

# PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.101

2016年7月

# THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

http://peptide-soc.jp

# 「研究と笑い」

4月16日未明に本震が発生した熊本地震については現在も余震が続いており、犠牲になられた方々のご冥福をお祈りするとともに、被災された皆さまに心からお見舞いを申し上げます。また、一日も早い復旧を果たされることを願うと同時に、被災された皆様が平穏な日々を取り戻せるようお祈り申し上げます。



野水 基義

研究と笑い、一見全く関係のないこととみられがち である。研究は真剣で笑いは不真面目といったところ であろうか。しかし、研究にもっとも必要なものは笑 いかもしれない。私は30代にアメリカやカナダで10年 ほど大陸浪人をしてきた。渡米した当時、研究に関し てはペプチドしか知らなかったが、まわりの人からい ろいろな話を聞いてディスカッションをしていくうち にどんどん研究の幅が広がり、目的とする研究内容が 変わっていった。このときもっとも大事であったのが コミュニケーションであるが、言語より笑いの方が重 要であったと思う。笑いは人と人とのコミュニケー ションの最も優れた潤滑剤なのである。ペプチドを 使っていろいろな疑問を解決していく、これがペプチ ド科学のひとつの醍醐味である。ペプチド科学という ものは、いろいろな分野との接点が重要で、常にいろ いろな分野と対話する必要がある。ペプチドの合成 だけを見ても、幅広い有機化学との接点が必須であ り、有機化学的な技術の修得も必要である。ペプチド は生体内の活動を制御するもので、ペプチドを使って バイオロジーを解明したり、薬にしたりと、バイオロ ジーに直結するものである。幅広いバイオロジーの知 識が必要であり、いろいろな分野の研究者とのコミュ ニケーションが必須である。私は米国 NIH に留学し たときに、細胞外マトリックスを研究している研究者 からいろいろな知識を得た。細胞外マトリックスなど 全く知らなかった私が、このコミュニケーションから 得た知識でペプチドを用いた細胞外マトリックスの研 究を展開することができるようになった。まさにコ ミュニケーションの中でペプチド科学の研究している 様なものである。このように、ペプチド科学の研究に はいろいろな分野の研究者とのコミュニケーションが 重要である。さて、私のコミュニケーションに関する キャッチフレーズは「Smile, Cheerful, and Friendly」 である。大陸浪人をしていた頃から、常に心がけてい ることである。日本語に直すと「いつもにこにこ、よいしょで人付き合い」といったところであろうか。決してスマートなものではないかもしれないが、いろいろな人と円滑なコミュニケーションをとるには必要な姿勢であると思う。その中でもっとも大事なものは「笑い」である。昔から良い研究には遊び心が必要であるといわれるが、その表現形が笑いであろう。研究者には笑いが必要なのである。笑いと研究、実は密接な関係があり、笑いは研究という木を育てる最良の肥やしなのである。

のみず もとよし 東京薬科大学 薬学部 nomizu@toyaku.ac.jp http://www.ps.toyaku.ac.jp/~nomizu/index.html

## ものづくり研究をペプチドで

# 【はじめに】

先日,「21世紀後半に向けたペプチド科学の展望について」というテーマでペプチドニュースレターに記事を書いてみないかと、東京薬科大学・保住建太郎講師から打診を受けました。このような機会は貴重と思い、今回寄稿させていただくことに



増田 亮

なりました。このような機会をいただけましたことに 御礼申し上げます。

私は2012年に京都大学大学院薬学研究科・薬品有機製造学分野(現ケモゲノミクス分野)・藤井信孝教授(当時)のもとで博士学位を取得し、その後早稲田大学先進理工学部・生物分子化学教室・小出隆規教授のもとに助手として就任し、ひきつづき現在は助教として研究・教育に勤しんでいます。以下、私がこれまでに行った研究を紹介させていただきます。私が学生時代から現在の研究に至るまで一貫していることは「ものづくり研究をペプチドで」行っていることです。

# 【ケモカイン受容体 CXCR4の蛍光標識リガンドの開発】

ケモカイン受容体 CXCR4は通常, 白血球に高発現している受容体であり, その内因性リガンドである SDF-1と相互作用することによって白血球が遊走します」。一方で、転移性の腫瘍にも CXCR4が高発現し

ており、SDF-1を多く産生する肺や肝臓、リンパ節といった臓器に、これらが転移しやすいということも知られています $^2$ 。くわえて、HIVが白血球に感染する際の補助受容体としてもCXCR4が利用されます $^3$ 。

それまで薬品有機製造学分野では、ペプチド性の CXCR4アンタゴニストT140を開発しており、この誘 導体が腫瘍の転移や HIV の感染を阻害することを報 告していました4.5。そこでまず、CXCR4の蛍光標識ア ンタゴニストとしてT140の蛍光誘導体を開発するこ ととしました。T140をリードとした構造活性相関研 究を行った結果, D-Lys®の側鎖を蛍光標識したT140 の誘導体 TY14003および TY14015が、CXCR4に対し て強い結合活性を有していました<sup>6</sup>(図1a)。余談とな りますが、まだ研究というものに足を踏み入れたばか りの頃、CXCR4を発現した細胞にこれらのペプチド をかけ、共焦点顕微鏡で観察した時の衝撃は今でも忘 れていません。全く珍しくもない染色写真ではありま すが、自分が作ったペプチドでこんなにキレイに細胞 を染色できるものなのかと、感動したのを鮮明に覚え ています (図1b)。

つづいて、CXCR4の内因性アゴニスト SDF-1の蛍光標識体を開発することとしました。この開発に際しては、過去の SDF-1のファルマコフォアの解析から、蛍光標識に適した部分として C 末端領域を選択し、クリックケミストリーにより蛍光色素を導入しました。開発した種々の SDF-1誘導体は、CXCR4に対する結合活性、およびアゴニスト活性を維持していることを確認しました(表 1)7。

さらに、それまでに開発した蛍光標識アンタゴニスト, およびアゴニストを用いて、これらのリガンドが

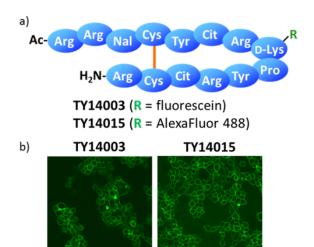


図1. (a) 蛍光標識 CXCR4アンタゴニストの構造, (b) CXCR4発現 HEK293細胞における各ペプチドの 結合観察

表1. SDF-1蛍光誘導体の CXCR4に対する結合活性および アゴニスト活性

peptide	substituted amino acid	$IC_{50}$ (nM)	EC <sub>50</sub> (nM)
SDF-1	-	2.3	2.7
SDF-1(63-AF488)	Glu <sup>63</sup>	2.9	9.8
SDF-1(67-AF488)	Asn <sup>67</sup>	5.6	15

 $IC_{50}$  values are the concentrations for 50% inhibition of the [ $^{125}$ ]-SDF-1 binding to CXCR4. EC<sub>50</sub> values are the concentrations for 50% release of [ $Ca^{2+}$ ] by CXCR4 stimulation.

CXCR4と相互作用した際の挙動を観察しました。その結果、蛍光標識アゴニストである SDF-1 (67-AF488) のみならず、蛍光標識アンタゴニストである TY14015 を CXCR4発現細胞に作用させた際にも、リガンドが細胞の内部に移行している様子が観察され、これらはエンドソームに局在していました(図2)。また、これらのリガンドは CXCR4と共局在していました。この結果は、CXCR4アンタゴニストの腫瘍転移抑制やHIV 感染抑制の薬理活性の発現は、SDF-1や HIV が CXCR4に結合することを競合的に阻害するだけではなく、細胞膜表面から CXCR4を枯渇させることによっても起きていることが示唆されました8。

上記の研究で必要な細胞実験を行うにあたっては、 京都大学大学院創薬科学分野(現ヤクリゲノミクス分 野)の研究室所属の皆様に多大な協力をいただきまし た。この場を借りて感謝を申し上げます。

# 【3重らせんペプチドの創薬への応用研究】

3重らせんペプチドはコラーゲンの3重らせん構 造を模倣するペプチドで、3本のペプチド鎖が1残 基ずつずれて縒り合わさることで棒状の3重らせん 構造を形成します。このペプチドはその剛直な構造 から、生体内に投与しても安定に存在できることが 当研究室の先行研究から示されています9.10。ペプチ ドが3重らせん構造を形成するために必要な一次配 列は、Xaa-Yaa-Glyの繰り返し配列です(Xaa と Yaa は任意のアミノ酸ですが、Xaa に Pro、Yaa に Hyp (4-hydroxyproline) が配置されるとき、3重らせん構 造が安定化されます)。そこで私は、天然に存在する 抗菌ペプチドの多くが両親媒性の構造をとっている点 に注目し、3重らせんペプチドの任意となるアミノ酸 部位に塩基性アミノ酸や疎水性アミノ酸を導入するこ とで、生体内でも安定で抗菌活性を示す3重らせんペ プチドが開発できると考えました。

抗菌性3重らせんペプチドの開発にあたっては、3 重らせん構造が独立した3本のペプチド鎖から形成される点を利用し、3重らせんペプチドのコンビナトリアルライブラリを構築し、その中から抗菌性の3重らせんペプチドを探索することとしました。そのために、まず、Pro-Hyp-Glyの繰り返し構造を持つペプチドのYaaに相当する一部分を、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸(あるいは中性アミノ酸)に置換し、置換部分を様々に変更した3種類のペプチドをデザインしました(図3a)。この時、3本のペプチド鎖を混合

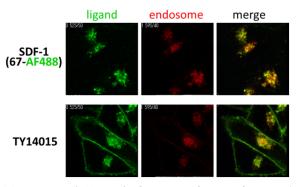


図 2. CXCR4発 現 CHO 細胞 に SDF-1 (67-AF488) および TY14015を作用させた際のリガンド内在化の様子

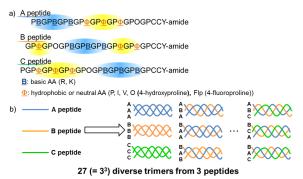
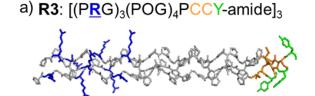


図3. (a) 両親媒性のコンビナトリアル3重らせんペプチドライブラリを構築するための各ペプチド鎖の配列, (b) 3種類のペプチドから生じる27種類の3重らせんペプチド

すると、3重らせん構造を形成する3本のペプチド鎖はそれぞれ非等価であるため、27種類の3重らせんペプチドが調製されることになります(図3b)。この性質を利用することで、多様なホモトライマーやヘテロトライマーを含む3重らせんペプチドのコンビナトリアルライブラリを構築しました。

本研究では、混合するペプチド同士の塩基性アミノ 酸と疎水性アミノ酸の組み合わせを固定した各ペプチ ドプールを調製し、それらの抗菌活性を評価しまし た。すると、ある特定の組み合わせを持つペプチド プールで活性を確認することができました。続いて. 活性が確認されたペプチドプールから構成するペプチ ドを減らしていった際の活性を比較評価することで. 活性本体を探索しました。その結果、N末端にArg のクラスターを有するホモトライマーR3を同定しま した11。さらに、構造活性相関研究によって活性の向 上を図った結果, R3と比較してより総電荷と電荷密 度が増加した誘導体 RR4が、より強力な抗菌活性を示 しました(図4a)。RR4は薬剤性菌を含むグラム陽性 菌およびグラム陰性菌の双方に抗菌活性が確認されま した。また、RR4は血清中でも高い安定性を有してお り(6時間後でも70%程度残存している),かつ低い 細胞毒性および溶血活性を示しました。つづいて RR4 の抗菌活性機序を調べました。RR4を作用させた大腸 菌を観察すると、大腸菌が異常に伸びている様子が 観察されました (図4b)。このように菌の伸張を誘導 する抗菌ペプチドとしては、puroindoline や microcin J25が知られています<sup>12,13</sup>。これらのペプチドは、菌内 の核酸や酵素と相互作用することで菌の分裂を阻害 し、菌の異常な伸張を誘導することが示唆されていま す。そこで、蛍光標識したRR4を細菌に作用させて みると、細菌の内部まで染色されている様子が観察さ れ、RR4が細菌内へ移行していることが示唆されまし た。くわえて、RR4の核酸に対する相互作用能をゲル シフトアッセイで評価したところ, RR4が DNA およ びRNAと相互作用している様子が観察されました。 以上の結果から、RR4は細菌の内部に入り、細菌内の 核酸と相互作用しうることが示唆されました。それに より細菌の分裂を阻害し、細菌の異常な伸張を誘導し た可能性が考えられます14。

以上の結果より、抗菌性の3重らせんペプチドを開発することに成功しました。今後はRR4の in vivoへ



RR4: [(RRG)<sub>2</sub>(POG)<sub>5</sub>PCCY-amide]<sub>3</sub>

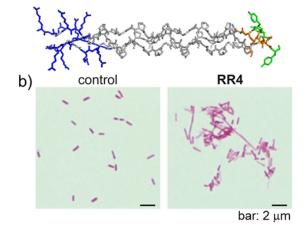


図4. (a) R3および RR4の配列と立体構造, (b) RR4を作用 させた際の大腸菌の様子。

の応用を考え, どのような病態に適用できるかを検討 していく必要があります。

本研究は、薬理活性を3重らせんペプチドに賦与できることを実証した一例だと考えています。現在は、本研究とは異なったアプローチから3重らせんペプチドの創薬研究を行っています。

### 【最後に】

以上、私がこれまでに行った研究について、紹介させていただきましたが、いただいたテーマである「21世紀後半に向けたペプチド科学の展望について」と関連付けると、ペプチドを利用することで解決できる研究や技術はまだまだ多くあるという印象を受けます。特に創薬といったものづくりにおいては、物性や動態の悪さからこれまで敬遠されてきたペプチドではありますが、それらの問題を回避するような方法も続々と開発されています。中分子創薬の候補として目されているペプチドの、これまでの発展にも勝るこれからの飛躍に期待しています。

末筆ではありますが、学生時代にご指導賜りました 藤井信孝教授、大野浩章教授、大石真也准教授、なら びに現在の研究を遂行するにあたり多大なご協力を賜 ります小出隆規教授に深く感謝申し上げます。

## 【参考文献】

- Kucia, M.; Jankowski, K.; Reca, R.; Wysoczynski, M.; Bandura, L.; Allendorf, D. J.; Zhang, J.; Ratajczak, J.; Ratajczak, M. Z. J Mol Histol 2004, 35, 233–245.
- 2. Liotta, L. A. Nature 2001, 410, 24-25.
- Bleul, C. C.; Farzan, M.; Choe, H.; Parolin, C.; Clark-Lewis, I.; Sodroski, J.; Springer, T. A. Nature 1996, 382, 829–833.

- Tamamura, H.; Xu, Y.; Hattori, T.; Zhang, X.; Arakaki, R.; Kanbara, K.; Omagari, A.; Otaka, A.; Ibuka, T.; Yamamoto, N.; Nakashima, H.: Fujii, N. Biochem Biophys Res Commun 1998, 253, 877–882.
- Tamamura, H.; Hori, A.; Kanzaki, N.; Hiramatsu, K.; Mizumoto, M.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Otaka, A.; Fujii, N. FEBS Lett 2003, 550, 79–83.
- Oishi, S.; Masuda, R.; Evans, B.; Ueda, S.; Goto, Y.; Ohno, H.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G.; Wang, Z.; Peiper, S. C.; Naito, T.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Fujii, N. ChemBio-Chem 2008, 9, 1154–1158.
- 7. Masuda, R.; Oishi, S.; Tanahara, N.; Ohno, H.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G.; Kodama, E.; Matsuoka, M.; Fujii, N. Future Med Chem 2012, 4, 837–844.
- Masuda, R.; Oishi, S.; Tanahara, N.; Ohno, H.; Hirasawa, A.; Tsujimoto, G.; Yano, Y.; Matsuzaki, K.; Navenot, J. M.; Peiper, S. C.; Fujii, N. Bioconjug Chem 2012, 23, 1259– 1265.
- 9. Yasui, H.; Yamazaki, C. M.; Awada, C.; Nose, H.; Takao, T.; Koide, T. Biopolymers (Pept Sci) 2013, 100, 705–713.
- 10. Koide, T.; Yamamoto, N.; Taira, K. B.; Yasui, H. Biol Pharm Bull 2016, 39, 135–137.
- 11. Masuda, R.; Kudo, M.; Dazai, Y.; Mima, T.; Koide, T. Biopolymers (Pept Sci) 2016, in press.
- Alfred, R. L.; Palombo, E. A.; Panozzo, J. F.; Bhave, M. PLoS One 2013, 8, e75488.
- Yuzenkova, J.; Delgado, M.; Nechaev, S.; Savalia, D.; Epshtein, V.; Artsimovitch, I.; Mooney, R. A.; Landick, R.; Farias, R. N.; Salomon, R.; Severinov, K. J Biol Chem 2002, 277, 50867–50875.
- 14. Masuda, R.; Dazai, Y.; Mima, T.; Koide, T. Biopolymers (Pept Sci) revised.

ますだ りょう 早稲田大学 先進理工学部 化学・生命化学科 r.masuda@aoni.waseda.jp http://www.chem.waseda.ac.jp/koide/

# ケミストによる タンパク質性医薬品開発を目指して

# 1. はじめに

筆者は2015年3月に徳島大学・大高章先生のもとで学位を取得し、同年4月から静岡大学工学部の助教として教育・研究に従事している。学部3年後期に研究室配属される際、大高先生のお人柄と「サイエンスは美しい」というお言葉に魅了さ



佐藤 浩平

れて同研究室の門をたたいた。配属当初から学位取得までの6年半の間,一貫してタンパク質化学合成研究に携わってきた。第44回若手ペプチド夏の勉強会にて本記事のタイトルで発表した内容をアップグレードして,以下筆者が取り組んできた研究について紹介したい。

## 2. タンパク質化学合成の現状と課題

Merrifield 先生によるペプチド固相合成法の開発はペプチド合成化学を飛躍的に進展させ、50残基程度のペプチドであれば迅速に供給可能となった¹。しかし、一般的なタンパク質サイズのものとなると固相法による直接的合成は未だ困難である。そこでタンパク質を化学合成法にて調製する際は、固相法により調製したペプチド鎖を液相にて縮合する手法がもっぱら採用される。信頼性の高いペプチド鎖縮合反応として、北條先生および相本先生により開発されたチオエステル法²および Kent 先生らによって報告された native chemical ligation (NCL) 法³が挙げられる。

NCL 法はペプチドチオエステルと N 末端システイン含有ペプチド間の化学選択的縮合反応であり、無保護ペプチド鎖を中性緩衝液中混合するのみで反応が進行することから幅広く利用されている。しかし、1)必須合成中間体であるペプチドチオエステルの合成が煩雑であること、2)100残基を超えるタンパク質を合成するには、複数のペプチド鎖を効率的に縮合可能な信頼性の高い手法が必須であること、3)縮合部位が出現頻度の低いシステイン残基に制限されることなどが課題となっている。

# 3. SEAlide ペプチドの開発―ペプチドチオエステル前駆体から等価体へ―

ペプチドチオエステルは塩基性条件に不安定であるため、固相合成法の主流である Fmoc 法による直接的合成は困難である。このため筆者の研究室配属当時は、Fmoc 法に適用可能なペプチドチオエステル合成法の開発研究が国内外で進められていた $^4$ 。大高研究室では、当時修士2年であった津田修吾さん(現株式会社ペプチド研究所)により Fmoc 法で合成可能なペプチドチオエステル前駆体としてN-sulfanylethylanilide(SEAlide)ペプチドの開発に成功していた $^5$ 。SEAlide ペプチドは適度に活性化されたアニリド結合にチオール基を近接して配置することで、ピペリジン処理に対する安定性とペプチド鎖構築後にチオエステルへと変換可能な反応性を両立した分子である(図1)。

筆者は、酸処理(4 M HCl in DMF など)を引き金 として対応するチオエステルへと変換されるという SEAlide ペプチドの「チオエステル前駆体」としての 性質を利用して、N末端側からC末端側 (N→C方 向)への多成分 NCL 法の開発に着手した。すなわ ち、ペプチドチオエステルと N 末端システイン含有 SEAlide ペプチドを中性条件下 NCL により縮合した 後、酸処理によりペプチドチオエステルへと変換しこ れを繰り返すことで複数のペプチド鎖を縮合するとい うものである(図2)。この合成計画に従い、まずペ プチドチオエステルと N 末端システイン含有 SEAlide ペプチドを中性緩衝液中反応させたところ、所望の縮 合生成物が得られたものの、予期せぬことに N 末端 システイン含有 SEAlide ペプチド由来の環状ペプチド が副生することが明らかとなった。この副反応との遭 遇が、SEAlideペプチドの「チオエステル等価体」と しての機能を見出す契機となった。

中性条件下においても SEAlide ペプチドがチオエス

テルとして機能することが示唆されたため、モデル実験として SEAlide ペプチドと N 末端システイン含有ペプチドを中性条件下反応させたところ、縮合生成物を高純度で得られることが明らかとなった6。反応条件を精査した結果、リン酸塩が反応を促進すること、またリン酸塩非存在下ではほとんど反応が進行しないことを見出した。さらに、リン酸塩による反応促

図1. アニリン型補助基と SEAlide ペプチド

進効果は反応溶液に後からリン酸塩を添加した際にも確認された。ここに SEAlide ペプチドがリン酸塩存在下でのみ「ペプチドチオエステル等価体」として機能することが明らかとなった。そこで当初の計画を変更し、リン酸塩の添加をトリガーとする1ポット多成分 NCL 法を新たに立案した(図3)。すなわち、初めにペプチドチオエステルと N 末端システイン含有SEAlide ペプチドをリン酸塩非存在下 NCL により縮合した後、N 末端システインペプチドのリン酸緩衝溶液を反応液に加えることで1ポットにて3成分縮合生成物を得るという手法である。

新たに計画した合成戦略を適用することで、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドの1ポット合成を達成した6。さらに本反応をアルキルチオエステルとアリールチオエステルの反応性の差を利用した多成分 NCL法(KCL法)7と組み合わせることで、当時は前例のなかった  $N \rightarrow C$  方向の1ポット4成分 NCL反応の開発にも併せて成功した6。

## 4. GM2活性化タンパク質の完全化学合成

タンパク質性医薬品の多くは遺伝子組み換え技術を利用して製造されている。しかし、遺伝子工学的手法によるタンパク質調製では、糖鎖付加等の翻訳後修飾を制御し均一な分子種を得ることは困難である。一方、化学合成法は複雑な翻訳後修飾を有するタンパク質であっても均一に調製可能である。医薬品という性格上、品質の均一性を担保し生物起源のコンタミネーションを防ぐという観点からも、化学合成によるタンパク質性医薬品の供給は魅力的である8。

GM2活性化タンパク質(GM2AP)はスフィンゴ糖脂質の一種である GM2ガングリオシドの代謝に必須のリソソームタンパク質である<sup>9</sup>。リソソームタンパク質の機能欠損は進行性かつ致死性の疾患を引き起こす。先天性の GM2AP 欠損症に対する治療法として、欠損タンパク質補充療法の確立が期待されているものの未だ達成されていない。そこで筆者は、本欠損症に対する実用的補充薬開発のための技術基盤として

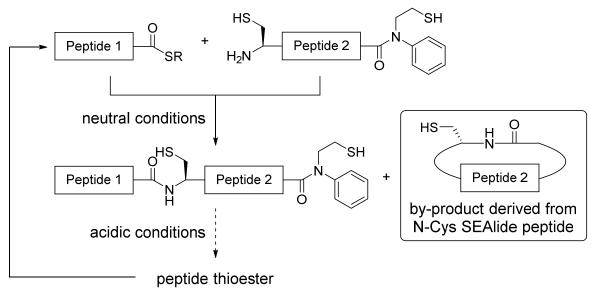


図2. 酸処理をトリガーとした多成分 NCL法

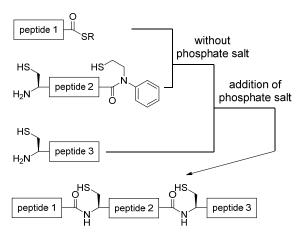


図3. リン酸塩の添加をトリガーとした1ポット3成分 NCL法

GM2AP の完全化学合成法の確立に取り組んだ。

GM2APは162アミノ酸残基から成るタンパク質で、32残基目のアスパラギン上に N 結合型糖鎖を有する。まずは、糖鎖結合部位のアスパラギンをシステインへと置換した誘導体を合成標的として設定した。このアミノ酸置換により NCLによる新たな縮合部位を設定できるだけでなく、システイン側鎖上チオールを足掛かりとしたアルキル化反応により糖構造の導入も可能になると考えたためである $^{10}$ 。GM2AP誘導体の合成計画を図4に示す。各ペプチド鎖の収束的縮合を実現するための鍵中間体として SEAlide ペプチドを活用し、5つのペプチド鎖から合成することとした。合成結果の詳細は割愛するが、縮合反応およびアルキル化による糖ユニット導入はいずれも円滑に進行しモノグリコシド含有システイン置換型 GM2AP誘導体の化学合成を達成した $^{11}$ 。

続いて、GM2AP 糖鎖結合部位のアミノ酸を置換しない、天然配列の GM2AP 合成に取り組んだ。上述の合成でシステインへの置換を要したのは、NCLによるペプチド鎖縮合部位がシステイン残基に制限されるためである。近年この制限を克服する手法とし

て、チオール含有人工アミノ酸を利用した NCL 様ペプチド鎖縮合と続く脱硫反応により、形式的にシステイン以外のアミノ酸部位で縮合する手法が開発されている $^{12}$ 。本手法を天然型 GM2AP の合成に適用すべく、 $\beta$  メルカプト N- グリコシル化アスパラギン誘導体を設計・合成した(図 4)。本誘導体を誘導体合成時に置換したシステインの代わりに利用し、縮合・脱硫を経て、システイン置換体と同様の合成経路で天然型 GM2AP の完全化学合成を達成した $^{13}$ 。なお、合成した GM2AP 誘導体はいずれもリソソーム酵素である  $\beta$ - ヘキソサミニダーゼ A 存在下 GM2分解補助活性を示し、その活性は大腸菌に遺伝子導入して調製した GM2AP と同程度であった。

### 5. おわりに

筆者がタンパク質化学合成の世界に飛び込んでから この分野のトレンドは、チオエステル合成法の開発、 多成分縮合法の開発を経て、現在は種々のタンパク質 合成への応用展開へと変化してきたと認識している。 この流れの中で、化学合成可能なタンパク質のサイ ズ・種類は激増し、近年の国内研究に絞っても、大阪 大学・北條先生、川上先生のグループの IL-214および 修飾ヒストンタンパク質の合成15. 大阪大学・梶原先 生のグループの糖鎖修飾型 EPO の合成16が達成され るなど、複雑な翻訳後修飾タンパク質でさえ自在に合 成可能な時代になりつつある。しかし現状では化学合 成されたタンパク質を研究室レベルで評価することは 可能であるが、その後の展開を考えるうえで生産量や コストに課題を抱えている。今後一層、発現タンパク 質と化学合成ペプチドを組み合わせる半化学合成研究 の重要性が増すと考えられる。ペプチド・タンパク質 化学の技術を総動員した生理活性タンパク質化学合成 の成果と従来の低分子医薬品で蓄積されてきたノウハ ウが融合し、ケミストによるタンパク質性医薬品創製 が実現することを期待したい。

#### 6. 謝辞

本研究を行うにあたり終始ご指導いただきました,

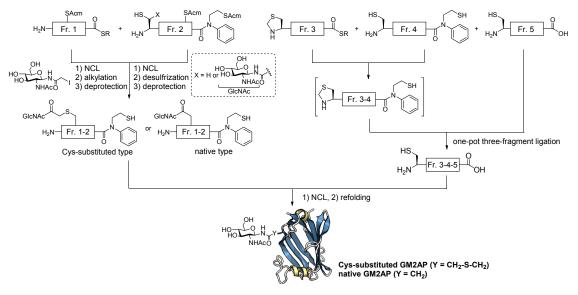


図4. GM2AP 誘導体の合成戦略

徳島大学・大高 章教授ならびに重永 章講師, 猪熊 翼特任助教に深く感謝申し上げます。GM2APに関する研究は徳島大学・伊藤孝司教授, 辻大輔助教, 北風圭介博士との共同研究の成果であり, この場を借りて感謝申し上げます。現所属である静岡大学工学部化学バイオ工学科・ケミカルバイオロジーグループの渡辺修治教授(現特任教授), 間瀬暢之教授, 平川和貴教授, 戸田三津夫准教授, 鳴海哲夫准教授には, 筆者なりのペプチド研究を進めるにあたり多大なご支援を賜りました。最後になりましたが, このような寄稿の機会を与えていただきました編集委員の東京薬科大学・保住建太郎先生に厚く御礼申し上げます。

# 参考文献

- 1. Merrifield, R. B. J Am Chem Soc 1963, 85, 2149–2154.
- 2. Hojo, H.; Aimoto, S. Bull Chem Soc Jpn 1991, 64, 111–117.
- 3. Dawson, P. E.; Muir, T. W.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. B. H. Science 1994, 266, 776–779.
- 重永章;佐藤浩平;大高章 有機合成化学協会誌 2010,68,911-919.
- Tsuda, S.; Shigenaga, A.; Bando, K.; Otaka, A. Org Lett 2009, 11, 823–826.
- Sato, K.; Shigenaga, A.; Tsuji, K.; Tsuda, S.; Sumikawa, Y.; Sakamoto, K.; Otaka, A. ChemBioChem 2011, 12, 1840– 1844.
- Bang, D.; Pentelute, B. L.; Kent, S. B. H. Angew Chem Int Ed 2006, 45, 3985–3988.
- 8. Chalker, J. M. Chem Biol Drug Des 2013, 81, 122-135.
- 9. Kolter, T.; Sandhoff, K. Annu Rev Cell Dev Biol 2005, 21, 81-103
- 10. Davis, N. J.; Flitsch, S. L. Tetrahedron Lett 1991, 32, 6793–6796.
- 11. Sato, K.; Shigenaga, A.; Kitakaze, K.; Sakamoto, K.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Otaka, A. Angew Chem Int Ed 2013, 52, 7855–7859.
- 12. Malins, L. R.; Payne, R. J. Aust J Chem 2015, 68, 521-537.
- 13. Sato, K.; Kitakaze, K.; Nakamura, T.; Naruse, N.; Aihara, K.; Shigenaga, A.; Inokuma, T.; Tsuji, D.; Itoh, K.; Otaka, A. Chem Commun 2015, 51, 9946–9948.
- Asahina, Y.; Komiya, S.; Ohagi, A.; Fujimoto, R.; Tamagaki, H.; Nakagawa, K.; Sato, T.; Akira, S.; Takao, T.; Ishii, A.; Nakahara, Y.; Hojo, H. Angew Chem Int Ed 2015, 54, 8226–8230.
- Kawakami, T.; Yoshikawa, R.; Fujiyoshi, Y.; Mishima, Y.;
   Hojo, H.; Tajima, S.; Suetake, I. J Biochem 2015, 158, 403–411.
- 16. Murakami, M.; Kikuchi, T.; Nishihara, M.; Tezuka, K.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y. Sci Adv 2016, 2, e1500678.

さとう こうへい 静岡大学学術院 工学領域 化学バイオ工学系列 sato.kohei@shizuoka.ac.jp http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~tnmase/chemical\_ biology\_group/index.html

# 合成糖鎖をアジュバントとして用いた がんワクチンの開発と翻訳語修飾糖鎖の化学合成

私は2011年に東北大学大学院理学研究科で上田実教授の指導で博士の学位を取得し、その後、九州大学大学院理学研究院の大石徹教授のもとで1年間、博士研究員を勤めました。2012年4月から、現在の大阪大学大学院理学研究科の深瀬浩一教授の研究室で助教をしておりま



真鍋 良幸

す。この間、天然物(低分子活性物質のみでなく、タンパク質、ペプチド、糖、脂質などを含む)を対象とした研究に携わり、天然物が引き起こす興味深い生命現象に惹かれ、その合成、作用機構解明、また、それらを用いた生物機能制御を行ってきました。ここでは現在行っているがんワクチンの開発とタンパク質の翻訳後修飾糖鎖の合成研究について紹介させていただきます。

# · a-gal をアジュバントとして用いた効率的がんワク チン療法の開発

α-gal エピトープ(Figure 1)は、多くの哺乳類で 広く発現しているものの、ヒトはこの糖鎖を持ちま せん。一方で、腸内フローラなどからの被ばくによ り, α-gal に対する抗体 (抗 Gal 抗体) が生成し, そ の量はヒトの自然抗体の中で最も多く、激しい免疫反 応を引き起します。我々は、この免疫反応に着目し、 α-gal をワクチンの抗原性を高めるアジュバントとし て利用したがんワクチン療法の開発に取り組んでいま す。がんの免疫療法は、副作用が少なく、転移や再発 を抑制する治療となる可能性を秘めているものの、未 だ標準的治療としては確立されていません。これはが ん抗原の抗原性が低いことが最大の要因です。そこ で、本研究では、がん抗原を $\alpha$ -gal で標識することで、 生体内に大量に存在する抗 Gal 抗体を介して抗原の免 疫細胞への取り込みを促進し、免疫反応を賦活化する ことで、効率的ながんワクチン療法の開発を目指しま す。

本研究では、化学合成した  $\alpha$ -gal を活性エステル  $\mathbf{1}$  へと誘導し、これを用いて、さまざまながん抗原を  $\alpha$ -gal で標識しました(Figure 2)。まず、BSA を抗原

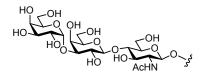


Figure 1 α-gal エピトープ

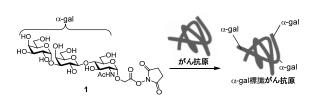


Figure 2 合成糖鎖を用いたがん抗原の α-gal 標識

のモデルとして実験を行いました。BSAを1で処理 することで、α-gal 標識 BSA を調製し、これをマウス に投与し、その血清中の BSA に対する抗体の量を評 価しました。その結果、α-gal 標識により BSA に対す る抗体の産生量が劇的に増加することが分かりまし た。BSAを用いたモデル実験に成功したので、続い てがん抗原である MUC1ペプチドを用いて実験を行 いました。MUC1は20アミノ酸からなるペプチドで、 この繰り返し配列がさまざまながんで高発現していま す。MUC1を用いた場合においても α-gal がアジュバ ントとして機能し、α-gal 標識により MUC1に対する 抗体の産生量が増加しました。これまでに α-gal の生 合成酵素を利用して抗原を α-gal で標識し、α-gal をア ジュバントとして用いる試みは検討されてきました  $が^{1,2}$ , この方法では、均一性の担保が難しく、また、 糖鎖を持たない抗原に対しては利用できないという大 きな制限がありました。我々は、化学合成した α-gal を化学標識法により抗原と複合化することで、この問 題を克服し、α-galのアジュバントとしての利用の幅 を大きく広げることができました。

#### ・コアフコース含有 N- グリカンの合成

N-結合型糖鎖 (N-グリカン)はタンパク質のアスパラギン残基に結合する翻訳後修飾糖鎖で,多様な構造を持ち,それぞれの構造にもとづき,タンパク質の機能を調節します。一方で,糖鎖は多様性に富み,生体内ではそれらが複雑な混合物(グライコフォーム)として存在するため,糖鎖構造と活性の相関は詳細には解明されていません。我々は,N-グリカンの機能解明には,均一構造のN-グリカンを用いることが必須であると考え,その化学合成を行ってきました。ここでは,免疫系やシグナル伝達の制御に関与するコア

フコース構造を含有する N- グリカン 2 の合成について紹介させていただきます(Figure 3)。

目的の12糖は還元末端の4糖4に対し、非還元末端の4糖3を2度グリコシル化することで得ようと考えました(Figure 4)。まず、3、4の合成を行いました。このような巨大な糖鎖の合成においては中間体の大量合成が必須です。そこで、精密条件下でのスケールアップが可能なマイクロフロー反応を有効に利用し(Figure 4①) $^{3-7}$ 、中間体となるフラグメント(2-4糖構造)を10 g以上のスケールで合成しました。また、分子が巨大になるにつれ、その反応性が低下することは大きな問題です。我々は、3の合成に当たり、アミド(-NHAc)をイミド(-NAc2)として保護することで、分子間水素結合を切断し、反応性を向上させられるという興味深い現象を見出しました(Figure 4②) $^{8}$ 。

上記のようにして効率的に合成した 3, 4 を用いて糖鎖骨格を構築しました (Scheme 1)。 2 度のグリコシル化反応において、徹底的に条件検討した結果、溶媒としてエーテルを用いることで、それぞれ88%、87%の高収率で反応が進行し、7 を得ることができ

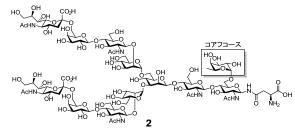


Figure 3 コアフコース含有 N- グリカン

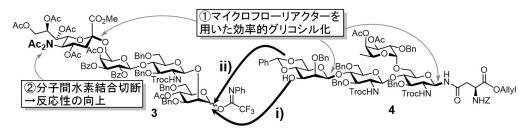
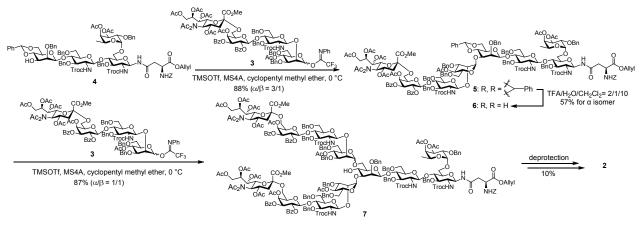


Figure 4 合成計画とフラグメント合成におけるポイント



Scheme 1 コアフコース含有 N-グリカンの合成

ました。一方、 $\alpha/\beta$  立体選択性はそれぞれ3/1および 1/1と満足のいくものではなく、現在検討中です。最後に、得られた7を脱保護することで、目的の12糖 2 の合成に成功しました。

このようにして純粋な N- グリカンを得ることができましたので、現在、合成糖鎖を用いたレクチンとの相互作用解析、合成糖鎖で修飾したタンパク質の動態解析などを行っています。これらの研究を通して、特定の構造の N- グリカンがタンパク質の活性に及ぼす影響を分子レベルで解明できると考えています。

上記のように、私は糖鎖の合成、それを用いた機能解明、生命現象の制御を中心テーマとして研究を進めています。糖鎖研究において、糖鎖が結合しているタンパク質、ペプチドを無視して研究を進めることができないのはもちろんのことですが、約60%のタンパク質は糖鎖による翻訳後修飾を受けており、ペプチド、タンパク質の機能解析においても糖鎖機能の解明は避けて通れません。今後、私は、糖鎖、ペプチド、タンパク質、さらには脂質まで含めたこれらの生体分子が形成する複雑な生体分子社会を分子レベルで解明し、さらに、それを制御し、新たな創薬研究やバイオプローブへと展開したいと考えています。

#### 参考文献

- 1) LaTemple, D. C.; Henion, T. R.; Anaraki, F.; Galili, U. Cancer Res 1996, 56, 3069–3074.
- 2) Tanemura, M.; Miyoshi, E.; Nagano, H.; Eguchi, H.; Taniyama, K.; Kamiike, W.; Mori, M.; Doki, Y. Cancer Sci 2013, 104, 282–290.
- 3 ) Uchinashi, Y.; Nagasaki, M.; Zhou, J.; Tanaka, K.; Fukase, K. Org Biomol Chem 2011, 9, 7243–7248.
- 4) Uchinashi, Y.; Tanaka, K.; Manabe, Y.; Fujimoto, Y.; Fukase, K. J. Carbohydrate Chem 2014, 33, 55–67.
- 5 ) Tanaka, K.; Miyagawa, T.; Fukase, K. Synlett 2009, 1571– 1574
- Tanaka, K.; Mori, Y.; Fukase, K. J Carbohydr Chem 2009, 28, 1–11.
- 7) Manabe, Y.; Kitawaki, Y.; Nagasaki, M.; Fukase, K. Matsubara, H.: Hino Y.; Fukuyama, T.; Ryu, I. Chem Eur J 2014, 20, 12750–12753.
- 8) Zhou, J.; Manabe, Y.; Tanaka, K.; Fukase, K. Chem Asian J *in press*.

まなべ よしゆき 大阪大学 大学院理学研究科 manabey12@chem.sci.osaka-u.ac.jp http://www.chem.sci.osaka-u.ac.jp/lab/fukase/

## 細胞非自律的な細胞機能制御

大阪大学の武内敏秀と申します。このたび、東京薬科大学の保住建太郎先生からお誘いいただき、寄稿させていただくことになりました。実はペプチドニュースレターには過去に一度、留学体験記を掲載していただいたことがあり(2009年4月発行のNo.72)、今回は2度目



武内 敏秀

の登場となります。この機会を活用し、自己紹介も兼ねて少し自由に書いてみたいと思います。

### 1. これまでの異動の経緯

大学卒業から現在までに異動が何回かありましたので、まずはその経緯を紹介したいと思います。私は2008年3月に京都大学大学院薬学研究科(二木史朗教授)を卒業後、スイス・ジュネーブ大学理学部化学科(Stefan Matile 教授)に留学致しました。スイスでの生活や研究については、前出の留学体験記で簡単に紹介していますので、そちらもぜひご覧ください。2年間の留学の後、東京都小平市にあります、国立精神・神経医療研究センター・神経研究所(永井義隆室長)で3年間ポスドクをした後、出身研究室の京都大学化学研究所(二木史朗教授)に3年間助教として勤めさせて頂きました。その後、本年4月から大阪大学医学系研究科・神経難病認知症探索治療学寄附講座に講師として在籍しています。

スイス留学中はポリイオン - カウンターイオン物性の物理化学的解析とそれに基づくバイオセンサーの開発,東京の神経センターでは神経変性疾患・認知症に対する病態解明と治療研究,京大化研では薬物送達手法の開発やダイマー制御法の開発に参加させて頂きました。異なる環境・異なる分野に身を置くことで,研究に対する考え方や取り組み方,研究の多様なありようを体験することができ,大変勉強になりました。本稿では,昨年発表した「熱ショック応答の細胞間補償」に関する研究について紹介させていただき,個体における細胞非自律的な細胞機能制御について考えてみたいと思います。

# 2. 熱ショック応答の細胞間補償機構

細胞は、生存に適した温度よりも高い温度環境にさらされると、分子シャペロンと呼ばれる防御因子を一過性に発現誘導することで、細胞内タンパク質が変性してしまうのを未然に防ぐことが知られています。これを熱ショック応答といいます。熱ショック応答は、大腸菌から酵母、ほ乳類に至るまで進化的に広く保存されており、この応答を誘導できない変異体細胞は、ストレス負荷に対して極めて脆弱であることから、細胞の生存に必要不可欠なタンパク質恒常性維持機構(プロテオスターシス維持機構)のひとつとして、生命活動の根幹を支えていると考えられています。

ところが、多細胞生物の個体内では、必ずしもすべての細胞や組織で一様に熱ショック応答が観察される

わけではなく、熱ストレス負荷に対するシャペロン誘導をほとんど示さない細胞も存在します。例えば、脳の海馬ニューロンは熱ストレスに対する応答性をほとんど示さない一方で、その近傍に位置するグリア細胞では高い応答性が認められます。実は、このような熱ショック応答性の細胞間・組織間不均衡は、すでに30年以上前から指摘されているものの、その生理的意義はおろか、なぜストレス非応答性細胞が発生過程で淘汰されずに存続できるのかさえ、未だによく分かっていません。

私たちは、この謎を解明するため、熱ショック応答の不均衡状態を擬似的に再現した細胞およびショウジョウバエモデルの解析を行いました。その結果、分子シャペロンがエクソソームと呼ばれる細胞外小胞により細胞から分泌されていること、分泌されたエクソソームを別の細胞が取り込むとその細胞内のシャペロン活性が上昇することが分かりました。これは、それぞれの細胞内でのみ働くと考えられていた分子シャペロンが、個体内では他の細胞・組織においても働くという、細胞非自律的な(間接的な)プロテオスターシス制御機構の存在を示唆するものであり、その分子機序のひとつとしてエクソソームを介した細胞間伝播が重要な役割を担う可能性を示しています。

興味深いことに、熱ショック時には分子シャペロンのエクソソーム分泌が顕著に亢進すること、また、たとえ受け手側の細胞がストレス非応答性細胞であっても、別のストレス応答性細胞から分泌されたエクソソームを受け取れば、シャペロン活性が上昇することが分かりました。つまり、ストレス非応答性細胞は、確かにそれ単独では極めて脆弱であるものの、他のストレス応答性細胞が共存していれば、細胞非自律的にストレスから防御され、細胞集団全体の恒常性が維持されるのではないかと考えられます。私たちは、このようなエクソソームを介した細胞間伝播が、熱ショック応答性の細胞間・組織間不均衡を機能的に補償する分子機序のひとつであると提唱し、これを証明する研究を進めています。

# 3. 細胞非自律的な細胞機能制御

私は学生時代、二木史朗教授の御指導のもと、細胞移行性ペプチド(Cell-penetrating peptide、CPP)の細胞内移行機序の解明や CPP を用いた薬物送達手法の開発研究を行っていました。CPP といいますと、tatペプチドや penetratinペプチドがよく知られています。これらのペプチドは、それぞれヒト免疫不全ウイルスの TAT タンパク質、およびショウジョウバエのホメオタンパク質 Antennapedia が細胞内に移行する性質を有することが見出され、その後に細胞移行性を発揮するコア配列として同定されたものです。tatやpenetratinは、その優れた細胞移行性から、薬物送達のための細胞内デリバリーキャリアとして応用研究が盛んに行われており、ご存知の方も多いと思います。

TAT や Antennapedia といったタンパク質は、もともと細胞内で特定の DNA 配列に結合して遺伝子の転写を調節する転写調節因子です。1988年に Pabo らと Loewenstein らのグループが Cell 誌において TAT タンパク質の細胞移行性を初めて報告した論文では、

培養上清中のTATが細胞内に移行することだけでなく、細胞内移行したTATがHIV-1遺伝子の発現を顕著に活性化し、ウイルス産生を正に制御することが示されています<sup>2.3</sup>。また、ProchiantzらのグループはAntennapedia の細胞移行性および細胞外分泌を見出し<sup>4.5</sup>、個体発生初期においてAntennapedia が細胞間を伝播して伝播先の神経細胞で転写制御を行い、神経突起の伸長を制御するという可能性を示しています。これらの報告は、いずれも単に細胞移行性を有するタンパク質が見つかったということだけではなく、ある細胞内で働いているタンパク質が、別の細胞に伝播して機能を発揮することを示し、細胞非自律的な機能制御機構が多細胞生物個体内に存在する可能性を示唆しています。

そもそも多細胞生物は、機能の異なるヘテロな細胞 集団であるため、個体として生命活動を維持するため には、細胞同士が各々連携し、適切に情報をやり取り することが不可欠です。細胞間の情報伝達を担う因子 として、例えば神経伝達物質やペプチド・ステロイド ホルモンなどがよく知られています。これらの液性因 子は、分泌を目的として合成され、ある細胞から分泌 された後に、他の細胞膜表面や細胞質内の標的受容体 を介して細胞間の情報伝達を媒介します。

上述の TAT や Antennapedia で見られた細胞非自律 的な制御機構は、細胞間の情報伝達を媒介するという 点において、神経伝達物質やホルモンなどと同様の役 割を個体内で担うと考えられます。しかし、これらは それ自身が細胞間伝播することにより直接機能制御を 行うという様式の違いから, 本質的に異なる別の仕組 みであると考えられます。実は多細胞生物のなかでも 植物個体内では、細胞壁に囲まれた細胞内領域同士を つなぐ原形質連絡 (プラズモデスマータ) と呼ばれる 孔状構造物が存在し、 転写調節因子や核酸などが細胞 間を移動することで、細胞非自律的に機能制御を行 うことがすでによく知られています6。もしかしたら, 細胞移行性を発揮するタンパク質配列は、エクソソー ムなどの細胞外小胞と同様に、細胞間の細胞非自律的 な機能制御を可能とするために, 多細胞生物の動物個 体が独自に進化させた様々な情報伝達戦略のひとつに 相当するのかもしれません。

#### 4. おわりに

tat や penetratin などといった細胞移行性ペプチドは、どのように細胞内に移行するのか、配列や構造上の必要条件は何か、受容体は存在するのか、などといった細胞移行機序に関する基礎的な疑問が解明されつつあり、また薬物送達キャリアへの応用展開も進められています。言うまでもなく、これらの研究を強く支えてきたのは、ペプチド科学です。tat や penetratinペプチドの細胞内移行現象は、TAT や Antennapedia タンパク質が細胞間で行う情報伝達様式の一部分を切り取ったものであることから、ペプチド科学的アプローチが細胞非自律的な細胞機能制御機構の一端を解明することに大きく貢献してきたと考えることができます。今後、ペプチド科学を強力なツールとして活用し、伝播分子機序や生体内における生物学的意義に関する基礎的理解を深めるとともに、個体における細胞

非自律的な細胞機能制御機構の全容が解明されること を期待しています。

#### 参考文献

- 1. Takeuchi, T.; Suzuki, M.; Fujikake, N.; Popiel, H. A.; Kikuchi, H.; Futaki, S.; Wada, K.; Nagai, Y. Proc Natl Acad Sci U S A 2015, 112, E2497–506.
- 2. Frankel, A. D.; Pabo, C. O. Cell 1988, 55, 1189-93.
- 3. Green, M.; Loewenstein, P. M. Cell 1988, 55, 1179-88.
- 4. Joliot, A.; Pernelle, C.; Deagostini-Bazin, H.; Prochiantz, A. Proc Natl Acad Sci U S A 1991, 88, 1864–8.
- Dupont, E.; Prochiantz, A.; Joliot, A. J Biol Chem 2007, 282, 8994–9000.
- 6. Zambryski, P. Science 1995, 270, 1943-4.

たけうち としひで 大阪大学大学院医学系研究科 神経難病認知症探索治療学寄附講座 takeuchi@neurother.med.osaka-u.ac.jp http://www2.med.osaka-u.ac.jp/neurother/

ダイマー化によるペプチドの 自己集合特性への影響の解析: エラスチンペプチドダイマーの コアセルベーション特性

# 1. はじめに

この度, PNJ にペプチド研究について掲載する機会を頂いた九州大学基幹教育院・生体分子化学研究室の巣山慶太郎です。私は,九州大学の香月研究室で有機化学を学んだ経験を活かし1.2, 現在では,化学合成したペプチドを用いた研究を行って



巣山慶太郎

います。前号の PNJ No.100記念号では、現在までのペプチド研究界を支えてこられた先生方のペプチド科学に触れることができ、個人的に大変感動しておりましたが、その中に、私が博士時代に生物化学の研究でご指導頂いた下東康幸先生(九州大学名誉教授)の記事がありました。下東先生は2016年3 月をもって大学を定年・ご退職され、4月末には多くの先生方や門下の方々を集めて記念講演が行われたのが記憶に新しいところです。今回、そうした記念号・記念講演の直後に執筆の機会を頂き嬉しく思います。本稿では私が最近行っている「エラスチンペプチド」の研究についてご紹介したいと思います。

## 2. 弾性タンパク質・エラスチンとその特徴的な性質

「エラスチン」は血管や皮下組織、腱などに含まれる弾性タンパク質であり、組織に弾性・伸展性を与える役割を持ちます³。エラスチンは肌のハリ・美肌を保つ成分として注目されており、同様の素材として広く認知されている「コラーゲン」とともに、ここ数年で食品や化粧品、サプリメント医療用素材などの製品に利用されはじめています。

エラスチンは、前駆体タンパク質・トロポエラスチ ンがミクロフィブリルと呼ばれる糖タンパク質の周囲 に集合し架橋される、という過程を経て生合成されま す。この過程において、エラスチンの特徴的な性質で ある「コアセルベーション」が重要となります。コア セルベーションとは、温度を上げると凝集し下げると 再び解離するという可逆的な自己集合特性です。エラ スチンの均一な水溶液を加熱するとエラスチン分子が 自己集合して液滴を形成し、この状態で静置すると平 衡溶液とコアセルベート層に分離します。このプロセ スは可逆的であり、冷却することで最初の均一な溶液 に戻す事ができます。ところで、エラスチンは美肌成 分として「美容」の分野に、また血管や靭帯の弾力を 補うサプリメントとして「健康」の分野に利用されて いますが、コアセルベーション特性を応用すること で、薬物送達システムの担体として「医療」の分野へ の応用も期待されるようになりました。

# 3. エラスチンペプチドを用いたコアセルベーション分子機構の探求

これまでに、コアセルベーションにはエラスチンの 内部に存在する特徴的なアミノ酸数残基の繰り返し配 列(Val-Pro-Gly-Val-Gly, Gly-Gly-Val-Pro, Gly-Val-Gly-Val-Ala-Pro など) が関与していることが明らかになっ ています。また、これらのエラスチン由来繰り返し配 列を模倣したペプチドも同様に自己集合特性を持つこ とが報告されており、たとえば、エラスチン由来のポ リペプチド (VPGVG)』がコアセルベーションを示す ことが明らかとなっています⁴⁻。エラスチンペプチド は近年、その自己集合能がタンパク質性の分子素材に 付与する特性として注目されていること8や生体適合 性が高いことから医療分野への応用が期待されていま す。そのため、DNAを用いて大腸菌などで発現した ポリペプチド、固相合成により得られた短鎖のペプチ ドの双方を用いて、コアセルベーションを示すペプチ ドについての研究が行われています9,10。

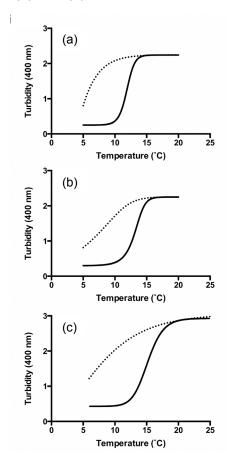
こうした中、我々の共同研究者であり、長年エラ スチンについて研究をされてきた前田衣織先生(九 州工業大学准教授) は、Val-Pro-Gly-Val-Gly (VPGVG) 繰り返し配列の最初のバリン残基を芳香族アミノ 酸 (Phe. Trp) に置換したペプチド・(FPGVG)。お よび (WPGVG)<sub>n</sub>が、15~25残基という極めて小さな 分子量でコアセルベーションを示すことを見出しま した11,12。我々は、このような低分子でコアセルベー ションを示すペプチドが分子素材として有用であるだ けでなく、これらの短鎖ペプチドのコアセルベーショ ンの分子機構を検証し、自己集合に関与する構造要因 を調べることが、エラスチンそのもののコアセルベー ションの分子機構を解明する一助となるのではないか と考えました。そこで、短鎖のエラスチンペプチドが コアセルベーションを示す分子機構の探求の一環とし て、ペプチドの自己集合性を調節する方法として用い られるダイマー化ペプチド13.14を用いた検証を行うこ とにしました。今回は、 芳香族アミノ酸含有ペプチ ド・(FPGVG)<sub>5</sub>および (WPGVG)<sub>3</sub>のダイマーを合成し、 そのコアセルベーション特性を調べることにより、自 己集合におけるダイマー化の影響および立体構造の解

図 1 エラスチンペプチド (FPGVG)<sub>5</sub>ダイマーの構造式 1; N-dimer, 2; C-dimer, 3; Reversed dimer

析を行いました15。

# 4. エラスチンペプチドのダイマー化によるコアセ ルベーション能の増強

まず、エラスチン由来ペプチド (FPGVG)5の末端に システイン残基を導入し、システイン側鎖間ジスル フィド結合を形成させることで架橋したダイマーペプ チドを調製しました(図1)。合成したペプチドのコ アセルベーション能力の評価は濁度測定法(ペプチド 溶液の温度変化に伴う濁度変化を追跡し、コアセル ベーションに伴って溶液が濁度変化を示した温度を 求める分析法)により行いました。濁度測定の結果, (FPGVG)5のモノマーペプチドは安定してコアセル ベーションを示すのに30 mg/ml の濃度, 38℃の温度 を要するのに対し、ダイマーペプチドは10 mg/ml と いう低濃度においても12~15℃という低温でコアセル ベーションを示すことが明らかになりました(図2)。 すなわち、ペプチドのダイマー化によってモノマーを 2倍量以上用いるよりも自己集合能が増強されること が判明しました。このように短鎖エラスチンペプチド を単純なジスルフィド結合で架橋させたペプチドが高 い自己集合活性を示すことを見いだしたことは新規な 知見です。さらには、Trp 残基を含む (WPGVG)3のダ イマーペプチドは、0.5 mg/ml という極めて低い濃度 でもコアセルベーションを示すことが明らかとなり、 エラスチン繰り返し配列の自己集合活性を低濃度で観



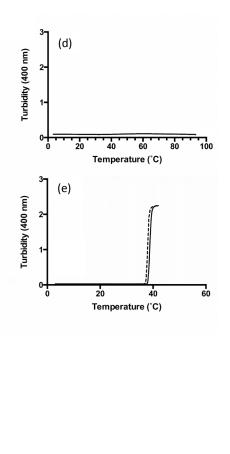


図 2 エラスチンペプチド (FPGVG)<sub>5</sub>ダイマーおよびモノマー水溶液の温度変化に伴う濁度変化 (実線は昇温時,破線は降温時の変化を示している)
(a) N-dimer (10 mg/ml); (b) C-dimer (10 mg/ml); (c) Reversed dimer (10 mg/ml); (d) (FPGVG)<sub>5</sub>モノマー (10 mg/ml); (e) (FPGVG)<sub>5</sub>モノマー (30 mg/ml)

察可能なモデルペプチドとして有用であることが判明 しました。

# 5. 温度変化に伴うエラスチンペプチドの構造変化 の解析

エラスチンペプチドの自己集合の駆動力は温度変化 に伴う分子間相互作用の変化によるものであると考え られるので、自己集合の前後でその相互作用変化の要 因となるペプチド分子の構造変化が存在すると推測さ れます。そこで、温度変化とペプチドの立体構造の関 係について調べるため、(FPGVG)5 および (WPGVG)3 のダイマーの CD スペクトル測定を行いました。その 結果. いずれのダイマーのスペクトルも (FPGVG)5モ ノマーのスペクトルと類似しており11. エラスチンペ プチドによく見られる II 型 β ターン様の構造<sup>16,17</sup>を有 することが示唆されました。また、CD スペクトルは 温度に依存して可逆的な変化を示し(図3). 加えて 212 nm に等吸収点 (isodichroic point) が観測されま した。等吸収点の存在はペプチドが二種類の状態をと ることを示すものであり18, これよりエラスチンペプ チドが溶液中で可溶構造から疎水的構造に遷移してい ることが示唆されました。

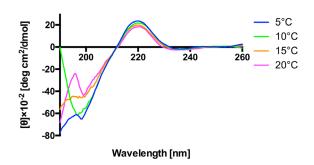
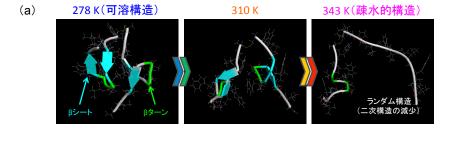


図 3 エラスチンペプチド (FPGVG)<sub>5</sub> N-dimer の CD スペクトル

この温度変化に伴うペプチドの構造変化について検証するため、高い自己集合活性を示す (WPGVG) $_3$ のダイマーペプチドを用いた分子動力学計算による構造解析を行いました。その結果、低温ではペプチド内部に特徴的な $_5$ りのに対し、高温では二次構造が減少してランダムな構造になるという結果が得られました(図4)。この二次構造の変化に伴う各残基の溶媒露出面積の変化を調べると、(WPGVG) $_3$ ダイマーでは疎水性残基の溶媒露出面積の温度上昇に伴う変化が顕著であり、温度上昇によってペプチドがランダム構造に変化することによる疎水性表面の伸長が高いコアセルベーション活性の要因であることが示唆されました。

#### 6. まとめ

本研究では、エラスチン由来ペプチド (FPGVG)<sub>5</sub>お よび (WPGVG)<sub>3</sub>をダイマー化することによってコアセ ルベーション能が著しく増強されることを明らかにし ました。また、CD スペクトル測定および MD 計算の 結果. ダイマーペプチドは低温では II 型 β ターン様 構造を含む可溶構造をとり、温度上昇に伴って疎水的 なランダム構造に遷移することがコアセルベーション の駆動力となることが示唆されました。これらのダイ マーペプチドの中でも (WPGVG)3ダイマーは極めて 低濃度でコアセルベーションを示すため、エラスチン ペプチドの自己集合形成過程の精細な評価が可能なモ デル分子として、 蛍光測定や粒径測定を実施していま す。一方、(FPGVG)<sub>5</sub>ダイマーはモノマーと比較して 高い自己集合活性を持ちながら、比較的高濃度でも水 に溶解させることができるため、取り扱いやすい有用 な素材としての利用価値があります。こうして、エラ スチンおよびエラスチンペプチドの研究は、エラスチ ンの自己集合特性の本質を探求する研究とエラスチン を素材として応用するための研究が相互に協調しなが ら進むことによって、理学的にも工学的にも大きな発



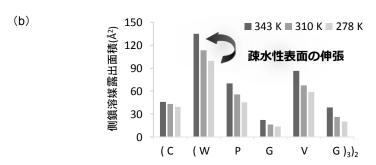


図4 MD 計算による (WPGVG)3ダイマーの温度変化に伴う立体構造解析 (a) 温度変化に伴う (WPGVG)3ダイマーの立体構造の変化; (b) 温度変化に伴う (WPGVG)3ダイマーの各残基の溶媒露出面積の変化

展を遂げることのできる分野であると考えています。 この興味深い分子を用いた研究がより進展していくた め、当研究室では理学の観点からさらなる研究を進め ていく予定です。

#### 参考文献

- Suyama, K.; Matsumoto, K.; Katsuki, T. Heterocycles 2009, 77, 817–824.
- Suyama, K.; Sakai, Y.; Matsumoto, K.; Katsuki, T. Angew Chem Int Ed 2010, 49, 797–799.
- 3. Daamen, W. F.; Veerkamp, J.H.; van Hest, J. C.; van Kuppevelt, T.H. Biomaterials 2007, 28, 4378–4398.
- 4. Maeda, I.; Taniguchi, S.; Ebina, J.; Watanabe, N.; Hattori, T.; Nose, T. Protein Pept Lett 2013, 20, 905–910.
- Kaibara, K.; Akinari, Y.; Okamoto, K.; Uemura, Y.; Yamamoto, S.; Kodama, H.; Kondo, M. Biopolymers 1996, 39, 189–198.
- 6. Maeda, I.; Fukumoto, Y.; Nose, T.; Shimohigashi, Y.; Nezu, T.; Terada, Y.; Kodama, H.; Kaibara, K.; Okamoto, K. J Pept Sci 2011, 17, 735–743.
- Iwanaga, A.; Endo, M.; Maeda, I.; Okamoto, K. Pept Sci 2007 2006, 290–291.
- 8. Brigida, B.; Antonietta, P.; Maria, C.; Nicolas, B.; Stephanie, Baud.; Manuel D. Soft Matter 2015, 11, 3385–3395.
- 9. Lakshmanan, A; Zhang, S.; Hauser, C. A. E. Trends Biotechnol 2012, 30, 155–165.
- 10. Collier, J. H.; Segura, T. Biomaterials 2011, 32, 4198-4204.
- 11. Maeda, I.; Taniguchi, S.; Watanabe, N.; Inoue, A.; Yamasaki, Y.; Nose, T. Protein Pept Lett 2015, 22, 934–939.
- 12. Taniguchi, S.; Watanabe, N.; Nose, T.; Maeda, I. J Pept Sci 2016, 22, 36–42.
- 13. Christopher, A.; Staffan, D.; Feng, Z.; Per, Ö.; Karin, E.; Haibin, S.; Daniel, A. Sci Rep 2015, 5, 14063–14072.
- 14. Thomas, F.; Boyle, A.L.; Burton, A. J.; Woolfson, D. N. J Am Chem Soc 2013,135, 5161–5166.
- 15. Suyama, K.; Taniguchi, S.; Tatsubo, D.; Maeda, I.; Nose, T. J Pept Sci 2016, 22, 236–243.
- 16. Urry, D.W.; Long, M. M. CRC Crit Rev Biochem 1976, 4, 1–45.
- 17. Urry, D.W.; Long, M. M.; Ohnishi, T.; Jacobs, M. Biochem Biophys Res Commun 1974, 61, 1427–1433.
- Holtzer, M.E.; Holtzer, A. Biopolymers 1992, 32, 1675– 1677.

すやま けいたろう 九州大学基幹教育院 生体分子化学研究室 suyama@artsci.kyushu-u.ac.jp http://biomolchem.artsci.kyushu-u.ac.jp/index.html

## 第53回ペプチド討論会

日時:2016年10月26日(水)~28日(金)

会場:京都テルサ(京都市南区東九条下殿田町70)

討論会ホームページ:

http://labo.kyoto-phu.ac.jp/yakuhin/jps53/

主催:日本ペプチド学会

共催:日本化学会·日本薬学会·日本農芸化学会·日本蛋白質科学会

### 討論主題:

- 1 アミノ酸およびペプチドの化学
- 2 生理活性ペプチドの単離,構造決定および合成
- 3 ペプチド合成の新規な戦略と方法論
- 4 ペプチドの構造 機能相関
- 5 ペプチドの医学・薬学的研究
- 6 ペプチドに関連したケミカルバイオロジー
- 7 ペプチドを用いる材料科学的研究
- 8 その他広くペプチド科学に関する研究

発表形式:口頭(英語・日本語)またはポスター 発表申込方法:ペプチド学会の討論会専用ページから の申込を予定

発表・要旨申込:

2016年7月1日(金)~8月26日(金)

#### 参加登録料:

事前登録 (7月1日 (金) ~9月23日 (金) まで)

一般:ペプチド学会員・共催学会員 6,000円

学生:ペプチド学会員・共催学会員 3,000円

非会員(一般)13,000円,非会員(学生)6,000円 当日申込は一般2,000円,学生1,000円高くなります。

懇親会 (予定):10月27日 (木) 19:00 京都テルサ 問い合わせ先:第53回ペプチド討論会事務局

〒607-8412 京都市山科区御陵四丁野町1

京都薬科大学薬品化学分野(担当者名:赤路健一)

TEL: 075-595-4635, FAX: 075-591-9900

E-mail: jps53@mb.kyoto-phu.ac.jp

# 第48回若手ペプチド夏の勉強会開催のお知らせ

2016年7月31日(日)から8月2日(火)までの2 泊3日で、第48回若手ペプチド夏の勉強会を東京都八 王子市にて開催いたします。今回の会場は、東京郊外 の自然豊かな場所にある「大学セミナーハウス(東京 都八王子市)」です(会場の収容人数の関係で開催場 所と日程を以前の案内から変更いたしました)。この 勉強会では、若手ペプチド研究者が中心となって、ペ プチド研究の基礎から始まりケミカルバイオロジー、 創薬などの高度な研究領域に挑戦している先輩先生方 との活発な討論を通じて、今後のペプチド研究を担う 若手研究者を育成することを目的としており、現在準 備を鋭意進めております。日々の研究の悩みを分かち 合い、大切な仲間を作ることができる貴重な場です。 皆様のご参加を楽しみにしております。

日時:2016(平成28)年7月31日(日)~8月2日(火)

場所:大学セミナーハウス

〒192-0372 東京都八王子市下柚木1987-1 TEL: 042-676-8511, FAX: 042-676-1220 URL : https://iush.jp/

(JR 八王子駅からバスで25分, 京王線北野駅からバスで15分)

ホームページ:

https://www.peptide-soc.jp/event/wakate/48/ 招待講演

伊東 祐二 先生 (鹿児島大学)

大河内美奈 先生(東京工業大学)

土井 隆行 先生(東北大学)

新井 亮一 先生(信州大学)

石川 文洋 先生(京都大学)

清中 茂樹 先生(京都大学)

古賀 信康 先生(分子化学研究所)

小松 晃之 先生(中央大学)

高山健太郎 先生(東京薬科大学)

出水 庸介 先生(国立医薬品食品衛生研究所)

留学体験記

森本 淳平 先生 (東京大学)

世話人:

瀧 真清(電気通信大学情報理工学研究科先進理 工学専攻)

後藤 佑樹 (東京大学 理学系研究科 化学専攻)

堤 浩(東京工業大学 生命理工学院)

(お問い合わせは E-mail: wakatepep48@gmail.com までお願い致します)

# 《平成28(2016)年度 年間行事予定》

平成28年7月31日(日)~8月2日(火)

第48回若手ペプチド夏の勉強会

場所:大学セミナーハウス (東京都八王子市)

世話人:瀧 真清(電通大)

堤 浩 (東工大)

後藤 佑樹 (東大院)

平成28年10月25日 (火) (予定) 第92回理事会·34回評議会合同会議

平成28年10月26日 (水) ~10月28日 (金)

第53回ペプチド討論会

場所:京都テルサホール(京都府京都市)

世話人:赤路 健一(京都薬大)

平成28年10月27日(木)(予定)

平成28年度日本ペプチド学会 通常総会

平成28年10月29日(土)

日本ペプチド学会市民フォーラム

場所:京都薬科大学(京都府京都市)

世話人:赤路 健一(京都薬大)

平成28年12月(未定)

第93回理事会

平成29年1月18日 (水) 第23回ペプチドフォーラム 場所:東京大学薬学系総合研究棟(東京都文京区)

世話人:相馬 洋平(東大院) 後藤 佑樹(東大院)

## 《平成28年度:主な海外シンポジウム》

平成28年9月4日(日)~9日(金)

34th European Peptide Symposium & 8th International Peptide Symposium

会場

Leipzig University (Leipzig, Germany)

ホームページ

http://www.34eps-2016.org/

発表申込

締切済

参加登録

Student, PhD (450 $\epsilon$ ), Academic Participant (650 $\epsilon$ ), Industrial Participant (750 $\epsilon$ )

## 編集後記

ペプチドニュースレター No.101をお届け致します。本号では「21世紀後半に向けたペプチド科学の展望」について、5人の若手ペプチド研究者にご寄稿いただきました。21世紀後半に向け、中心となってペプチド科学を牽引して頂きたい方々です。巻頭では野水基義先生に研究生活における「笑い」の大切さをご寄稿いただきました。ペプチド科学の発展のために学問の垣根を越えた相互の柔軟な対話の大切さを考えさせられました。笑いを足がかりに、皆様の幅広いペプチド共同研究が益々ご発展することをお祈り申し上げます。

(編集委員:保住建太郎)

# PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

株千里インターナショナル内

# 編集委員

林 良雄(担当理事)

(東京薬科大学薬学部薬品化学教室)

TEL · FAX 042-676-3275

e-mail: yhayashi@toyaku.ac.jp

中馬 吉郎 (新潟大学理学部化学科)

TEL 025-262-3130, FAX 025-262-6168

e-mail: chuman@chem.sc.niigta-u.ac.jp

中瀬 生彦 (大阪府立大学ナノ科学・材料研究センター)

TEL · FAX 072-254-9895

e-mail: i-nakase@21c.osakafu-u.ac.jp

保住 建太郎 (東京薬科大学薬学部)

TEL · FAX 042-676-5670

e-mail: hozumi@toyaku.ac.jp

北條 恵子 (神戸学院大学薬学部分子薬学部門)

TEL 078-974-4005, FAX 078-974-5689 e-mail: hojo@pharm.kobegakuin.ac.jp

(本号編集担当:保住建太郎)