. et al. Mol Pharm 2010, 7, 217–226.
43. Omata, D. et al. Mol Pharm 2012, 9, 1017–1023.
44. Negishi, Y. et al. Biomaterials 2013, 34, 501–507.
45. Hamano, N. et al. Mol Pharm 2013, 10, 774–779.
46. Negishi, Y. et al. Biopolymers 2013, 100, 402–407.
47. Negishi, Y.; Nomizu, M. Pharmacol Ther 2019, 202, 91–97.
48. Mochizuki, M. et al. FASEB J 2003, 17, 875–877.
49. Mochizuki, M. et al. Biopolymers 2007, 88, 122–130.
50. Yamada, Y. et al. Chemistry 2011, 17, 10500–10508.
51. Ikemoto, S. et al. J Biomed Mater Res A 2006, 79, 716–722.
52. Masuda, R. et al. Wound Repair Regen 2009, 17, 127–135.
53. Yamada, Y. et al. Biopolymers 2010, 94, 711–720.
54. Yamada, Y. et al. Biomaterials 2011, 32, 4327–4335.
55. Yamada, Y. et al. Biomaterials 2012, 33, 4118–4125.
56. Yamada, Y. et al. Biomaterials 2013, 34, 6539–6547.
57. Kumai, J. et al. Biopolymers 2016, 106, 512–520.
58. Hozumi, K. et al. J Biol Chem 2007, 281, 32929–32940.
59. Hozumi, K. et al. Biomaterials 2009, 30, 1596–1603.
60. Hozumi, K. et al. Biomaterials 2012, 33, 4241–4250.

のみず もとよし
東京薬科大学 薬学部 病態生化学教室
nomizu@toyaku.ac.jp
<http://www.ps.toyaku.ac.jp/~nomizu/>

令和元年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

この度は、日本ペプチド学会奨励賞という名誉ある賞を頂戴し、大変光栄に存じます。関係の諸先生方に心より御礼申し上げます。本稿では、受賞研究である「分子内反応を応用したペプチドツール開発」について概説させていただきます。



吉矢 拓

1. はじめに

私は、京都薬科大学3年生の秋に木曾良明先生（現 長浜バイオ大学）の研究室に配属され、はじめてペプチド科学の世界に入りました。木曾先生のご指導のもと学位を取得し、続いて1年間日本学術振興会特別研究員（PD）としてペプチド研究に従事しました。当時、木曾研究室では、O-アシルイソペプチド法あるいはS-アシルイソペプチド法と呼ばれる研究が行われておりました。これは、ペプチド鎖中の僅か1ヵ所のSer/Thr/Cys残基にて主鎖のアミド結合を側鎖のエステル結合あるいはチオエステル結合に異性化させたイソペプチドが、基としたペプチド（ネイティブペプチド）に固有の物理化学的性質とは異なる性質を示すという研究です¹⁻³。私もその一連の研究の一部に携わることができました。その時のテーマの一つが、アルツハイマー病に関連し、高い凝集性を持つアミロイドβペプチド1-42（Aβ42）関連研究でした。実際、Aβ42の26位のSerにてイソペプチド構造に異性化させたisoAβ42はAβ42固有の凝集性を消失していることが多くの実験で確認されています⁴⁻⁶。そして、そのようなイソペプチドの最大の特長は、トリフルオロ酢酸（TFA）塩として粉末、あるいは、酸性水溶液では安定なイソペプチドが、中性水溶液にて、自発的に定量的な分子内アシル転位反応によって瞬時にネイティブペプチドに変換されるという点にあります（図1）。すなわち、isoAβ42を用いて物理化学的あるいは生物学的実験をすれば、Aβ42固有の高い凝集性に悩まされることなく、再現性良く実験出来る

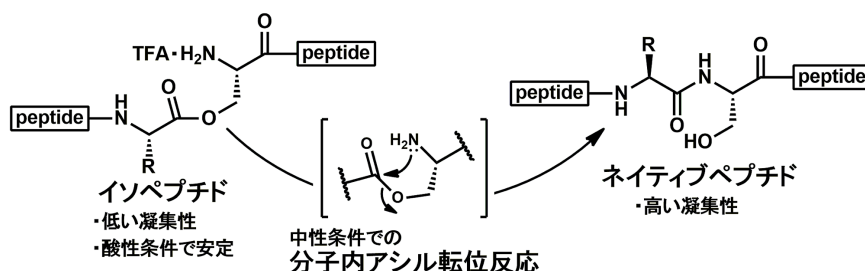


図1 isoAβ42における分子内アシル転位反応

ことを示唆しています。この研究を通して、私はシンプルな化学反応が分子全体の性質に大きな影響を与えるという事実に大変興味を持ちました。2011年にペプチド研究所に入社してからも、ペプチドツールの開発を指向し、引き続きそのようなペプチド科学研究に取り組んでまいりました。本稿ではその成果の一部をご紹介させていただきます。

2. SEAoxy ペプチドの開発

蛋白合成に有用なネイティブケミカルライゲーション (NCL) を実施するにあたり必須となるペプチドチオエステルは、Boc SPPS では容易に調製出来るものの Fmoc SPPS では直接合成出来ません。ピペリジン処理中にチオエステルが分解されたり、チオエステル結合しているアミノ酸残基のエピメリ化が生じたりするためです。そのため、種々の代替手法が開発されてきましたが、それぞれに一長一短があり、目的蛋白に合わせた柔軟な合成経路設計のための多くの合成オプションが依然として求められています。そこで我々は、徳島大学 大高章教授らが開発した SEALide ペプチド⁷の構造を基に、分子内 N-to-S アシル転位反応を利用する SEAoxy ペプチドを開発しました (図 2)。すなわち、C 末端部位に通常のアミド結合ではなく、チオール含有ヒドロキシアミン誘導体とのアミド結合を持つ SEAoxy ペプチドは、ヒドロキシアミンの特異的な性質によって、容易に分子内 N-to-S アシル転位反応を引き起こしチオエステルを産生します。Fmoc SPPS にて容易に調製可能な SEAoxy ペプチドは、単純な分子内転位反応を用いてペプチドの NCL に対する活性をコントロールしているものであると言えます。今後、Fmoc SPPS と相

性の良い SEAoxy ペプチドはチオエステル等価体の一つとして広く利用されていくと期待しています⁸。

3. 蛍光プローブ LISA-101 の開発

また、我々は分子内アシル転位反応に類似する反応を新規蛍光プローブ開発にも応用しました。 γ -グルタミルアミノ酸をピログルタミン酸とアミノ酸とに分解する γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) は、各種がん組織で高発現であり、また、ノックダウンによりがん細胞の増殖が阻害されることが知られていました。しかしながら、その基質特異性により既存の蛍光基質はもちろん、既存の蛍光発現理論も適応できず、基礎研究の妨げとなっていました。そこで我々は、 γ -グルタミルアミノ酸型の新規蛍光基質 LISA-101 を開発しました (図 3)。GGCT により LISA-101 から中間体アミノ酸が切りだされ、引き続き分子内 O-to-N アシル転位様環化反応によりインタクトなレソルフィンが切り出され、蛍光を発するというデザインです。実際、無蛍光性の LISA-101 は酵素反応後に蛍光を発し、蛍光光度計にて GGCT 活性を簡便に定量することが可能となりました⁹。つまり、このケースでは単純な分子内転位反応により、分子の蛍光を制御したということになります。そして、LISA-101 を用いて種々のがん細胞の GGCT 活性を測定し、GGCT 活性とがん細胞悪性度に関係がある可能性を見いだしました。さらに、我々は LISA-101 を用いて GGCT の阻害剤探索を行い¹⁰、得られた阻害剤をアセトキシメチルエステル化したプロドラッグ “pro-GA” は *in vivo* でも良好な抗腫瘍活性を示しました¹¹。今後も LISA-101

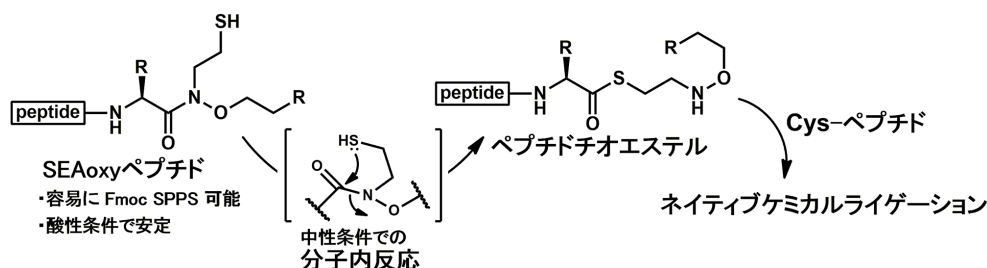


図 2 SEAoxy ペプチドを利用した NCL 反応

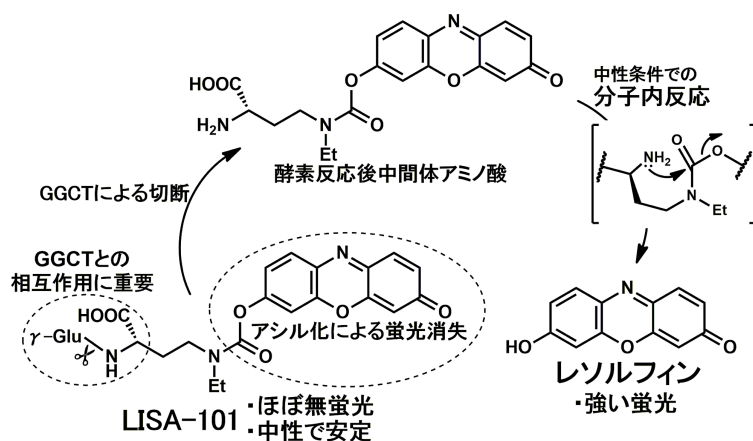


図 3 GGCT による LISA-101 からレソルフィンの放出

は GGCT に関連するがん研究を促進するものであると期待しています。

4. 発色プローブ HAP-01 の開発

少し毛色の異なる研究テーマとなりますが、我々は同様のメカニズムを用いて、麴菌由来酸性プロテアーゼ活性の測定試薬の開発にも成功しました。麴菌を用いた発酵は、種々の発酵食品の製造に欠かせないステップで、発酵過程で麴菌が分泌する種々の酵素による蛋白質や多糖類の消化が最終的な食品の香りや味を左右します。酸性プロテアーゼ (AP) は、麴菌から分泌されるエンドプロテアーゼであり、蛋白をペプチド・アミノ酸に変換します。AP は特に日本酒醸造において重要であり、醸造の管理のために、AP 活性を数値化することは有意義ですが、その発色基質がこれまで存在しませんでした。そこで、我々は LISA-101 に用いたものと同様の分子内アシル転位様環化反応 (図 4) にて *p*-ニトロフェノール (pNP) を放出し発色する基質 HAP-01 を開発しました¹²。なお、本ケースでは実際に使用するであろう酒蔵などで分析機器として蛍光計ではなく吸光度計が頻用されているという事情から、蛍光基質ではなく発色基質で設計しました。いずれにせよ、本ケースでは単純な転位様反応により色をコントロールすることに成功しました。今後、HAP-01 を用いた種々の麴の AP 活性解析が期待されます。

5. 終わりに

以上、我々がこれまで開発してきた分子内反応を応用したペプチドツールの一部をご紹介させていただきました。本稿に登場したペプチドのいくつかは研究用試薬として市販されています。今後もシンプルなペプチド化学を駆使し、単純な化学反応を用いて生物学的な現象の解明に寄与しうような社会に広く貢献できるペプチドツールの開発に取り組んで参りたいと考えております。最後になりましたが、今回紹介させて頂いた研究は多くの共同研究者の皆様方のお陰で達成されたものです。ここに深く感謝いたします。また、学生時代から長らくご指導頂き、本奨励賞にもご推薦頂いた木曾良明先生に心より感謝申し上げます。まだまだ未熟な身ではございますが、これからペプチド学会の発展に貢献できるよう、精進していく所存ですので、今後ともどうぞ宜しく

お願いいたします。

参考文献

1. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. Chem Commun 2004, 124–125.
2. Sohma, Y.; Yoshiya, T.; Taniguchi, A.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y. Biopolymers (Pept Sci) 2007, 88, 253–262.
3. Yoshiya, T.; Ito, N.; Kimura, T.; Kiso, Y. J Pept Sci 2008, 14, 1203–1208.
4. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. Tetrahedron Lett 2004, 45, 5965–5968.
5. Taniguchi, A.; Sohma, Y.; Hirayama, Y.; Mukai, H.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Matsuzaki, K.; Kiso, Y. ChemBioChem 2009, 10, 710–715.
6. Yoshiya, T.; Maruno, T.; Uemura, T.; Kubo, S.; Kiso, Y.; Sohma, Y.; Yoshizawa-Kumagaye, K.; Kobayashi, Y.; Nishiuchi, Y. Bioorg Med Chem Lett 2014, 24, 3861–3864.
7. Tsuda, S.; Shigenaga, A.; Bando, K.; Otaka, A. Org Lett 2009, 11, 823–826.
8. Tsuda, S.; Mochizuki, M.; Sakamoto, K.; Denda, M.; Nishio, H.; Otaka, A.; Yoshiya, T. Org Lett 2016, 18, 5940–5943.
9. Yoshiya, T.; Ii, H.; Tsuda, S.; Kageyama, S.; Yoshiki, T.; Nishiuchi, Y. Org Biomol Chem 2015, 13, 3182–3185.
10. Yoshiya, T.; Ii, H.; Tsuda, S.; Mochizuki, M.; Kageyama, S.; Yoshiki, T. J Pept Sci 2017, 23, 618–623.
11. Ii, H.; Yoshiya, T.; Nakata, S.; Taniguchi, K.; Hidaka, K.; Tsuda, S.; Mochizuki, M.; Nishiuchi, Y.; Tsuda, Y.; Ito, K.; Kageyama, S.; Yoshiki, T. ChemMedChem 2018, 13, 155–163.
12. Yoshiya, T.; Yamashita, N.; Tsuda, S.; Oohigashi, K.; Masuda, S.; Kubodera, T.; Akashi, T. Org Biomol Chem 2019, 17, 776–779.

よしや たく
株式会社ペプチド研究所
t.yoshiya@peptide.co.jp
https://www.peptide.co.jp/

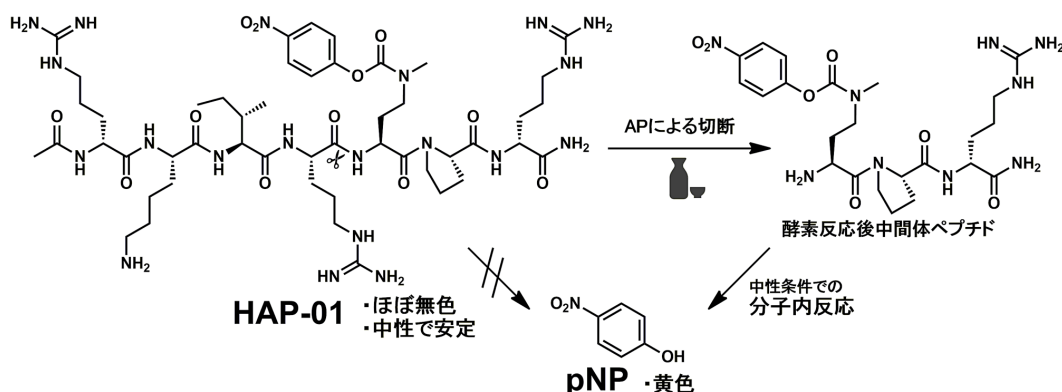


図4 APによるHAP-01からpNPの放出

令和元年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

この度は、日本ペプチド学会奨励賞という歴史・荣誉ある賞を頂き、誠に光栄に存じます。学会長の三原久和先生をはじめ、副会長の二木史朗先生、理事、監事、評議員、また選考委員の諸先生方に本紙を借りて心より感謝申し上げます。本稿では、受賞研究である「エピジェネティクス研究を志向した新規ペプチド連結法の開発」について概説させていただきます。



林 剛介

1. はじめに

私の研究人生は、京都大学工学部の4年生時に核酸化学を専門とする齋藤烈先生の研究室に配属されてスタートしました。修士課程が終わるまでは、中谷和彦先生（当時助教授）の指導のもと、鏡像異性体核酸の合成と応用研究に従事しておりました^{1,2}。中谷先生が大阪大学の教授に昇進されたタイミングで私も大阪大学理学研究科へ編入し、ここでは新たに「光応答性ペプチドに結合するRNA アプタマーの取得」という研究テーマをスタートさせました^{3,4}。これが私にとってペプチド研究との出会いです。学

位取得後、タンパク質の生合成系である翻訳系のエンジニアリング研究に興味を持った私は博士研究員として東京大学の菅裕明先生の研究室で「直交性を持つ人工リボソーム-tRNA ペアの開発」を行いました⁵。その後ボストン大学のJames J. Collins先生（現在はMIT 所属）の研究室でペプチド抗生物質の開発研究に1年ほど従事した後、2012年より東京大学の岡本晃充先生の研究室で助教として「タンパク質化学合成の技術開発とエピジェネティクス研究への応用」に関する研究をスタートさせました。以下にその概要を紹介いたします。

2. タンパク質化学合成を用いたヒストン H2A の翻訳後修飾研究

真核生物ゲノムの単位構造であるヌクレオソームは、コアヒストンと呼ばれるH2A, H2B, H3, H4の4種類のタンパク質とDNAから構成され、各々のヒストンにおいて様々な翻訳後修飾を受けることが知られています。多様なヒストン修飾が生命現象に関連していることが示唆されている中、その機能が解明されている修飾は多くありません。翻訳後修飾の機能を結晶構造解析やタンパク質間相互作用解析を用いて明らかにするためにも、まずは標的とする翻訳後修飾が部位特異的に導入されたヒストンを作製する方法が必要不可欠です。修飾タンパク質を

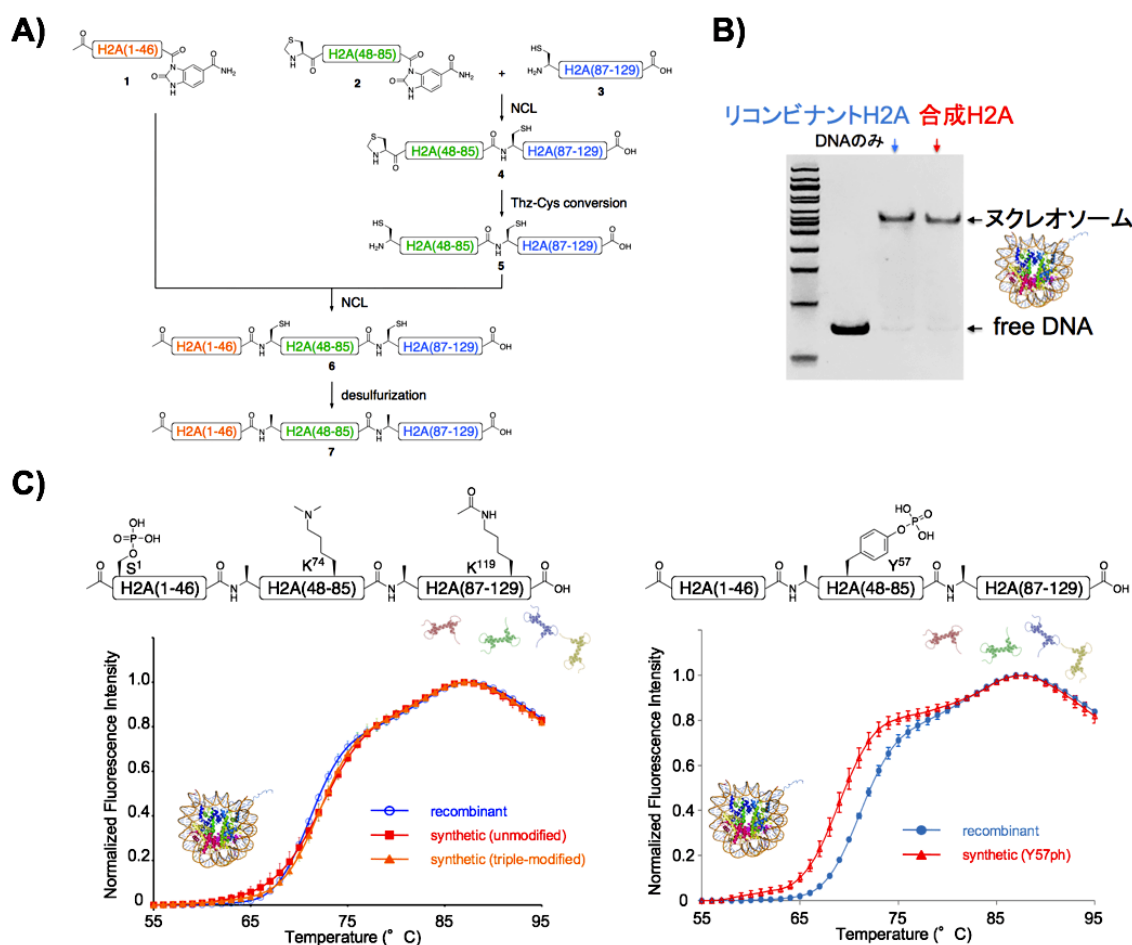


図1 化学合成 H2A を用いたヌクレオソーム再構成と安定性解析

調製する有望な技術の一つが、タンパク質化学合成法です。タンパク質化学合成法は、化学的に合成したペプチド断片を連結して全長タンパク質を得る方法です。ペプチド固相合成法は様々な化学修飾を持つ非天然アミノ酸の部位特異的導入を可能にするため、結果的にそのペプチド断片を連結させたタンパク質は多様な化学修飾を持つことになります。これまでに4種類のコアヒストンは全て化学合成ルートが開拓されており、我々のグループではH2Aの合成ルートの確立に成功しています。

具体的には、全長129アミノ酸のヒストンH2Aを3つのペプチド断片に分割し、2度のペプチド連結反応を用いて全長H2Aを合成しました(図1A)。連結反応には、N末端CysペプチドとC末端チオエステル含有ペプチドを反応させるNCL(Native Chemical Ligation)⁶を用いました。NCLではCys残基が必須になりますが、天然のH2AはCys残基を持たないため、連結反応後ラジカル反応である「脱硫反応」⁷を用いてCys残基をAla残基に変換することでネイティブな全長H2Aを得ました⁸。得られたH2Aを用いてH2A-H2Bダイマーやヌクレオソームの試験管内再構成を行い、リコンビナントH2Aと機能が同等であることを確認しました(図1B)。次に確立したルートを用いて翻訳後修飾入りH2Aを合成し、その物理化学的性質を評価することにしました。3種類の異なる翻訳後修飾(リン酸化Ser, ジメチル化Lys, アセチル化Lys)が導入されたH2Aおよび57番目のTyrがリン酸化されたH2Aを作製しました。これらの修飾入りH2Aを用いてヌクレオソームを再構成し、その熱安定性を評価したところ、3種類の修飾を持つH2Aは無修飾H2Aと同等の挙動を示したのに対し、リン酸化Tyrを持つH2Aは熱安定性が大きく低下することが明らかになりました⁹(図1C)。このリン酸化Tyrは、H2A-H2Bダイマーの相互作用を弱めることで結果的にヌクレオソームの安定性を低下させることが結晶構造から示唆されました。H2A-H2Bダイマーの安定性を変化させる翻訳

後修飾についてはこれが初めての発見となりました。

3. ペプチド連結反応における新手法の開発

タンパク質を化学的に合成することで、翻訳後修飾を有するタンパク質だけでなく、蛍光分子などの機能性分子が導入されたタンパク質や鏡像異性体タンパク質などの人工タンパク質を作製することができます。しかし、タンパク質化学合成の方法論は未だに発展途上で、問題がいくつか存在します。例えば、1)ライゲーションするペプチド断片の数が多くなるにつれて収率が低下し時間もかかること、2)疎水性の高いペプチド断片のライゲーションが困難であること、などがあります。これらの問題を解決するために我々のグループではペプチド連結反応における新たな方法論を開発してきました。

その一つが複数のペプチド断片を精製することなくワンポットでライゲーションする技術の開発です。効率の良いワンポットペプチドライゲーション法を開発するために必要な条件として、A)ライゲーション後にペプチドの保護基を定量的かつ副反応なくはずせること、B)ライゲーション時に保護基がはずれないこと、が挙げられます。我々は保護基と脱保護剤のペアとして、アミノ基の保護基として汎用されるアリルオキシカルボニル(Alloc)基と水溶性パラジウム(0)錯体であるPd/TPPTS(トリフェニルホスフィントリスルホナート)を採用しました。我々は、NCLでチオール触媒として用いられるMPAA(4-メルカプトフェニル酢酸)がAlloc基の脱保護を加速させる性質を持つこと、またPd/TPPTS錯体を同時に不活性化することを明らかにしました。この発見をワンポットペプチド連結反応に応用し、142アミノ酸からなるヒストンH2AXタンパク質を5つのペプチド断片から単離収率47%で合成することに成功しました¹⁰(図2)。この結果は、5つのペプチド断片をワンポットで連結してタンパク質を合成した最初の例であり、合成にかかる時間や合成収率の観点からも現時点で最も効率の良いタンパク質化学

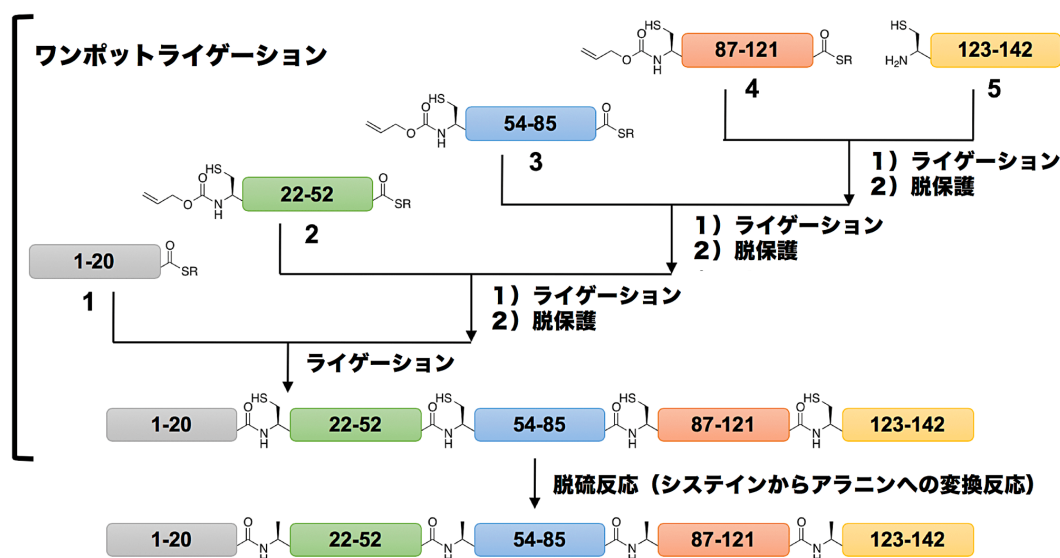


図2 ワンポットライゲーションによるH2AXの合成

合成法の一つだと言えます。また、最近では異なるパラジウム錯体を用いることで、Cys 残基を有するタンパク質のワンポットライゲーション法の開発も行っています¹¹。

このワンポットライゲーション法は、C 末端側のペプチドから N 末端側へ連結していく「C-to-N」方向のライゲーションです。しかし、タンパク質によってはペプチド断片の溶解度などの問題から、「N-to-C」の方向で連結しないと合成できないものがあります。我々は、「N-to-C」方向のワンポットライゲーションを可能にするために、新たなチオエステル前駆体の開発に着手しました。その結果、CPI（システイニルプロリルイミド）構造を有するチオエステル前駆体の開発に成功しました。中でもイミド構造としてオキサゾリジノン構造を持つ CPMeOxa 構造の活性は高く¹²（図 3）、これまでに開発されてきた N-S アシルシフト型のチオエステル前駆体の中でも最も反応性の高い部類に入ります。CPMeOxa を用いて「N-to-C」方向のワンポットライゲーションにチャレンジしたところ、連続的に外せるシステインの保護

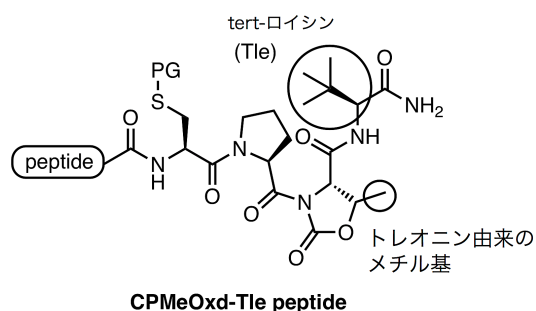


図 3 CPI ペプチドの化学構造

基がなかったために成功にはいたりませんでした。しかし、最終的にこのチオエステル前駆体を用いてヒストン H2AZ の全合成を達成し、その実用性を証明することができました。

複数のペプチド断片を連結する最も理想的な方法は、反応容器中のペプチド断片の連結したい末端同士を選択的かつ一度に連結する「同時連結反応」だと考えられます。私は、DNA の二本鎖形成を利用してペプチドの反応点を近接させることで、ペプチド末端選択的かつ同時ライゲーションが可能になるのではないかと考えました（図 4）。この仮説を実証するために、ペプチド-DNA コンジュゲートを合成し、DNA 足場の有無が反応速度に与える影響を比較したところ、DNA 足場によって反応速度が 1000 倍以上向上することがわかりました。また、選択性にはまだ乏しいものの、3 種類のペプチドを同時に連結することができました¹³。またこの手法は、DNA が「親水性タグ」としても働くため、疎水性ペプチドの水溶性を上昇させる効果もあります。今後この方法論を発展させることで、疎水性のタンパク質を効率よく合成できる技術を開発できるよう努力する所存です。

4. おわりに

以上、我々が近年取り組んできたタンパク質化学合成に関する技術開発とエビジェネティクス分野への応用研究について紹介しました。本稿では割愛しましたが、他にも「タンパク質化学合成においてアルキンが脱硫反応に耐えない」という問題に対してシリル保護アルキンを導入することで化学合成タンパク質にアルキンの導入を可能にし、また安定性の異なるシリル保護基を用いることで、2 種類の異なる分子で合成タンパク質をラベル化できることを示

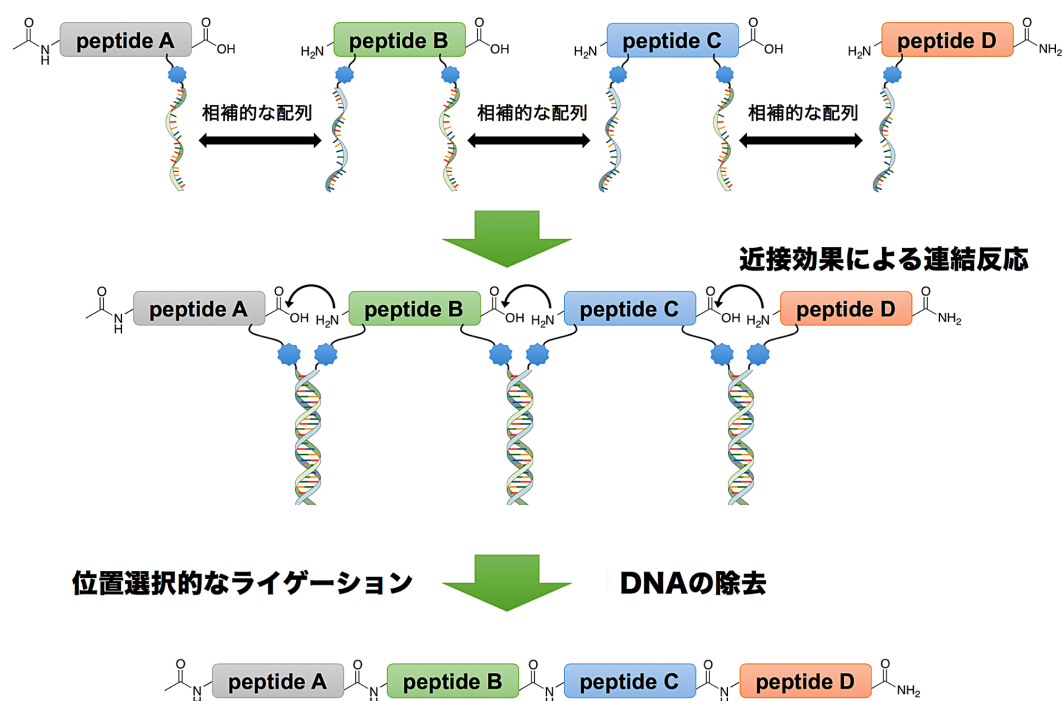


図 4 DNA 足場を用いた複数ペプチドの同時連結反応

した研究なども行っております¹⁴。

最後になりましたが、今回紹介させていただいた研究は、私が東京大学工学系研究科の助教時代に行われたものであり、多大なご支援と自由闊達な研究環境を与えてくださった岡本晃充先生に心より感謝致します。また、これらの研究の推進に多大な時間と労力を割いてくれた学生諸氏に深く感謝致します。特に上記の研究は末岡拓馬博士、梁瀬将史博士、加茂直己君（現 D2）の多大なる貢献のおかげで形になったものです。最後に、現在私が所属している名古屋大学工学研究科の研究科の PI である村上裕先生には、引き続きタンパク質化学合成研究の推進に必要な研究環境を与えて頂き、深く御礼申し上げます。まだまだ未熟者ではございますが、本学会の発展に貢献できるよう、今後より良い研究を積み重ねていくために精進する所存です。今後ともご指導ご鞭撻のほど何卒宜しくお願い申し上げます。

参考文献

1. Hayashi, G.; Hagihara, M.; Kobori, A.; Nakatani, K. *Chembiochem* 2007, 8, 169–171.
2. Hayashi, G.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *J Biotechnol* 2008, 135, 157–160.
3. Hayashi, G.; Hagihara, M.; Dohno, C.; Nakatani, K. *J Am Chem Soc* 2007, 129, 8678–8679.
4. Hayashi, G.; Hagihara, M.; Nakatani, K. *Chem Eur J* 2009, 15, 424–432.
5. Terasaka, N.; Hayashi, G.; Katoh, T.; Suga, H. *Nat Chem Biol* 2014, 10, 555–557.
6. Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. *Science* 1994, 266, 776–779.
7. Wan, Q.; Danishefsky, S. J. *Angew Chem Int Ed* 2007, 46, 9248–9252.
8. Hayashi, G.; Sueoka, T.; Okamoto, A. *Chem Commun* 2016, 52, 4999–5002.
9. Sueoka, T.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Biochemistry* 2017, 56, 4767–4772.
10. Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Angew Chem Int Ed* 2018, 57, 16533–16537.
11. Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Org Lett* 2019, 21, 8378–8382.
12. Yanase, M.; Nakatsu, K.; Cardoso, C. J.; Konda, Y.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Chem Sci* 2019, 10, 5967–5975.
13. Hayashi, G.; Yanase, M.; Nakatsuka, Y.; Okamoto, A. *Biomacromolecules* 2019, 20, 1246–1253.
14. Hayashi, G.; Kamo, N.; Okamoto, A. *Chem Commun* 2017, 53, 5918–5921.

はやし ごうすけ
名古屋大学 大学院工学研究科
生命分子工学専攻

hayashi@chembio.nagoya-u.ac.jp

<http://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/bioanal2/>

23rd Korean Peptide and Protein Society (KPPS) Symposium 参加報告

23rd Korean Peptide and Protein Society (KPPS) Symposium が 2019 年 9 月 1 日と 2 日の 2 日間、韓国^{ヤンヤン}の襄陽郡にある大明リゾート・ソルビーチのホテルにて開催されました（写真 1）。本シンポジウムには約 200 名が参加しており、私達は日本ペプチド学会 Travel Award のご支援のもと、静岡大学の鳴海先生、北海道大学の渡邊先生と参加してきました。今回は学会参加報告の機会をいただきましたので報告させていただきます。

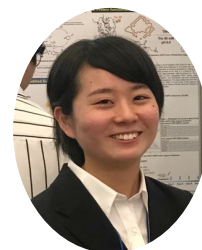
開催地である大明リゾート・ソルビーチは韓国北東部の海沿いに位置するリゾート地で、ソウルからバスで 3 時間ほどかかります。リゾート地ということもあり、会場のホテルには多くの子供連れの家族が訪れていました。

シンポジウム初日は、「Young Scientist Session」「PL1 Lecture」「ANYGEN Award Ceremony and Lecture」「Poster Session」のセッションからなり、ペプチド・タンパク質に関わる多種多様な研究が紹介されていました。私達は Poster Session にてポスター発表を行いました。いざ発表が始まると、多くの先生方や学生が来てくださり、英語でのディスカッションをさせていただき貴重な経験をさせていただくことができました。

今回、田中は “Synthesis of GM2 Activator Protein Segment through Direct Synthesis of N-terminal



田中 晶子



今井 咲



写真 1 シンポジウムの会場

Thiazolidine-Containing Peptide Thioesters from Peptide Hydrazides”という題目で発表しました。特に印象に残っているのは、University of Science and Technology の Young-Ho Lee 先生と、私が合成に取り組んでいるタンパク質の特に構造や機能に関してディスカッションさせていただき、研究のアドバイスをいただいたことです。また、Young-Ho Lee 先生は以前大阪大学蛋白質研究所に在籍されており、研究のみならず日本におられた頃のお話を拝聴することもできました。

今井は“One-Pot Synthesis of Highly Functionalized 2-Chloroaziridines and Their Application to the Synthesis of (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres Containing α,α -Disubstituted Amino Acids”という題目で発表しました。発表内容が本学会の中では特殊なもの、現地の学生さんも含めたくさんの方が興味を持って話を聞いてくださりました。日本語で質問される韓国の学生さんもいて、大変驚くとともに、高い英語力を目の当たりにし、より一層努力する必要があると感じました。今回のポスター発表およびシンポジウムを通して自身の研究の面白さというものを再認識し、研究に対しますますモチベーションが上がりました。また、今回のポスター発表でありがたいことに、BEST Poster Award をいただくことができました（写真2）。

シンポジウム2日目は「Peptide/Protein Structure」「PL2 Lecture」「Peptide/Protein Chemistry」「Chemical Biology」「Biophysics」のセッションからなり、先生方の発表がメインであり最先端の研究について勉強させていただきました。有機化学からケミカルバイオロジー、生化学など幅広い研究分野について発表されていました。日本からは、中川先生、鳴海先生、増田先生がご発表されていました。シンポジウム全体を通して、ペプチド・タンパク質の構造や機能を解明するケミカルツールに関する研究が多いと感じました。

今回の 23rd KPPS Symposium では、自分の専門分野だけでなく幅広いペプチド・タンパク質の研究分野についての講演を拝聴し、良い刺激を受けました。

また、ポスター発表では英語での発表およびディスカッションの難しさを改めて痛感しました。

最後に、このような貴重な機会を下さったシンポジウムに関係する様々な先生方にお礼申し上げます。今回参加した 23rd KPPS Symposium では静岡大学の鳴海先生、北海道大学の渡邊先生をはじめとする様々な先生方にお世話になりました。また 23rd KPPS Symposium で発表した研究成果は、静岡大学の間瀬先生、鳴海先生、佐藤先生をはじめとする諸先生方のご指導により達成することができました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

本学会への参加において、日本ペプチド学会より Travel Award としてご支援いただきました。学会役員ならびに選考委員の先生方、そしてこのような執筆の機会を与えてくださったペプチドニュースレター編集委員の先生方に心よりお礼申しあげます。

たなか しょうこ
静岡大学 大学院総合科学技術研究科
工学専攻 間瀬・佐藤研究室
tanaka.shoko.14@shizuoka.ac.jp
<https://www.shizuoka.ac.jp/sato-kohei/>

imai さき
静岡大学 大学院総合科学技術研究科
工学専攻 鳴海研究室
imai.saki.15@shizuoka.ac.jp
<https://www.shizuoka.ac.jp/tenarumi/>



写真2 今回の世話になった先生方とともに（左から、Jeong Kyu Bang 先生、田中、増田先生、Yangmee Kim 先生、今井、鳴海先生、渡邊先生）

7th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Application Symposium と、13th Australian Peptide Conference の参加報告

私は 2019 年 9 月 5 日から 13 日にわたり、オーストラリアクイーンズランド州海岸沿いのリゾート地で行われた掲題の 2 つの学会に参加し、この度執筆の機会をいただきました。



松田 研一

7th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Application Symposium (SPPS) は、13th Australian Peptide Conference (APC) のサテライトミーティングであり、ペプチド関連分野の中でも化学合成によりフォーカスした内容の会です。本学会は 7 回目ですが、過去 6 回はオーストラリアにて 5 回（ポートダグラス 2007 年、ゴールドコースト 2009 年、デイドリーム島 2011 年、サウスストランドブローック島 2015 年、フレーザー島 2017 年）、日本にて 1 回（神戸 2013 年）開催されています。今回はシドニー大学の Richard Payne 教授らのお世話により開催されました。開催場所はリゾートが恒例のようですが、今回はケアンズ国際空港から車を北に 30 分ほど走らせたところにある Palm Cove で、9 月 5 日から 7 日にわたり開かれました。幸いケアンズには東京（成田）から直行便があったためアクセスしやす

く、また時差も日本より 1 時間早いだけなので、英語圏の国際学会には身体的な苦労なく参加できました。現地は冬でしたが、天候にも恵まれ、ちょうど夏の札幌（筆者は北大から参加）に似た過ごしやすい気候の中、各国から集まったペプチド研究者らによる熱いディスカッションが交わされました。話題としてはペプチド固相合成法、環化法から、NCL を用いた複雑修飾タンパクの精密合成まで多岐にわたり、中でも個人的にはファージ上での環状ペプチド合成とスクリーニング（Prof. Ratmir Derda, University of Alberta）や、ペプチドベースの無機リン酸検出試薬開発（Prof. Kate Jolliffe, University of Sydney）などを特に興味深く拝聴しました。また地元の若手研究



写真 1 Four Mile Beach, Port Douglas



写真 2 APC, Port Douglas

者を中心に Early Career Researcher というセッションも用意されており（筆者はここで、非リボソームペプチド合成における新しいペプチド環化酵素について発表しました）、各国の若手と交流でき、非常に良い刺激をもらいました。会の規模としては 80 名程度のこぢんまりしたもので、発表者の顔も覚えられますのでその後気軽にディスカッションすることができます。また SPPS は本大会前に旧交を温める意味合いも強いようで、特に今回は Prof. Paul Alewood (University of Queensland) の退官記念講演もあり、集まった多くの弟子や孫弟子にあたる若手研究者を見て、オーストラリアにおけるペプチド化学の懐の深さを感じました。

APC は SPPS に引き続き、9 月 8 日から 13 日の期間で Port Douglas にて開催されました（写真 1, 2）。Port Douglas は Palm Cove よりも更に北に車で 40 分ほど行ったところにある港町です。SPPS から引き続き参加される方が多い（その場合は別の内容での発表を求められる）一方で、SPPS には参加していない発表者が半数以上で、話題は非常に多岐にわたりました。非リボソームペプチド合成酵素やイオンチャネルのタンパク構造解析から、変わったところではペプチドを使ったニューロンの新しい培養法など、ペプチド関連分野の広がりを感じました。特に、オープニングを飾った Prof. Nieng Yan (Princeton University) のナトリウムチャネル (Nav1.7) の Cryo-EM による構造解析や、クロージングを飾った Prof. Ben Davis (University of Oxford) のデヒドロアラニンを中心とするタンパクの多様な化学修飾手法、Alewood 教授の退官講演（2 回目）はとて印象深いものでした。筆者は SPPS での発表に関連して、ペプチド環化酵素の基質選択性に関する研究成果を発表しました。プログラムは適度にゆとりをもって構成されており、地元の研究者と近くの動物園を訪れる時間もありました。動物園自体の感想は特にございませんが、園内で足にチクとした痛みを覚え、見てみると腹が緑色の蟻が一匹首に噛みついていました。係員の話ではよくいる蟻で全く問題ない（実際全く問題なかった）とのことだったので特に気にも留めませんでした。翌日のセッションでちょうどその蟻の毒についての発表（Dr. Sam Robinson, University of Queensland）があり、筆者はタンパク毒を注入されたことを知りました。

今回参加した 2 つの学会は、ちょうどよい規模感の会であったと感じております。複数会場で同時進行的に発表が行われるのではなく、全員が同じ発表を聞くため、お互いどのような研究をしているのか大体把握できますし、サテライトも含めれば 2 週間弱一緒に居ることになるので、どの参加者とも交流を作る機会は十分にあると思います。また、オーストラリアに限らず世界各国から研究者が参加するため、留学先を探すのにもうってつけだと思います。ペプチド合成に携わる会員の皆様も参加されて絶対に損の無い学会だと思います。次回大会は 2021 年 8/26~9/3 の期間で、ブリスベンで行われるそうです。最後になりましたが、この場をお借りしまして、筆者を SPPS2019 にご招待くださった Max Cryle 先

生 (Monash University), SPPS, APC のオーガナイザーの先生方にお礼申し上げます。また、このような執筆の機会を与えてくださった、日本ペプチド学会の役員の先生方・ペプチドニュースレター編集委員の先生方に深謝致します。

まつだ けんいち
北海道大学 大学院薬学研究院
天然物化学研究室
kematsuda@pharm.hokudai.ac.jp
<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/>

若手口頭発表最優秀賞を受賞して

2019 年 10 月 23 日から 25 日にかけて東京医科歯科大学にて開催された第 56 回ペプチド討論会において若手口頭発表という貴重な機会を頂き、更に若手口頭発表最優秀賞という非常に名誉ある賞を受賞させていただきました。今回の受賞対象となりました「Chemical synthesis of linker histone H1.2 using one-pot multiple peptide ligation with Ru catalyst」について僭越ながらご紹介させていただきます。



加茂 直己

我々のグループはタンパク質の翻訳後修飾の機能解析を指向してタンパク質化学合成法を用いた修飾入りタンパク質の創出に注目しております。この手法を用いることで、遺伝子工学的手法に比べ部位特異的に多様な修飾を導入することができ、さらに D 体のアミノ酸などを用いることで人工タンパク質を作り上げることができます。化学的にタンパク質を合成するには、初めに標的タンパク質を分割した断片を固相合成法によって合成し、次にペプチド断片を連結することで全長のタンパク質を得ます。この連結手法としては C 末端チオエステルと N 末端システインの反応性を利用したネイティブケミカルライゲーション (NCL) 法が広く用いられています¹。しかし、長鎖タンパク質の合成を行う際、連結反応の回数の増大に伴う度重なる精製により全収率が低下し合成完了に多大な時間がかかるという大きな問題点がありました。

この問題を解決するため、以前には Pd 錯体を用いた効率的にペプチド断片を one-pot で連結する手法の開発をしました^{2,3}。N 末端システインの保護基として allyloxycarbonyl (alloc) 基を用い、連結反応におけるチオール添加剤として用いられる 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA) という分子に alloc 基の脱保護中間体である π -allyl Pd 錯体に対する補足剤、脱保護後の Pd 錯体に対する不活性化剤という新たに 2 つの機能を付与し、1. NCL によるペプチド連結反応、2. alloc 基の脱保護、3. Pd 錯体の不活性化という 3 つのステップを精製を介さずに繰

り返すことで、5つに分割したヒストン H2AX (142 アミノ酸) のペプチド断片を one-pot で連結し、収率 59% で全長の目的物を得ることに成功しました。しかし、過剰量のチオール分子が存在する NCL 反応条件下での脱保護では 2 当量という触媒量以上の Pd 錯体を要し、更に厳密な不活性化ガス存在下で反応を行う必要がありました。より簡便なタンパク質化学合成法の手法構築のため、私は 2014 年に Eric Meggers 先生のグループによって報告された Ru 錯体に注目しました^{4,5}。グルタチオンを含む水中条件下における小分子の alloc 基脱保護において Ru 錯体が空気ガス存在下でも触媒回転することが報告されています。そこで、この Ru 錯体がペプチドやタンパク質といった高分子上の alloc 基の脱保護に適用可能かどうか検証することと致しました。

先行文献にて報告されていた $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (**Ru-1**), $[\text{CpRu}(\text{QA})\text{allyl}]\text{PF}_6$ (QA = 2-quinolinecarboxylate, **Ru-2**), $[\text{CpRu}(\text{QA-NMe}_2)\text{allyl}]\text{PF}_6$ (NMe_2 = dimethylamino, **Ru-3**) の合成を行い、以前私が alloc 基の脱保護に用いた Pd 錯体との比較を行いました (図 1)。空气中で alloc 保護を有するペプチド (2 mM) と MPAA (100 mM) 存在下でそれぞれ 3 mol% の金属錯体を添加し、HPLC によって反応追跡を行ったところ、Pd 錯体は反応性を示さなかったのに対し、用いた 3 種類の Ru 錯体は触媒活性を示しました。特に **Ru-3** は最も高い反応性を示しており、触媒回転数 14 という結果となりました。金属錯体の活性に悪影響を及ぼすとされるチオール分子が 300 当量以上存在するにもかかわらず、触媒活性を示したのは驚くべき結果です。さらに、alloc 基脱保護の最適化を行い、15 mol% の **Ru-3** を添加することで定量的に alloc 基が外れることが分かりました。更に、MPAA といった外部チオール非存在下で **Ru-3**

を添加した結果、allyl 基がペプチド中の求核性官能基に転移していることが判明しました。したがって MPAA といったチオール添加剤が脱保護中間体である π -allyl Ru 錯体に対する補足剤として機能していると言えます。以上より今回用いた **Ru-3** が one-pot ペプチド連結反応に応用できると考えました。

Ru 触媒を用いた本合成手法の応用としてリンカーヒストン H1.2 を化学合成することに致しました。このタンパク質はヌクレオソームと相互作用することでクロマトソーム構造を形成します。更にこの構造体が連なることでヘテロクロマチンを形成し遺伝子転写の制御に寄与すると知られています。ヒストン H1 上には様々な翻訳後修飾が施されると報告されていますが、機能が未解明な修飾が多く存在します。しかし、H1 の全長は 200 アミノ酸以上と長く、翻訳後修飾の機能解析を指向した化学合成法の確立は困難でした。そこで Ru 触媒を用いたペプチド断片 one-pot 連結法により修飾入りヒストン H1 の効率的な合成手法の確立を目指すことに致しました。H1 のバリエーションの 1 種である H1.2 上の翻訳後修飾としてクロマトソーム構造の不安定化に寄与していると報告されている 54 番目アルギニンのシトルリン化 (R54Cit) と 173 番目セリンのリン酸化 (S173ph) を選択しました。全長の H1.2 のタンパク質配列を 5 つのペプチド断片へと分割し、R54Cit や S173ph を含む断片をそれぞれ Fmoc 固相合成法によって合成しました。NCL 反応によるペプチドの連結反応、Ru 触媒による alloc 基の脱保護、MPAA による Ru 触媒の不活性化の 3 つのステップを繰り返すことで 5 つに分割したペプチド断片を one-pot で連結し 3 種類の全長 H1.2 を合成しました。以前の Pd 錯体を用いた手法では出発原料に対して計 6.6 当量の金属錯体を用いたのに対し、Ru 触媒の系ではわずか 0.6 当

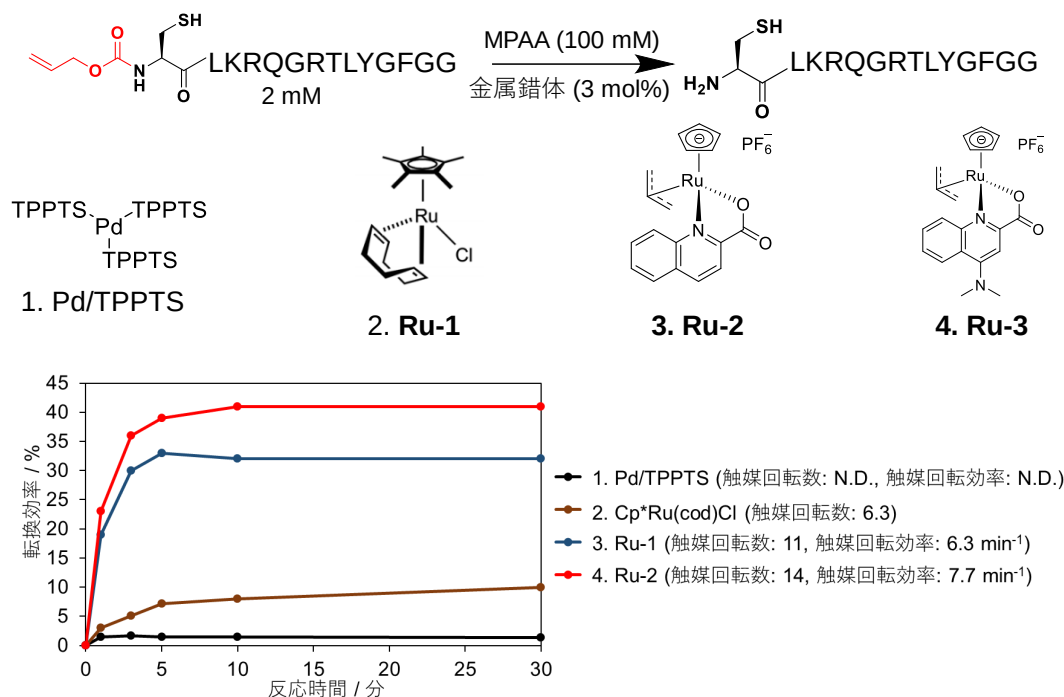


図 1 alloc 基の脱保護における金属錯体の活性比較

量まで減らすことに成功し、本系がより効率的であると言えます。最後に脱硫反応を行うことで変異として導入されていたシステインを元のアラニンへと変換し、続いて合成した修飾入り H1.2 を用いてクロマトソームの再構成を行いました (図 2)。合成した 3 種類の H1.2 をヒストンシャペロンである Nap1 存在下でヌクレオソームと混ぜ、クロマトソームの形成効率をゲルバンドシフトアッセイにより解析しました。その結果、未修飾 H1.2 に比べて R54Cit や S173ph といった修飾入りの H1.2 のヌクレオソームに対する結合力が低下していることが分かり、特に R54Cit 修飾のクロマトソーム不安定化に対する寄与が大きいということが分かりました。現在、これら修飾入り H1.2 を含むクロマトソームの構造を共同研究先である東京大学胡桃坂研究室にてクライオ電子顕微鏡による解析を進めております。

本研究は東京大学岡本晃充先生と林剛介先生 (現在名古屋大学) のご指導の下進めてまいりました。お二方にはこの場を借りて御礼申し上げます。クロマトソームの再構成実験については東京大学定量生命科学研究所の胡桃坂研究室にて行いました。実験指導していただいた胡桃坂仁志先生と鯨井智也先生に大変感謝申し上げます。また、本学会の直前までペンシルバニア大学化学学科にて 3 か月ほど留学しており、その経験が本受賞につながったと考えております。私を快く受け入れてくださったペンシルバニア大学の E. James Petersson 先生と留学の契機を作ってくださった静岡大学の鳴海哲夫先生にこの場を借りて御礼申し上げます。最後に本ペプチド討論会をお世話していただいた東京医科歯科大学の玉村啓和先生ならびに審査員の先生方、支援していただいた

皆様方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. *Science* 1994, 266, 776–779.
2. Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Angew Chem Int Ed* 2018, 57, 16533–16537.
3. Kamo, N.; Hayashi, G.; Okamoto, A. *Chem Commun* 2018, 54, 4337–4340.
4. Völker, T.; Dempwolff, F.; Graumann, P. L.; Meggers, E. *Angew Chem Int Ed* 2014, 53, 10536–10540.
5. Saburi, H.; Tanaka, S.; Kitamura, M. *Angew Chem Int Ed* 2005, 44, 1730–1732.

(かも なおき)
 東京大学 工学系研究科
 化学生命工学専攻
 n-kamo@bioorg.rcast.u-tokyo.ac.jp

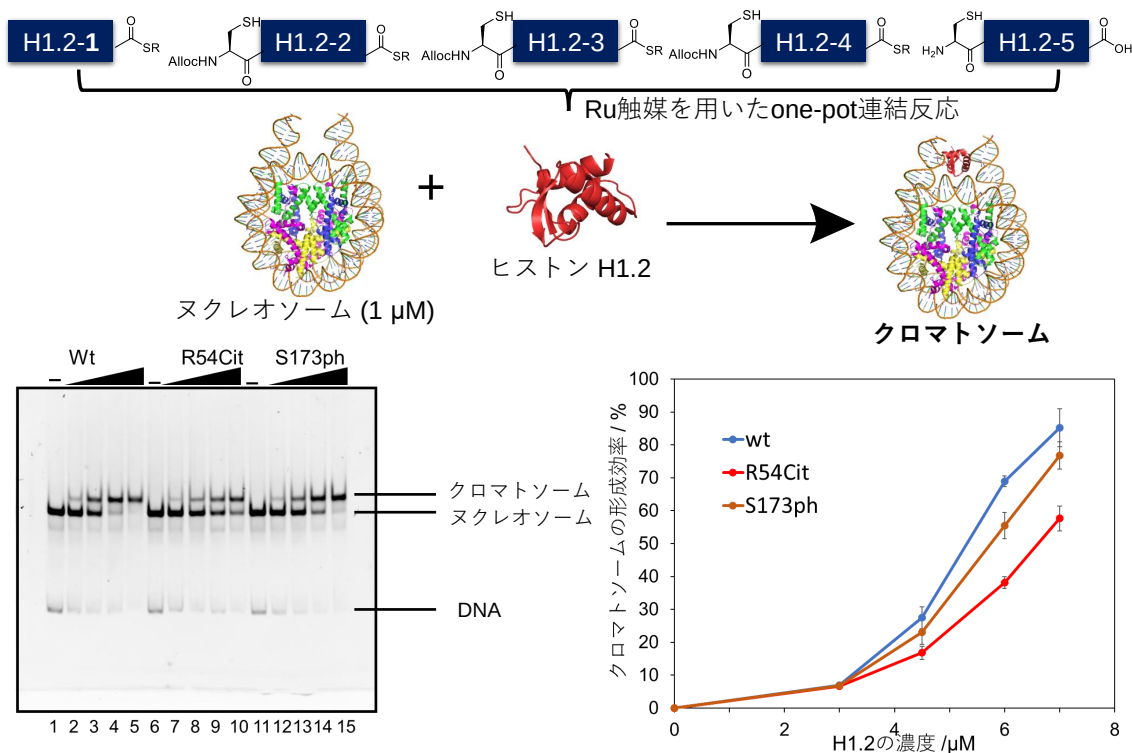


図 2 Ru 触媒を用いたヒストン H1.2 の全合成とクロマトソーム再構成

はじめに

この度は、2019年10月23日～25日に東京医科歯科大学にて行われた第56回ペプチド討論会に参加し、“Creation of enveloped Artificial viral capsid by Electrostatic Interaction between β -Annulus Peptide and lipid”という題目にてポスター発表を行い、Chemical Science 賞という名誉ある賞をいただき大変光栄に感じております。学会長の三原久和先生をはじめ、玉村啓和先生を代表とする本討論会の実行委員会の方々、評価をくださった選考委員の諸先生方に本紙面をお借りして心より御礼申し上げます。



古川 寛人

第56回ペプチド討論会

今回初めて、ペプチド討論会に参加させていただきました。会場である東京医科歯科大学はとてもきれいで落ち着いた雰囲気があり、3日間ストレスを感じることなく過ごすことができました。会場系の学生の方々もとても親切で、大変勉強になりました。

ポスター発表では、私の研究内容の面白さや今後の研究活動への将来性をうまく伝えることができるか不安でしたが、ポスター発表を聞きに来てくださった方々が疑問に思ったことや、今後の研究への課題について、積極的かつ的確に質問やご指摘していただいたおかげで、私自身も終始緊張することなく、自信をもって対応することができました。その結果、聞きに来てくださったすべての方々に私の研究内容の面白さを伝えることができた満足しております。ポスター発表は自分自身の研究に対する情熱や夢を語る場であると考えております。そこで語る夢が少し非現実的であっても、聴者の方々と語り合うことで、新しいアイデアが生まれ現実的な夢へ近づくことが、ポスター発表の面白いところであり、私もその感覚を楽しみに毎回ポスター発表を行っております。

さらに、今回の討論会では、以前に「若手ペプチド夏の勉強会」で知り合った他大学の同期や先輩方と再会する場でもありました。分野は少し違いますが、同じペプチドの研究を行っている同期や先輩方と語り合うことは、今後の研究活動への励みになり、

また、研究に向き合う意欲に繋がりました。今回は、そのような貴重な場を設けていただいた大変有意義な討論会でした。

研究概要

天然ウイルスには様々な形態のものが存在します。例えば、皆様よくご存じであるインフルエンザウイルスや HIV は、ウイルス RNA の周りがタンパク質の殻であるキャプシドで覆われ、さらにその周りが脂質二分子膜から構成されるエンベロープで覆われています。さらに、エンベロープ表面上には複数の種類の膜タンパク質が提示している複雑な構造をとっており、それらのウイルスはエンベロープ型ウイルスとして分類されています。当研究室は、天然ウイルスの中でも球状ウイルスの1つであるトマトブッシースタントウイルスの内部骨格の形成に関与する24残基 β -Annulus ペプチドが水中で自己集合し、直径30～50 nm 程度の人工ウイルスキャプシドを創製することに成功しております¹。さらに、ペプチドのC末端側がキャプシドの外側、N末端側が内側に配向しており、中空構造であることも見出し、DNA や緑色蛍光タンパク質である GFP などのゲスト分子の内包や、1本鎖 DNA やヒト血清アルブミン (HSA)²などの機能性分子の表面修飾が可能であることを報告してきました³。その中で私は、ペプチドのC末端側に Glu を付与し、キャプシド表面がアニオン性の人工ウイルスキャプシドを構築し、さらにカチオン性脂質 DOTAP を用いて静電相互作用によりキャプシド表面に脂質二分子膜を被覆することを考察しました。そして、無細胞タンパク質発現系により脂質二分子膜表面に膜タンパク質を提示することで、エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの構築を検討しました (図1)。今回設計・構築した複合体は、人体に与える害の少ないペプチドや脂質のみを用い、比較的簡便な方法で構築できる点、従来の人工ウイルスキャプシド単体よりも大幅に安定である点が特長です。将来的には DDS のキャリアとしての応用が可能です。さらに、エンベロープ型ウイルスの詳細な細胞内動態はあまり知られておらず、エンベロープ型ウイルスの人工モデルの構築はそれらも解明しうる可能性を秘めていると期待しております。これを念頭に行った本研究の結果を以下に概説します。

まず、Fmoc 固相合成法により β -Annulus ペプチドのC末端側に Glu を2残基付与した β -Annulus-EE

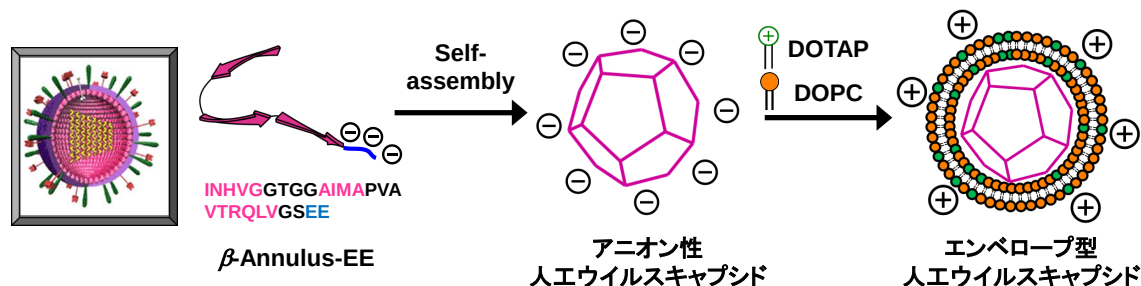


図1 静電相互作用を介したエンベロープ型ウイルスキャプシドの創製の模式図

ペプチドを合成しました。このペプチドを Tris-HCl buffer (pH 7.0) 中に溶解させることで、直径 60~80 nm 程度のアニオン性の表面電荷を有する人工ウイルスキャプシドの構築が DLS 測定、 ζ 電位測定、TEM 観察 (図 2A) により確認されました。次に、アニオン性人工ウイルスキャプシドへのカチオン性脂質 DOTAP および両性イオン脂質 DOPC (DOTAP : DOPC = 1 : 10) の静電相互作用による複合体を行いました。その結果、DLS 測定により複合体の粒径はキャプシド単体に比べ増大しており、 ζ 電位も正に大きくシフトしました。さらに、複合体の TEM 観察では、100 nm 程度のキャプシド部分と脂質二分子膜部分とのコントラストのある、形の整った球状集合体が確認されました。また、その TEM 像から膜の厚さを算出したところ、6~12 nm 程度であり、1 層もしくは 2 層相当の厚さであることが推測できます (図 2B)。以上の結果から、エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの創製に成功したと言えます。また、今回作製した複合体は DLS 散乱強度の濃度依存性から算出される臨界面合濃度は約 0.25 μ M であり、キャプシド単体の臨界面合濃度 (25 μ M) の 100 倍低い濃度においても安定な構造を形成していることが確認されました。最後に、無細胞発現系を用いて、細胞間物質輸送に関わる貫通膜タンパク質である Connexin 43 のエンベロープ表面上への提示を検討しました。その結果、ウエスタンブロッティング法により Connexin 43 の発現が確認され、TEM 観察においても 100 nm 程度の表面が歪な球状集合体が観察されたことから (図 2C)、Connexin 43 提示エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの構築に成功したと思われます。今後は、作製した複合体の詳細な構造解析を行うとともに、DDS キャリアとしての応

用を目指して引き続き実験を進めていく予定です。

おわりに

本研究は鳥取大学松浦和則先生のご指導のもと取り組んだ結果であり、多くのご支援いただきましたこと深く感謝申し上げます。また、日々適切な助言をいただきました助教の稲葉央先生、共同研究先である京都大学大学院工学研究科の秋吉一成先生、佐々木善浩先生、秋吉研究室の学生の皆様、そして、毎日の研究生活を支えてくださった研究室の学生の皆様に心より感謝申し上げます。最後に、次回の第 57 回ペプチド討論会は鳥取で開催されます。鳥取は鳥取砂丘とカニの名産地としても有名です。開催される時期は、ちょうどカニの旬な時期なので、是非、鳥取にお越しいただき、鳥取砂丘および旬のカニをご堪能いただけると幸いです。

参考文献

1. Matsuura, K; RSC Adv 2014, 4, 2942–2953.
2. Matsuura, K.; Honjo, T. Bioconj Chem 2019, 30, 1636–1641.
3. Matsuura, K.; Chem Commun (Feature Article) 2018, 54, 8944–8959.

ふるかわ ひろと
鳥取大学 大学院持続性社会
創生科学研究科 工学専攻
hiroto_8127@yahoo.co.jp

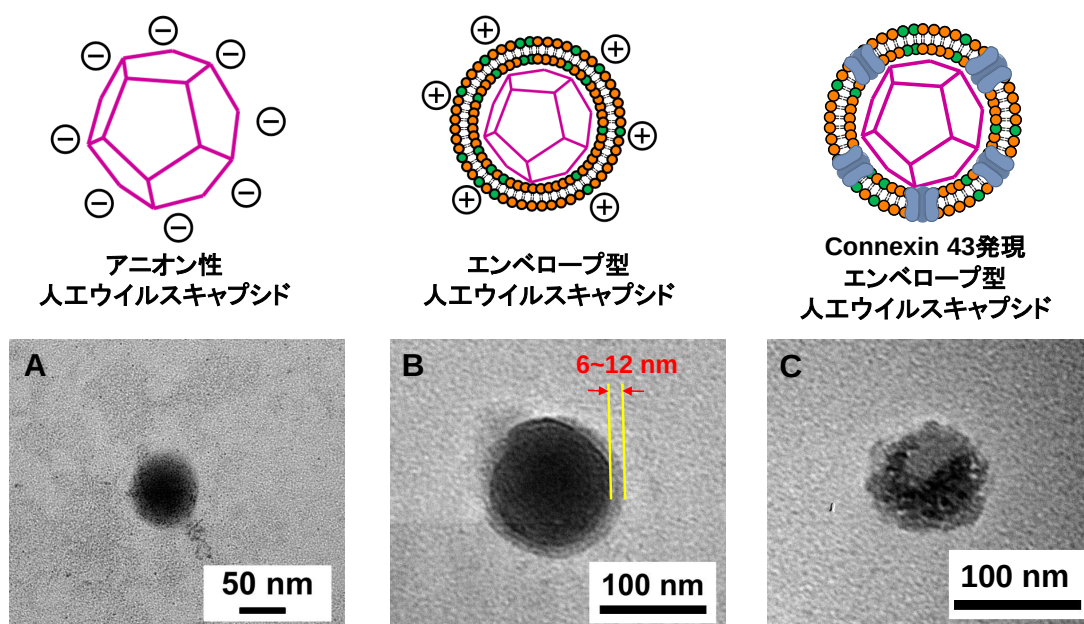
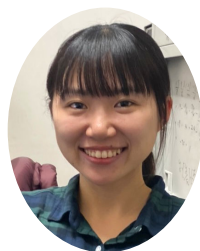


図2 (A) アニオン性人工ウイルスキャプシドの TEM 像 (2% $\text{Gd}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 染色), (B) エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの TEM 像 (EM ステイナー染色), (C) Connexin 43 発現エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの TEM 像 (EM ステイナー染色)。

Chem Sci 賞を受賞して

2019年10月23日から25日の3日間にわたって東京医科歯科大学 M&D タワーにて開催された第56回ペプチド討論会において、大変光栄なことに Chemical Science 賞を受賞しました。選考委員の皆様にはこの場をお借りして厚くお礼申し上げます。ペプチド討論会は私にとって2回目の学会発表でした。学会での発表に不慣れな上、英語での口頭発表はハードルが高く、本番の数カ月前からとても不安でした。いざ発表練習を始めてみると、一言目の collagen の発音から直され、先が思いやられました。小出先生を始め、研究室の方々には多くの時間を割いて根気よく指導していただき、そのおかげで無事発表を終え、さらにはこのような賞を頂くことができました。今回の発表を通して英語での発表への抵抗感は弱まり、尻込みせずにやってみるものだなと思いました。英語での口頭発表という貴重な機会をいただけたことに心から感謝しております。本稿では受賞の対象となった「Precursors of denatured collagen detectors that acquire collagen-hybridizing ability」について紹介します。



金井 沙也伽

コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分であり、Gly-Xaa-Yaa の繰り返し配列からなるポリペプチドの三量体タンパク質で、三重らせん構造を形成しています。しかし、悪性度の高いがん組織の周辺では、コラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼが過剰発現しており、三重らせん構造の一部がほどけた変性コラーゲンが蓄積していると考えられています¹。そこで、変性コラーゲンは DDS の

ターゲットになると考えられ、変性コラーゲンに結合する化合物は疾患部のイメージングやドラッグデリバリーへの応用が期待されます。

コラーゲン様ペプチド (collagen-mimetic peptide, CMP) とは、Gly-Xaa-Yaa の繰り返し配列をもつ数十残基程度のペプチドで、3重らせん形成能を有しています。ユタ大学の Yu のグループは、この性質を利用して3重らせん安定化配列である Gly-Pro-Hyp (4-hydroxyproline, Hyp) の繰り返しからなる CMP を変性コラーゲン特異的にハイブリッド形成させました² (図1)。また、当研究室では、2本の CMP 鎖を平行に束ねて環状化することによって、変性コラーゲンへの結合親和性を一本鎖の100倍程度にまで向上させました³。この環状 CMP を用いた *in vivo* の実験では、マウスに移植したヒト前立腺がんのイメージングに成功しています。しかし、これらの CMP は溶液中で室温においておくと自己集合し、自身で3重らせんを組みます。自己集合とハイブリッド形成は共に CMP の3重らせん形成能を利用したものであり、自己集合して三重らせん構造をとった状態では、CMP は変性コラーゲンとハイブリッド形成することができません。そのため、変性コラーゲンに結合させる直前に CMP 溶液を加熱して自己集合を解消する必要があります。直前に加熱処理が必要であると、加熱してから添加するまでの間におこる自己集合によって変性コラーゲン結合能が減弱し、結果の定量性に影響を与えます。さらに、*in vivo* の実験に用いる際には、注射の直前に加熱をするといった複雑な操作が必要になり結果が不安定になることから、CMP の自己集合を抑制することが求められていました。そこで、加熱処理せずとも変性コラーゲンに結合する CMP の開発を目的として今回の研究を行いました。

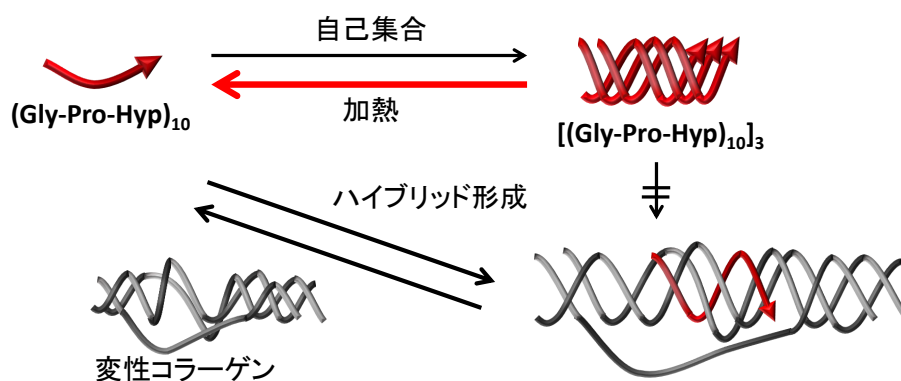


図1 CMP の自己集合と変性コラーゲンとのハイブリッド形成

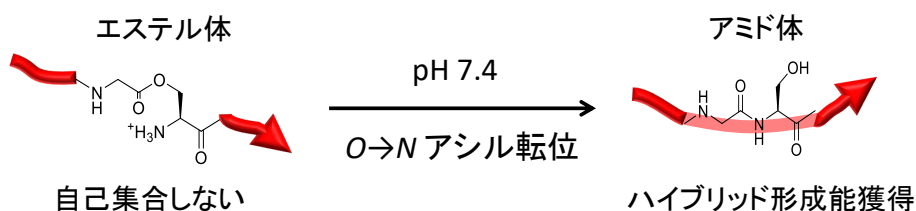


図2 CMP 前駆体の O→N アシル転位

そのために、私は *O*-アシルイソペプチドを用いることにしました。*O*-アシルイソペプチドは酸性条件下ではエステル体のままですが、生理的条件下では *O*→*N* アシル転位して、アミド体へと変化します。また、*O*-アシルイソペプチドを含むペプチド（エステル体）は転位後のペプチド（アミド体）と性質を異にします。例えば、アミロイドβペプチドはβシート構造をとって凝集するのに対し、*O*-アシルイソペプチドを導入したエステル体は水溶性が高く、ランダムコイル構造をとって凝集しないことが報告されています⁴。そこで、私は Gly-Pro-Hyp の繰り返し配列中に *O*-アシルイソペプチドユニットを導入した CMP 前駆体は、酸性条件下ではエステル体で自己集合せず、生理的 pH におくと *O*→*N* アシル転位し、アミド体となって 3 重らせん形成能を獲得して変性コラーゲンとハイブリッド形成するようになると期待しました（図 2）。

まず一本鎖 CMP でコンセプトを実証し、続いてより変性コラーゲンとの親和性が高い環状 CMP に応用しました。*O*-アシルイソペプチドユニットを導入した CMP 前駆体は、酸性条件下では変性コラーゲンに結合しませんが、系内で転位させると結合するようになることが確認できました。次に、一本鎖と環状 CMP の変性コラーゲンへの結合能を比較したところ、環状 CMP では結合能が大幅に向上していました。

以上より、*O*-アシルイソペプチドを導入した CMP は、生体内で活性物へと自発的に変換される前駆体としての応用が期待できます。今後は環状 CMP 前駆体を用いて、疾患部のイメージングや DDS など *in vivo* での実験に応用していきたいと思っています。

本研究は、早稲田大学小出隆規先生のご指導の下行いました。小出先生を始め、当研究室の皆様、研究についてのご助言をくださった諸先生方にこの場をお借りして深く感謝申し上げます。本受賞を励みに、より一層研究に邁進してまいりますので、引き続きご指導、ご鞭撻のほど、何卒よろしくお願い致します。最後になりましたが、今回執筆の機会をくださった児島千恵先生、第 56 回ペプチド討論会をお世話してくださった東京医科歯科大学の玉村啓和先生ならびに運営に携わったすべての皆様に本紙面をお借りして心よりお礼申し上げます。

参考文献

1. Egeblad, M.; Rasch, M. G.; Weaver, V. M. *Curr Opin Cell Biol* 2010, 22, 697–706.
2. Wang, A. Y.; Mo, X.; Chen, C. S.; Yu, S. M. *J Am Chem Soc* 2005, 127, 4130–4131.
3. Takita, K. K.; Fujii, K. K.; Kadonosono, T.; Masuda, R.; Koide, T. *ChemBioChem* 2018, 19, 1613–1617.
4. Taniguchi, A.; Sohma, Y.; Hirayama, Y.; Mukai, H.; Kimura, T.; Hayashi, Y.; Matsuzaki, K.; Kiso, Y. *ChemBioChem* 2009, 10, 710–715.

（ かない さやか ）
早稲田大学 先進理工学研究科
化学・生命化学専攻
kanai-syk.waseda@toki.waseda.jp

2020 年度 JPS トラベルアワード候補者推薦募集

第 36 回ヨーロッパペプチドシンポジウム／第 12 回国際ペプチドシンポジウム

「第 36 回ヨーロッパペプチドシンポジウム／第 12 回国際ペプチドシンポジウム（36th European Peptide Symposium / 12th International Peptide Symposium）」（2020 年 8 月 30 日～9 月 4 日）に参加して研究発表する、2020 年 4 月 1 日現在で 35 歳以下の若手研究者 2 名程度に参加支援金 5 万円（／1 人）を支給します。

希望者は締切日までに、所定の書式に必要事項を記入した Microsoft Word 形式のファイルを作成し、PDF ファイルとして電子メールで申し込んでください。学会に提出したアブストラクトはこの書式に貼付してください。なお、添付するアブストラクトには必ず発表者全員の氏名をご記入ください。選考は学会賞等選考委員会で行い、理事会での承認を得たのち、結果をお知らせします。

書式（Microsoft Word ファイル）は以下の URL からダウンロードしてください。

https://www.peptide-soc.jp/file/form/award/jps_travel_award_201801.docx

送信する必要書類：

所定の書式に以下の必要事項を記載した PDF ファイル

1. 推薦者氏名、会員番号、所属、E-mail アドレス
2. トラベルアワード候補者について
 - 氏名、会員番号
 - 生年月日および年齢（2020 年 4 月 1 日現在で 35 歳以下であること）
 - 所属および身分（学生は学年）
 - 所属先住所、電話番号、FAX 番号、E-mail アドレス
 - 発表演題および発表カテゴリー
 - シンポジウムでの発表形式（口頭、あるいはポスター）

3. 研究概要、アピールポイント

4. 受賞以降の研究の進展状況（過去トラベルアワードを受賞された方のみ、300 字以内）

5. 提出したアブストラクト（必ず発表者全員の氏名をご記入下さい）

申し込み先：

日本ペプチド学会事務局

E-mail : jps@peptide-soc.jp

締切：

2020 年 2 月 7 日（金）

申し込み後 1 週間経っても事務局から受け取りの

メールが届かない場合には、事務局宛に必ず確認のメールをくださるようお願いいたします。

なお、アブストラクト締切が延長された場合は、延長締切日より1週間後を当会トラベルアワード応募締切日といたします。

応募にあたってのご注意：

- ・本トラベルアワードは、日本ペプチド学会のみ応募できます。
- ・上記シンポジウムよりトラベルアワードを受賞された際には、当学会のトラベルアワードはご辞退ください。

編集後記

あけましておめでとうございます。初物づくしの令和2年の新年号をお届けいたします（令和初となる年の初めの新年号。干支も初めに返って子年。ペプチドニュースレターの編集委員として私の初めての編集作業でした）。新しい元号の新年を迎え、新たな気持ちで頑張っていこうと思っております。本年もペプチドニュースレターをどうぞ宜しくお願い申し上げます。年末に、「ドラえもんのひみつ道具がここまで実現している」という内容のテレビ番組を見ました。昭和の時代に令和の科学技術を着想していた作者の先見の明には感服するばかりです。また、調子に乗りすぎたのび太が最後に食らうしっぺ返しには「科学技術は正しく使わなければいけない」というメッセージが込められていたことにも気づかされました。さて、令和の時代、ドラえもんのひみつ道具を超えるような、ものすごいペプチドは生みだされるでしょうか？

本年が、日本ペプチド学会および皆様方にとって、良い年になりますようにお祈りいたします。

115号アンケートフォーム URL：

<https://forms.gle/FcFtuYGmFjn5RCJ3A>

（編集委員：児島 千恵）

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-0015 箕面市稲 4-1-2

一般財団法人蛋白質研究奨励会内

発行日：2020年1月21日

編集委員

坂口 和靖（担当理事）

（北海道大学大学院理学研究院）

TEL 011-706-2698, FAX 011-706-4683

E-mail: kazuyasu@sci.hokudai.ac.jp

大石 真也（京都大学大学院薬学研究科）

TEL 075-753-9268, FAX 075-753-4570

E-mail: soishi@pharm.kyoto-u.ac.jp

鎌田 瑠泉（北海道大学大学院理学研究院）

TEL 011-706-2721, FAX 011-706-4683

E-mail: kamadar@sci.hokudai.ac.jp

吉矢 拓（株式会社ペプチド研究所）

TEL 072-643-4411, FAX 072-643-4422

E-mail: t.yoshiya@peptide.co.jp

児島 千恵（大阪府立大学大学院工学研究科）

TEL 072-254-8190

E-mail: kojima@chem.osakafu-u.ac.jp

（本号編集担当：児島 千恵）