



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.104

2017年 4 月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

次世代がん医療創生に向けた がん選択的吸収性ペプチドの開発

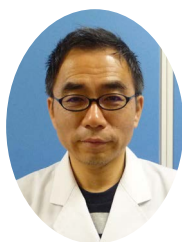
はじめに

私の専攻は病理学ですが、病理診断や基礎病理学研究を行いながら、常々何か患者さんに直接役立つ医療技術的な研究にも携わってみたいという望みが頭の片隅にありました。病理専門医として病理学所属でこのような研究を行っている者は珍しく、本稿に述べるような医療技術研究は病理学会でも見られず、私の研究演題は学会でもカテゴリー分類が難しいと聞かされたこともあります。しかし、逆にそれは私のポジティブなモチベーションとなり、分野に拘らず意欲さえあれば自由に研究を展開できること、医療においては必ず自己の専門分野と連関があることを確信しながら今日も仕事を進めています。本稿で紹介するのは、がん細胞に高吸収性を示すバイオツールとしてのペプチドで、ペプチドの生体応用における長所に着目して立ち上げてきた研究の経過です。ペプチドは「からだにやさしく、生体利用において大きなポテンシャルを持つツール」であることを活かして、この点に自信をもって研究を続けています。

特に、我々がランダムペプチド・ライブラリーから分離した腫瘍系統別に高度吸収性を発揮する新規ホーミングペプチドは、次世代がん医療への応用が可能な生体低侵襲性検査・診断技術や革新的ドラッグデリバリーシステムの構築を目指して開発を進めています。

細胞膜透過ペプチドについて

ペプチドは数個から数十個のアミノ酸の連続体からなる小分子で、体内でもインスリン・ペプチドなどに代表されるように実際に産生されており、きわめて多彩な生理機能を担う生体の恒常性維持に必須の分子群です。このようなペプチドの中で、生理的に体内で産生されるこれらペプチドとは別に、新たにここ15年程の研究の進展により大きく注目されているのが、細胞膜透過ペプチド (cell-penetrating peptide: CPP) です。細胞透過性タンパクの存在はペプチドの形でなくタンパク分子総体として比較的早くからありましたが、ペプチドフォームでの機能の実証は、1999年の Dowdy らによる Tat ペプチドの報告が基盤となっており¹、同報告を起爆剤として現在まで多種多様な CPP の発見の報告がなされています (表1 参照)。CPP の由来



近藤 英作

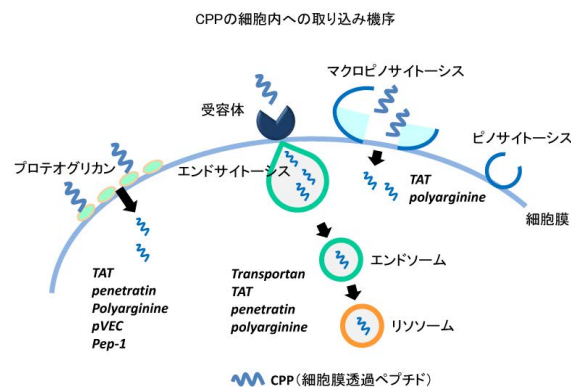
は多岐の生物種にわたっており、Tat¹やペネトラチン (Penetratin)²などウイルスやショウジョウバエ由来のアミノ酸配列、または人工的に合成された配列であるポリアルギニン³が今日でも実験学的応用性の高さから多分野の研究で頻繁に用いられています。これらの CPP に共通した性質として、生体を構成する多種類の正常細胞系および腫瘍細胞系への取り込みが起ること、マクロピノサイトーシスやエンドサイトーシスという細胞生理学的分子機序を介して認められること (図1)、すなわち、細胞内への吸収に際しては有意な細胞傷害性を惹起しないということ、また、生化学的特徴として、アミノ酸配列にアルギニンやリシンなどの塩基性アミノ酸残基の構成比が高いことなどが判ります。一方、制がんを目的とする CPP の応用においては、これら多分野で有用な CPP は逆に不都合であり、標的外の多様な正常細胞系への吸収が起こり

表1 様々な細胞内タンパク質 (遺伝子) 機能を制御するペプチドの報告例

既知の細胞膜透過性ペプチド (CPP)

CPP	アミノ酸配列	由来
Tat	YGRKKRPQRRR	HIV-1 Tat
gp41 fusion seq.	GALFLGWLGAAGSTMGA	HIV-1 env. gp41
Penetratin	RQIKIWFEQNRRMKWKK	pAntp(43-58)
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINKALAALAKKIL	人工配列 CPP
MAP	KLALKLALKALKALKLA	model amphipathic peptide
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	人工配列 CPP
Prion	MANLGWLLALFVTMTDVLGCK	N-term(1-28) of prion protein
SV40	PKKKRKV	SV40 NLS
ポリアルギニン	R ₄₋₁₆	アルギニン連続体

雑誌「生化学」89-1号より表を一部改変



雑誌「生化学」89-1号より図を一部改変

図1 CPPの細胞生理学的な取り込み機序

得ます。このような観点から、我々は制がん医療に向けた新たな CPP の必要性を考え、悪性腫瘍を特異的に標的可能な CPP の開発を企図する研究に着手しました。

腫瘍ホーミングペプチド

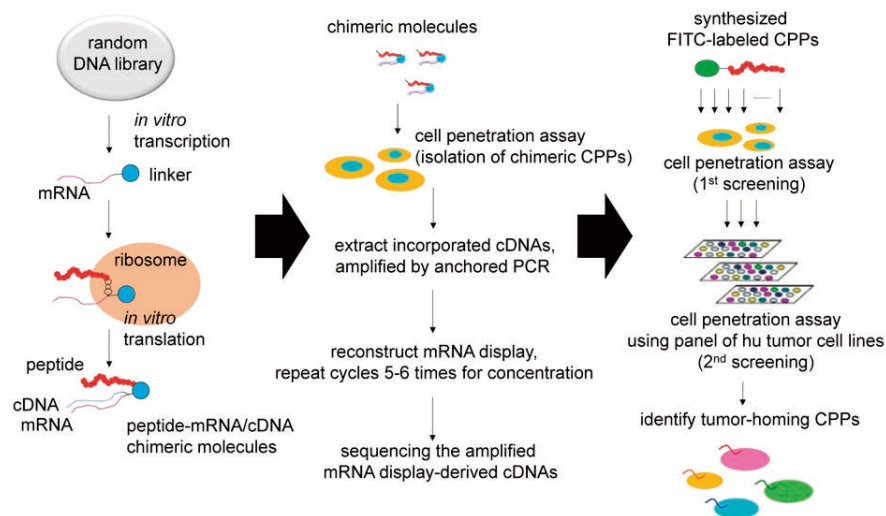
先述したように従来の CPP はその大半がウイルスなどの微生物あるいはショウジョウバエなどの既知のタンパク質の一部配列に見いだされたものですので、可溶性リガンドやサイトカインのレセプターによる認識配列部分を取り込みに利用する方法も考えられますが、要求するアミノ酸配列の絞り込みに労力を要し、また立体構造から案出されるペプチド鎖長が数十残基と長めになる可能性が考えられます。我々はランダムペプチドライブラリーから目的性能を持つ短鎖長の人工配列ペプチドを新規に分離することを方針として新規 CPP の分離にチャレンジしました。この際、ランダムペプチドライブラリーの作製には数種類の方法が考えられますが、CPP を分離するには小分子量核酸-ペプチド・キメラ分子より構成される mRNA ディスプレイ法が最適であると考えました。理由は、ファージディスプレイやリボソームディスプレイでは、提示されるペプチドに大分子のファージやリボソームが結合した状態で細胞透過型 CPP を同定しなければならない不合理性を回避するためです。mRNA ディスプレイでは、ライブラリー構成分子は非常にシンプルなフォームで、ランダム RNA とその配列に対応付けられたアミノ酸配列のみから成る小分子となります。この方法により作製されるランダムペプチドライブラリーをソースに用いて、図2に示すような工程で標的とするヒト悪性腫瘍細胞（がん細胞）を設定し、この細胞への吸収を反復して目的物を含むペプチド群が濃縮された CPP ライブラリーから最終的に候補ペプチド配列を約50~100配列程度得ていきます。次に、合成した候補ペプチド配列を FITC（あるいは FLC）で蛍光標識を施した合成ペプチド単体に戻して、標的腫

瘍系および非腫瘍性（正常）細胞系を含めた多種類ヒト培養細胞パネルを用意し、細胞透過アッセイにて良好な選択的吸収を示すもの数種類に絞りこみます（図2）。さらに最終的に、標的系統腫瘍細胞を移植した担がんマウスモデルへの *in vivo* 投与の結果から最適なペプチドを同定する、という多段階ステップを踏んで最も優秀な性能の CPP を選び出していきます⁴。このステップで、標的とするヒト腫瘍細胞系統に高度にシフトした吸収性を発揮する特殊な機能性ペプチドの候補が得られ、我々はこれらのペプチドを“腫瘍ホーミングペプチド”と命名しました。このシステムから得られるペプチドを構成するアミノ酸残基数については、ライブラリー設計時に自由に調節できますが、我々はこれまで最長15アミノ酸から最短9アミノ酸までの短鎖ペプチドとしています。

腫瘍ホーミングペプチドの応用

ライブラリーから分離した最適の選択的吸収性を発揮するペプチドの応用性については、いくつかの用途が考えられますが、一つは、生体における特定系統の悪性腫瘍の検知技術への応用、すなわち、PET などによる画像イメージング検査や多様な部位に応用される各種内視鏡検査時の腫瘍病巣可視化への応用が考えられます。そこで、まず生体内腫瘍のイメージングについての事例を紹介します。

多様な各系統のヒト悪性腫瘍移植による異所性マウスモデルに対して、それぞれの腫瘍系統に最適の高吸収を示す腫瘍ホーミングペプチドの中から、移植腫瘍系統にマッチする蛍光標識（FITC 標識）型のホーミングペプチドを尾静脈から投与し体内腫瘍への集積性・描出性を検証しました。蛍光ペプチド投与1時間から2時間後に担がんマウスを安楽死させ、実体顕微鏡下で解剖し、即時、蛍光の分布を調べた結果を図3に示しました。その結果、腫瘍系統に対応して最適の選択的高吸収性を発揮するホーミングペプチドを適用した場合、各種系統の悪性腫瘍が形成した多発性の転



Kondo et al. *Nature Commun.*, 3:951-963, July17, 2012.より図を改変

図2 mRNA ディスプレイによる腫瘍ホーミングペプチドの分離の流れ

移巢を各ペプチドではほぼ網羅的に可視化できました。ヒト急性骨髄球性白血病（AML）細胞を異所性移植した急性白血病移植モデルマウスでは、白血病ホーミングペプチド（CPP44: KRPTMRFRYTWNPMK）は、マウスの体内レベルで腹膜播種を起こした1 mm以下、直径約200~300 μ mの腫瘍病変の描出まで良好なことが判明しました（図3）。また、ヒト患者由来初代培養大腸腺がん細胞移植マウスにおいては、蛍光標識大腸がんホーミングペプチド（CPP2: DSLKSYWYLQKFSWR）の集積を証明する局在的蛍光シグナルが、横隔膜多発転移巣とともに、モデルマウスにおける一般的な消化器がん転移の初期形成部位である大網部に発生した約10 mm径の腫瘍部および1 mm以下の小腫瘍病巣においても比較的明瞭に認められました。この他、ヒト胃がん（MKN28）移植モデルにおける胃を包含するがん浸潤巣、肝細胞がん（KYN-2）の肝門部微小転移巣、膵がん（浸潤性膵管がん BxPC3）の膵~胃周囲浸潤巣が、それぞれのがん系統に最適の吸収性を示すホーミングペプチドを投与することによって描出可能でした。これらの各腫瘍ホーミングペプチドの性能上の一つの特徴として、標的とする腫瘍病巣をいずれも周囲非腫瘍組織と一定のコントラストを保持しながら検出できた点があげられます（図3）。

さて、もう一つの代表的なユーティリティとして、これらペプチドを各種の形態の機能性分子（抗ガン剤、核酸、タンパク等）のキャリアとするドラッグデリバリーシステム（DDS）への応用が考えられます。我々はこのコンセプトを予備的に実証するために、特定の腫瘍系統にシフトした効率的吸収性を発揮する腫瘍ホーミングペプチドと増殖抑制性に働くオリゴペプチド配列を連続した抗腫瘍ペプチドを試作し、体内で標的腫瘍の抑制が可能であるかを検証してみました。具体例として、生体内で非常に増殖活性の高いヒト急性骨髄球性白血病（AML）を標的と

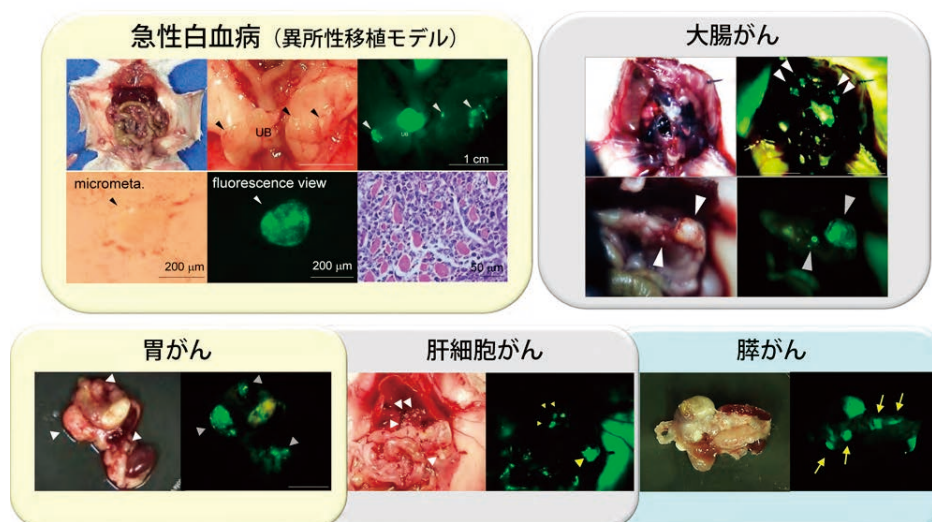
して、AML細胞透過性ホーミングペプチドに、がん抑制遺伝子 *p16^{INK4a}* の機能を代償する短いアミノ酸配列⁵を融合したがん抑制遺伝子機能回復型の増殖抑制ペプチド CPP44-p16MIS（KRPTMRFRYTWNPMK-GPG-FLDTLVVLHR-GP-RRRR）の *in vivo* 投与実験を例示します。ペプチド配列の“KRPTMRFRYTWNPMK”部分は急性骨髄性白血病に高透過性を示すホーミング配列部分、GPG配列はスペーサー、FLDTLVVLHR部分はD. Laneらが同定したがん抑制遺伝子 *p16^{INK4a}* の機能を代償する配列部分⁵、RRRR部分は親水化タグ配列です。

投与モデルとして尾静脈経由でヒト患者由来AML細胞を移植した全身播種型のAML担がんマウスを作製しました。このAML細胞はdoubling timeが12時間以下と強力な増殖活性を有し、移植後7日を経過して十分に全身各臓器に浸潤を開始した同マウスにCPP44-p16MISペプチドを1回300 μ gの用量で間歇的に計4回反復して静脈投与した実験では、肺浸潤・転移巣や心筋浸潤巣の有意な抑制結果を得ました（図4、注：GFP恒常発現型AML細胞を移植したため、蛍光励起下で、体内の転移・増殖病巣の形成を可視化し評価できる）⁴。これは、コントロールマウスにおける体内病変分布・発育状態との比較から、体内で上記の抗腫瘍ペプチドがCPP部分の機能を活かしAML病巣に高度に集積した状態が反映されたものと考えられました。顕微鏡による詳細な評価では、腫瘍細胞巢の駆逐とともに、脳・肝・腎・消化管などを含めた各種臓器における非腫瘍性（正常）の組織部に対する傷害性は病理組織学的にほとんどみられませんでした。

おわりに：腫瘍ホーミングペプチド開発研究の目指すところ

最近、医学領域研究では医工薬などの多分野（異分野）融合や産学連携形態の研究推進が図られ、技術の融合による総力的な医学薬学研究が進められつつあ

ペプチドを選んで体内に発生する多様な難治がんを検知可能

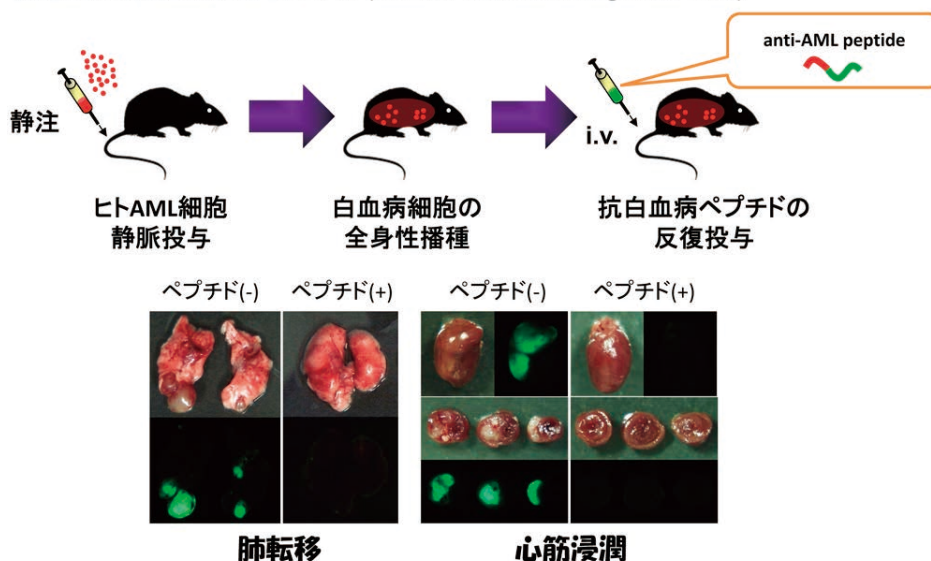


Kondo et al. *Nature Commun.*, 3:951-963, July17, 2012.より図を改変

図3 腫瘍ホーミングペプチドの細胞透過アッセイによる候補の絞り込み

急性白血病標的抗腫瘍ペプチドの生体内効果

急性骨髄球性白血病移植モデル (human AML cells-xenografted mice)



Kondo et al. *Nature Commun.*, 3:951-963, July17, 2012より図を改変

図4 各種腫瘍系統に最適のホーミングペプチドを用いた生体内腫瘍病巣のイメージング
Kondo, E., et al. (2012) *Nat. Commun.*, 3, 951-963より図を改変。

る。新しい DDS コンセプトについてはその実効性の証明が次世代医療候補として求められているのが現状ですが、まず何より多くの研究者の勇気あるチャレンジが大切であろうと考えます。ナノメディシン領域では、医療ツールとして「ナノ分子」による革新的な DDS の構築が図られており、現在さまざまな DDS 開発の研究が進行しています。具体的に医療への応用が検討されているナノ・バイオツールとして、本邦でもリポソーム、デンドリマー、ナノミセル、グリカンなどが研究され、また、payload 側の機能性ナノ分子として抗体医薬、siRNA、miRNA、アンチセンス、LNA (locked nucleic acid) などの核酸医薬、組換えウイルスなどによる研究が行われています。小分子サイズであるペプチドも、有力なナノレベルのバイオツールと考えられ、DDS キャリア、機能制御ツール、治療・検査診断用医薬としてなど幅広いポテンシャルを持ち、医療における多彩な応用が期待されています。特に、その長所として、生体低侵襲性で吸収・代謝に優れ、異物反応が低いという“からだにやさしい”点が医療上人体への適用に大きなアドバンテージがあります。しかし、同時にペプチドが持つ弱点として、体内安定性（変性が急速である）の問題、コストの問題なども存在することも事実であり、解決の求められている課題です。

我々が本稿に紹介した“腫瘍ホーミングペプチド”は、現在本邦における主要疾患の第一位を占める悪性新生物（悪性腫瘍）に対する新たな低侵襲医療技術の一手を目指して進めている研究ですが、我々は何よりもがん患者のための実効的な医療技術の基盤的部分での貢献を目指して日々努力していきたいと考えています。

本稿を終えるにあたり、これまでのわたしたちの研究に惜しみないご協力をくださった研究機関の諸先生方、企業の皆さまに謹んでこの場を借りて深謝申し上げます。

参考文献

1. Nagahara, H.; Vocero-Akbani, A.M.; Snyder, E.L.; Ho, A.; Latham, D.G.; Lissy, N.A.; Becker-Hapak, M.; Ezhevsky, S.A.; & Dowdy, S.F. *Nat. Med.* 1998, 4, 1449-1452.
2. Derossi, D.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *Trends Cell Biol.* 1998, 8, 84-87.
3. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 5836-5840.
4. Kondo, E.; Saito, K.; Tashiro, Y.; Kamide, K.; Uno, S.; Furuya, T.; Mashita, M.; Nakajima, K.; Tsumuraya, T.; Kobayashi, N.; Nishibori, M.; Tanimoto, M.; Matsushita, M. *Nat. Commun.*, 2012, 3, 951-963.
5. Fähræus, R.; Láin, S.; Ball, K.L.; Lane, D.P. *Oncogene*, 1998, 16, 587-596.

こんどう えいさく
新潟大学大学院医歯学総合研究科・
分子細胞病理学分野
ekondo@med.niigata-u.ac.jp

遺伝暗号の拡張による非天然アミノ酸の導入

1. 遺伝暗号の拡張

すべての生物に共通したセントラルドグマでは、DNA上の遺伝暗号がRNAへ転写された後、20種類のアミノ酸からなる多種多様なタンパク質へ翻訳されている。遺伝暗号の拡張は、この過程で通常用いることのできる20種類のアミノ酸の制限を超えて、様々な非天然アミノ酸をタンパク質へ部位特異的に導入することを可能にする。



芳坂 貴弘

遺伝暗号の拡張には、終止コドン、4塩基コドン、センスコドン、人工塩基コドンを用いることができる。終止コドンとしては、主にアンバーコドンUAGが用いられている¹。これはまず、遺伝子上で非天然アミノ酸導入部位のコドンをアンバーコドンに置換しておく。一方、相補的なアンチコドンCUAを持つtRNA（これをアンバーサプレッサー tRNAと呼ぶ）に対して化学的あるいは酵素的に非天然アミノ酸でアミノアシル化する。翻訳中にmRNA上のアンバーコドンがアンバーサプレッサー tRNAに読み取られると、その部位に非天然アミノ酸が導入された完全長タンパク質が得られることになる（図1）。ただしこの際、翻訳系に存在する終結因子がUAGを競合的に認識するため、翻訳が途中で停止した短いタンパク質も副生してしまう。

筆者らが開発した4塩基コドン²も原理はほぼ同様であるが、複数の非天然アミノ酸の導入が可能になるなどのメリットがある。遺伝子上に導入された4塩基コドンは、相補的なアンチコドンを持つtRNAによって非天然アミノ酸へ翻訳される。この際、通常のアミノアシル tRNAが3塩基として翻訳する過程が競合するが、その場合は読み枠が1塩基ずれ、いずれ下流に現れる終止コドンによって翻訳が停止する。そのため、終止コドンの場合と同様に非天然アミノ酸が導入された場合のみ、完全長タンパク質が生成することになる。4塩基コドンとしては、比較的使用頻度の低いコドン（レアコドンあるいはマイナーコドン）に1塩基付加した配列が選択される。これは、レアコドンを読み取るtRNAの存在量は相対的に低いいため、3塩基としての翻訳を避けて非天然アミノ酸の導入効率を上げる効果がある。実際に様々な4塩基コドンを試したところ、CGGGやGGGUなどによってアンバーコドンよりも効率良く非天然アミノ酸を導入できる

ことが明らかになっている³。ただし、導入効率は用いるtRNAの種類にも大きく依存しており、筆者らは*Mycoplasma capricolum*由来のTrp tRNAを用いることで、アンバーコドンによる導入も4塩基コドンと同程度に効率化できることを明らかにしている⁴。

また筆者らは、様々な側鎖構造を持つ非天然アミノ酸の導入を検討して、フェニルアラニンのパラ位置置換体が翻訳系の基質として効率良く取り込まれることを見い出している⁵。この知見に基づいて、翻訳系に取り込まれうる非天然アミノ酸を設計・合成して、実際に蛍光基などの比較的大きな分子構造であってもタンパク質に導入することに成功している⁵。なお、幾つかの非天然アミノ酸については、4塩基コドン用tRNAおよびアンバーサプレッサー tRNAがプロテイン・エクスプレス社から市販されており（http://www.proteinexpress.co.jp/products/clover_direct）、フナコシ社を通じて購入できる。

センスコドンに対する非天然アミノ酸の導入は、再構成型無細胞翻訳系（PUREsystem）において特定のアミノ酸を加えないことで、天然アミノ酸と競合することなく行うことができる。すなわち、あるアミノ酸を添加しない無細胞翻訳系において、そのコドンに対応する3塩基アンチコドンのtRNAを非天然アミノ酸でアミノアシル化しておくことで、そのコドンを非天然アミノ酸へ翻訳することができる。このような系は、複数の非天然アミノ酸を含む短いペプチドライブラリーにおいて特に有用であり、ペプチド医薬のリード化合物探索に応用されている⁶。

人工塩基コドンでは、初期にはisoC-isoG塩基対が報告され、その後y-s塩基対などの転写・翻訳可能な塩基対を含む人工コドンが開発されている⁷。多種類の非天然アミノ酸をコード化できる可能性があるものの、特殊ヌクレオチドを用いる必要があるため、現在までのところ一般的に利用されるには至っていない。

2. 非天然アミノ酸の二重導入

上記の各種手法の中でも、4塩基コドンを用いることは、タンパク質に2種類の非天然アミノ酸を導入する上で特に有用である。これは、2種類の4塩基コドン、あるいは4塩基コドンとアンバーコドンを組み合わせることで行うことができる。

この手法の応用例としては、タンパク質へ2種類の蛍光標識アミノ酸を部位特異的に導入して、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を計測することが挙げられる。カルモジュリンの2カ所に、2種類のBODIPY蛍光基を側鎖に持つ非天然アミノ酸を導入した場合、

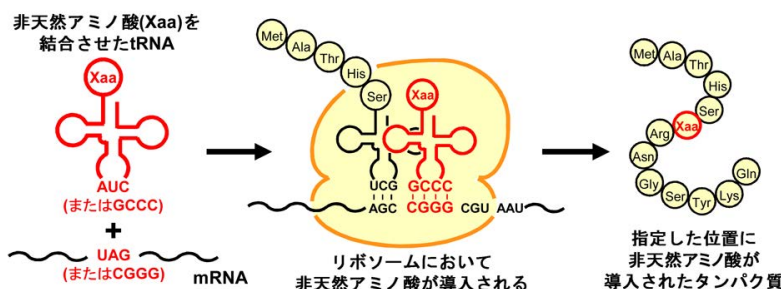


図1. アンバーコドンおよび4塩基コドンを用いた非天然アミノ酸のタンパク質への導入

基質ペプチドの結合に伴うカルモジュリンのコンフォメーション変化を、2カ所の距離の変化に基づくFRET効率の変化として検出することができた(図2)⁵。

また、1つの蛍光標識アミノ酸の導入により、基質の結合によって蛍光強度変化を示すタンパク質が得られた場合に、さらにFRETのドナーとなる蛍光標識アミノ酸を導入することで、基質の結合によって蛍光レシオを変化させることも可能になる。一本鎖抗体断片(scFv)のN末端部分に蛍光標識非天然アミノ酸を導入した場合、抗原の結合により蛍光強度が増加する現象が見い出されている⁸。これは抗体断片の重鎖と軽鎖の界面に存在するTrp残基が抗原非結合時には一部露出して蛍光基を消光するが、抗原の結合によりTrpが界面内部に埋もれて、消光が解消されるためだと推測されている。しかし1波長の蛍光強度変化では、抗体自体の濃度変化と区別することができず、細胞イメージングなどへの応用は難しい。そこで、C末端側にFRETのドナーとなる別の蛍光標識非天然アミノ酸を導入することで、抗原の結合により2波長の蛍光強度比を変化させることができた⁹。これは、C末端の蛍光基からN末端の蛍光基へFRETが起こるが、N末端の蛍光基は抗原結合に依存して蛍光消光が起こるため、結果的に2種類の蛍光基の蛍光強度比を変化させることができた(図3)。

その他にも、蛍光標識アミノ酸と人工機能アミノ酸を二重導入することで、機能化と蛍光検出能を併せ持つ人工タンパク質を合成することができる。光架橋性アミノ酸や光異性化アミノ酸を蛍光標識アミノ酸とともに抗体に導入した場合、光応答性を発現させつつ、抗原結合活性を蛍光により検出できている。

また、非天然アミノ酸の多重導入は、ペプチドライブラリーにも有用である。Puromycinを用いたmRNAディスプレイに応用した場合、3種類の4塩基コドンとアンバーコドン埋め込んだランダム配列から、4種類の非天然アミノ酸を加えたペプチドライブラリーを作製して、実際にタンパク質に結合する非天然アミノ酸含有ペプチドを得ることができた(図4)¹⁰。

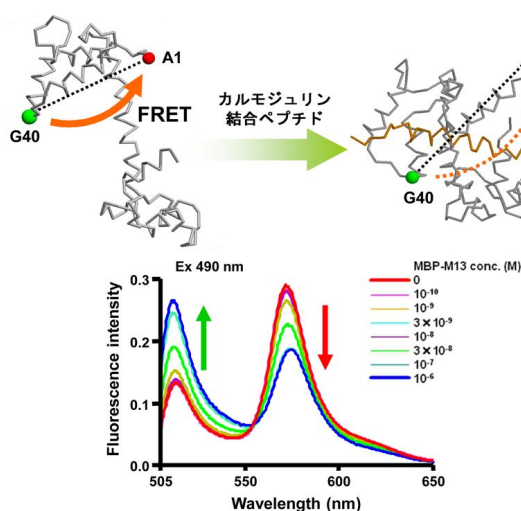


図2. 蛍光標識非天然アミノ酸を二重導入したカルモジュリンのFRET変化

3. アミノアシル tRNA 合成酵素変異体を用いた細胞内での非天然アミノ酸の導入

非天然アミノ酸の導入は、当初は無細胞翻訳系を用いる必要があったが、合成収量が低いなどの課題もあった。一方、非天然アミノ酸に対するアミノアシル tRNA 合成酵素変異体を用いることで、細胞内で非天然アミノ酸の導入を行うことも可能になっている。例えば、メタン産生古細菌 *Methanococcus jannaschii* 由来 Tyr-tRNA 合成酵素のアミノ酸結合部位にランダム変異を加えてスクリーニングを行うことで、各種 Tyr 類似体に対するアミノアシル tRNA 合成酵素が開発されている¹¹。これを、*M. jannaschii* 由来アンバーサブ

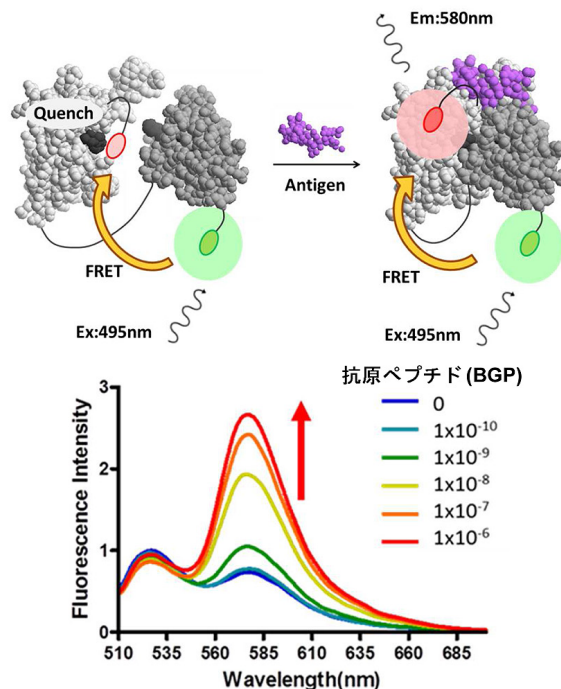


図3. 蛍光標識アミノ酸を二重導入した scFv の FRET および抗原依存的蛍光消光に基づく抗原の蛍光レシオ検出

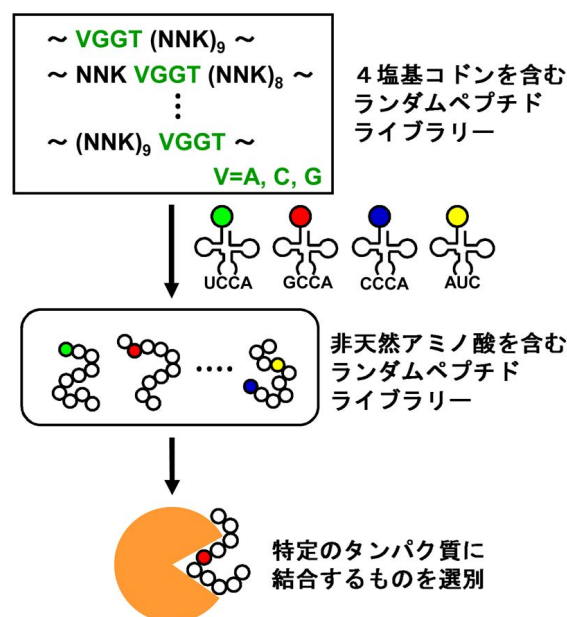


図4. 非天然アミノ酸を多重導入したペプチドライブラリー

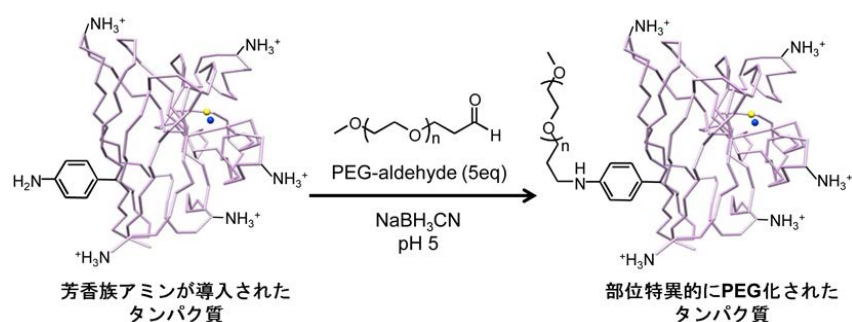


図5. 芳香族アミンが導入されたタンパク質の部位特異的 PEG 化

レッサー tRNA と、アンバーコドンを組み込んだ発現遺伝子とともに大腸菌内で共発現させることで、非天然アミノ酸導入タンパク質を大量発現させることが可能である。また、メタン産生古細菌 *Methanosarcinae* 由来のピロリジン-tRNA 合成酵素の変異体を用いることで、各種修飾リジン誘導体などの導入も行うことができる¹²。

筆者らは阪大の松浦友亮先生と共同で、アミノアシル tRNA 合成酵素のランダム変異体のスクリーニングを、無細胞翻訳系を内包したリボソームを用いた *in vitro* セレクションにより行う手法を開発している¹³。まず、ピロリジン-tRNA 合成酵素由来の Lys(Z)-tRNA 合成酵素遺伝子にランダム変異を加え、アンバーサプレッサー tRNA、アンバーコドンを導入した GFP 遺伝子、非天然アミノ酸 Lys(Z) とともに、再構成型無細胞転写・翻訳系に混合してリボソーム内へ封入した。続いて、リボソーム内で転写・翻訳を行った後、アンバーコドンが Lys(Z) に翻訳されて完全長 GFP を発現したリボソームを、セルソーターを用いて分離した。得られたリボソームのプールからアミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子を回収し、このサイクルを数回繰り返した結果、実際に大腸菌内で Lys(Z) の導入効率を向上させるアミノアシル tRNA 合成酵素変異体を取得することができた。

細胞内での非天然アミノ酸導入法は、特異的な化学修飾反応と組み合わせ、近年広く利用されつつある。アジドとアルキンを用いた Click chemistry はその代表であり、例えばアジド基を側鎖に持つ非天然アミノ酸を導入しておき、アルキン誘導体とカップリングさせることで、部位特異的な蛍光標識などを行うことができる¹⁴。

筆者らは、芳香族アミンに着目して高選択・高効率な化学修飾を試みている。芳香族アミンは pKa (～5) がタンパク質に存在する脂肪族アミンと比べて低く、pH5程度の弱酸性中でも脱プロトン化して求核性を保持している。その状態で、アルデヒドを用いた還元的アルキル化を行うと、Lys 側鎖や N 末端のアミノ基は反応せずに、芳香族アミンのみを反応させることができる。実際に、大腸菌中でアミノフェニルアラニンなどの芳香族アミンを含む非天然アミノ酸をタンパク質に導入しておき、精製後、ポリエチレングリコールのアルデヒド誘導体により還元的アルキル化を行うと、芳香族アミン特異的かつ90%以上の高効率でタンパク質の修飾を行うことができた(図5)。このような手法は、スケールアップも容易であり、医療・

産業面へ非天然アミノ酸導入タンパク質を応用する上で特に有用である。

4. おわりに

筆者は20年以上に渡りこの研究に携わっているが、有機化学と遺伝子工学の融合領域であり、やや特殊な実験手法を必要としたことから、初期には研究者は限られていた。しかし近年、特にバイオ分野の研究者が多く参画するようになってきたが、これは細胞内でのアミノアシル tRNA 合成酵素変異体を用いる手法が確立され実験が容易に行えるようになったことが大きい。しかし有用な非天然アミノ酸の種類は依然として限られており、本研究の一層の発展のためには、化学の視点に立って有用な非天然アミノ酸を設計することが、今後も引き続き求められよう。

参考文献

1. Noren C. J. et al. Science 1989, 244, 182-188.
2. Hohsaka T. et al. J Am Chem Soc 1999, 121, 34-40.
3. Hohsaka T. et al. Biochemistry 2001, 40, 11060-11064.
4. Taira H. et al. Biochem Biophys Res Commun 2008, 374, 304-308.
5. Kajihara D. et al. Nat Methods 2006, 3, 923-929.
6. Hipolito, C. J.; Suga, H. Curr Opin Chem Biol 2012, 16, 196-203.
7. Hirao I. et al. Nat Biotechnol 2002, 20, 177-182.
8. Abe R. et al. J Am Chem Soc 2011, 133, 17386-17394.
9. Yoshikoshi K. et al. Bull Chem Soc Jpn 2016, 89, 573-580.
10. Muranaka N. et al. Nucleic Acids Res 2006, 34, e7.
11. Wang L.; Schultz P. G. Angew Chem Int Ed 2005, 44, 34-66.
12. Fekner T.; Chan M. K. Curr Opin Chem Biol 2011, 15, 387-391.
13. Uyeda A. et al. ChemBioChem 2015, 16, 1797-1802.
14. Lang K.; Chin J. W. Chem Rev 2014, 114, 4764-4806.

ほうさか たかひろ
北陸先端科学技術大学院大学
先端科学技術研究科 マテリアルサイエンス系
hohsaka@jaist.ac.jp

イネ α -アミラーゼとコメ品質

新潟大学自然科学系（農学部）の三ツ井敏明と申します。新潟大学理学部の中馬吉郎先生からお誘いいただき、ペプチドニュースレター読者の皆様には馴染みが薄い農学分野のお話ですが、折角の機会ですので寄稿させていただきました。



三ツ井敏明

1. はじめに

澱粉は陸上植物に普遍的に、そして豊富に存在する貯蔵多糖です。植物における澱粉代謝の研究は発芽穀類種子において精力的に行われました。この澱粉分解に関与する酵素は種々のアミラーゼであり、なかでも中心的な役割を果たしているのが α -アミラーゼです。 α -アミラーゼは分泌性酵素であり、発芽穀類種子では胚盤上皮細胞およびアリュエロン層（糊粉層）細胞において合成され、澱粉貯蔵組織である胚乳に分泌されます¹。オオムギ種子アリュエロン層における α -アミラーゼ発現の研究はジベレリンやアブシジン酸といった植物ホルモンによる遺伝子転写調節において大きく進展し、一方、イネ種子胚盤の α -アミラーゼについては分泌性糖タンパク質の生合成、細胞内輸送並びに分泌制御という観点を中心に研究が繰り返されました²。このように穀類 α -アミラーゼは分泌性酵素としての機能発現制御の研究が行われてきました。しかし、最近の研究からイネ α -アミラーゼを含むいくつかの糖タンパク質が分泌経路から葉緑体やアミロプラスト等のプラスチドに輸送、局在化することが示されました³⁻⁶。イネの分泌性酵素 α -アミラーゼがプラスチドで機能するという事実は、澱粉代謝に関わる生理現象の新たな理解につながるものと考えています。

近年の地球温暖化は我が国の作物生産に深刻な影響を及ぼしはじめています。新潟県においては2010年夏季の記録的な猛暑によって白濁粒が多発し、米の一等米比率が激減する問題が生じました。一等米比率の低下はコメ生産農家の収入減にとどまらず、長期的には産地のブランドイメージの毀損を招きかねないことから、今後とも予測される夏場の猛暑への対応は喫緊の課題となっています。玄米の白濁化は様々な要因が複雑に絡み合っておりと考えられていますが、異常な澱粉粒形成によって生じたものであり、登熟中の澱粉代謝異常が主な原因であることを疑う余地はありません。本稿では、イネ α -アミラーゼについてその細胞生物学に関する新発見および米の品質との関わりを中心に紹介します。

2. イネ α -アミラーゼの構造生物学

イネの主要な α -アミラーゼアイソフォーム AmyI-1 は他の穀類 α -アミラーゼには見られない *N*-結合型糖鎖を持つ分泌性糖タンパク質です。AmyI-1は、小胞体においてポリペプチド合成が行われ、その合成途中に糖鎖付加が起こり、ゴルジ装置で糖鎖修飾を受けた後、細胞外へ放出されます。私達は、特徴的な構造を持つと考えられる AmyI-1の X 線結晶構造解析を試み、

AmyI-1の立体構造を2.2Å分解能で解くことに成功しました⁷。AmyI-1は、Glycoside hydrolase ファミリー13に属する α -アミラーゼにおいて高度に保存されている (β/α)₈barrel 構造を有していました。AmyI-1と既報のオオムギ由来 α -アミラーゼ (AMY1) の立体構造を比較したところ触媒ドメインには大きな構造の相違はありませんでしたが、しかし私達は、活性部位から離れた澱粉結合部位 (Trp-301-Trp-302) が酒石酸や内毒素との相互作用に関与することを見出しました。内毒素は、細菌の細胞壁を構成する主要な成分であり、グラム陰性菌のリボ多糖とグラム陽性菌のリポテイコ酸が知られています。これらは細胞が破壊されると大量に放出され、ヒト体内に入ると細胞や組織の炎症などを誘発します。このように澱粉結合部位が澱粉以外の物質との結合に関与することが明らかになってきました。また、AmyI-1の Asn-263, Thr-307, Asn-342, Pro-373, Ala-374などのアミノ酸残基から構成される *N*-結合型糖鎖の結合部位近傍では、両 α -アミラーゼ間の立体構造に相違が認められました。これらの残基はAMY1では保存されていないことから、AmyI-1に対する糖鎖付加と糖鎖構造を含む立体構造の維持に必要であることが示唆されました。これらの知見はイネ α -アミラーゼの生理学的機能の理解をさらに深めるものと考えています。

3. イネ α -アミラーゼの細胞生物学

高等植物の生細胞における澱粉代謝の場合は葉緑体やアミロプラストなどの細胞内小器官（プラスチドと総称される）の中です。分泌性酵素 AmyI-1の発現抑制および強発現する形質転換イネ植物を解析したところ、発芽イネ種子胚乳（死細胞）だけでなく、緑葉などの生細胞でも AmyI-1が澱粉分解に関わっていることが示されました。しかし、この実験結果は細胞生物学的に大きな矛盾を含んでいました。すなわち、分泌性糖タンパク質である AmyI-1がプラスチド内における澱粉代謝に関与するののかという疑問です。そこで、細胞分画による局在性の検証、抗 AmyI-1抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察、並びに AmyI-1 に GFP を連結した融合タンパク質遺伝子 AmyI-1-GFP を導入したイネ細胞の共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察により、AmyI-1が確かにプラスチドに局在することが確認されました。次に、AmyI-1のプラスチドへの輸送経路について検討しました。AmyI-1は分泌性糖タンパク質として知られていることから、AmyI-1が分泌経路からプラスチドに輸送されるか否かを調べるため、小胞体-ゴルジ装置間の輸送小胞形成に必要な G タンパク質である ARF1 および SAR1 のドミナント変異遺伝子を用いて解析しました。AmyI-1-GFP と共にドミナント変異遺伝子を導入して小胞体-ゴルジ装置間の輸送を抑えたところ、AmyI-1-GFP のプラスチド局在は観察されなくなり、GFP 蛍光は小胞体ネットワーク状の分布を示しました。このことにより AmyI-1のプラスチド局在化には小胞体-ゴルジ装置間の輸送が不可欠であることが明らかになりました。さらにゴルジ装置からプラスチドへの輸送経路の存在について調べました。ゴルジ体マーカーとしてトランスゴルジ膜局在シリアルトランスフェラーゼ (ST) と赤色蛍光タ

ンパク質 (*mRFP*) との融合遺伝子 *ST-mRFP* を用い、プラスチドマーカ *WxTP-GFP* と共発現させて観察しました。*AmyI-1* を強発現させた細胞においては高頻度に *ST-mRFP* 蛍光が *WxTP-GF* で可視化されたプラスチドに検出されました。加えて、*AmyI-1* のプラスチド局在化には澱粉結合部位 (Trp-301-Trp-302) が重要な役割を果たしていることが分かりました。以上の結果から、高等植物細胞においてゴルジ体からプラスチドへの膜交通が存在すると結論されました (図1)⁶。この発見から私達は高温ストレスによる玄米の白濁化メカニズムのヒントを得たわけです。

4. イネ α -アミラーゼの異常発現は米品質に影響する

うるち玄米の整粒は豊満で左右・上下均整の取れた形で、側面の縦溝が浅く全体が透明で表面が光沢を持ちます。澱粉顆粒は複粒構造を示し、空隙は殆ど見られません (図2A)。しかし、稲体が開花・登熟期に異常高温に晒されると白濁粒が多発します。高温ストレスは玄米の一部に澱粉集積の不良な箇所を生じさせ

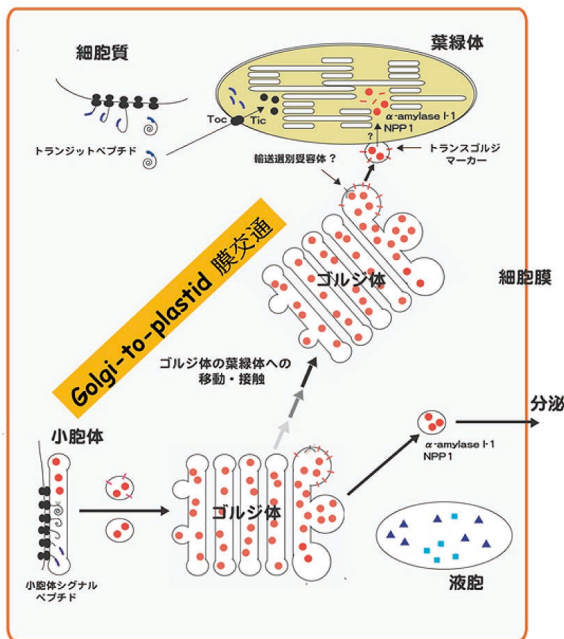
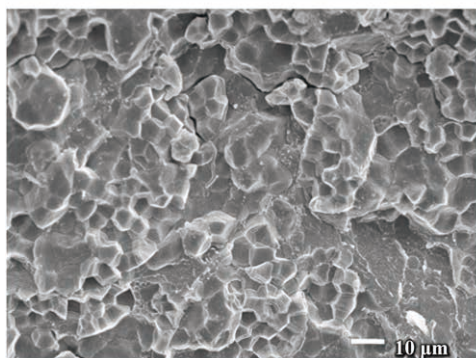


図1: *AmyI-1* は分泌経路からゴルジ体を介してプラスチドに輸送・局在化する。

(図2B), 澱粉顆粒表面の小さな凹みや顆粒間にできた隙間で光が乱反射することによって、玄米のその部分が白く濁り不透明になります。玄米の白濁部位、すなわち腹部 (胚のある面)、背部 (胚の反対側の面)、基部 (胚の隣接部)、中心部に白濁が見られるものを、それぞれ腹白、背白、基白、心白粒等と呼んでいます。

私達は、様々な環境条件で発生する白濁粒の局所プロテオーム解析を進めています。新潟県三条市で2009年度 (登熟期平均温度: 24.4℃) と2010年度 (28.0℃) に収穫されたコシヒカリを用いて玄米白濁部位とそれと同じ整粒の部位のプロテオームを調べました。夏季に猛暑となった2010年度産の白濁粒は2009年度産のそれに比べて粒サイズはそれほど差異がないが、千粒重は8%強の低下が見られました。整粒については粒重・サイズの年度間差異は殆ど認められませんでした。2009整粒, 2009白濁粒, 2010整粒, 2010白濁粒からタンパク質を7 M 尿素, 2 M チオ尿素, 3 % (w/v) CHAPS, 1 % (v/v) Triton X-100, 10 mM DTT を用いて抽出し、エンドペプチターゼ Lys-C およびトリプシンで処理後、生じたペプチドを iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) 標識し、質量分析 (LTQ-Orbitrap XL) に供しました。iTRAQ 標識を用いたショットガンプロテオミクス解析では、938個のタンパク質が同定され、平温および高温登熟で生じた白濁部位において61個のタンパク質において2倍以上の発現変動が観察されました⁸。特徴的なプロテオームの変化としては、高温登熟によって生じた2010白濁粒において一連の熱ショックタンパク質 (HSP81-3, HSP70, HSP18.1, HSP17.9, HSP16.9) が顕著に増加していました。熱ショックタンパク質の発現誘導は熱ストレス応答の鍵となるものであり、2010白濁粒が強く高温ストレスに反応していることを示しています。別の見方としては、2010整粒が高温ストレスを感知していないとも言えます。水ストレス応答に関与することが示唆されている LEA (Late Embryogenesis Abundant) タンパク質についても興味深い挙動が観察されました。検出された LEA タンパク質の殆どが白濁粒で、特に、2010白濁粒での蓄積が見られました。2010整粒と2009整粒との比較から、LEA タンパク質の発現誘導は白濁粒特有の現象であると考えられます。また、プロヒビチンは2010白濁

A: 整粒 (中心部)



B: 白濁粒 (白濁部位)

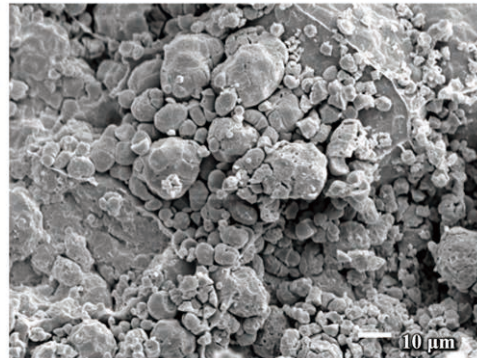


図2: 走査電子顕微鏡を用いた整粒と白濁粒における澱粉顆粒構造の比較

粒において蓄積していましたが、2009白濁粒では減少していました。プロヒビチンはミトコンドリアシャペロン活性を含む多様な機能を有し、エネルギー代謝に関する熱耐性に関わるという報告があります。

最も特徴的なプロテオーム変化としては澱粉代謝系酵素が挙げられます。2010白濁粒において澱粉結合型澱粉合成酵素 GBSSI や枝作り酵素 BEIIb が若干減少する一方で、 α -アミラーゼ Amy3E (AmyII-3) の顕著な蓄積が観察されました。2009白濁粒においてもその程度は弱まるが類似の発現変動が見られました。少し話が横道に逸れますが、プロテオーム解析において比活性の高い α -アミラーゼはその量的な問題から検出されづらい例の1つです。今回の玄米プロテオーム解析での AmyII-3 の検出・定量は非標識ペプチドでは検出限界以下となりましたが、しかし、iTRAQ 標識を用いると高感度に AmyII-3 の検出することができました (図3)。iTRAQ 標識によるペプチドの検出感度上昇の好例と言えます。白濁部位における α -アミラーゼタンパク質の増加は特異抗体を用いたイムノブロッティングによっても確認されました。興味深いことに、平温登熟と高温登熟で生じた白濁部位の α -アミラーゼアイソフォームの発現パターンは異なっていました⁸。したがって、平温登熟と高温登熟における玄米の白濁化には異なる α -アミラーゼアイソフォームが関与するものと推察されます。

高温登熟による胚乳組織における澱粉集積に関わる酵素の機能低下がいくつかの研究グループによって捉えられています。澱粉枝付け酵素 (BEIIb) 遺伝子の発現量が異なる一連の BEIIb 遺伝子欠損変異体・形質転換体を用いて、その澱粉顆粒形成が調べられ、澱粉顆粒形成異常の主な原因は BEIIb の機能低下であると報告されました⁹。また、イネの枝付け酵素活性の温度依存性が調べられ、BEIIb の最適温度は25℃であり、温度上昇による失活が最も著しいことが示されました^{2,4}。これらの結果から、高温登熟による枝付け酵素の活性低下が澱粉顆粒構造の変化の原因であると結論されました。しかし、近年、澱粉顆粒の形成異常の発生に澱粉分解酵素が関わっていることを示す報

告がなされました。浅妻ら¹⁰は、 α -アミラーゼ遺伝子 *AmyI-1* (*Amy1A*) および *AmyII-4* (*Amy3D*) を強発現プロモーターを用いて発現させ、登熟適温下で栽培、収穫した玄米の外観品質を調べたところ、白濁粒の多発が見られました。高温登熟による玄米白濁化に α -アミラーゼの働きが関わっているか否かをさらに検証するため、 α -アミラーゼ発現抑制体を用いた解析が行われました。いくつかの α -アミラーゼ発現抑制系統を解析したところ、 α -アミラーゼ遺伝子群の発現抑制の程度に応じて、高温登熟による白濁粒の発生が減少することが認められました¹¹。

種々の解析結果から、イネ登熟期に高温ストレスを受けると登熟種子中の α -アミラーゼの働きが強まることによって玄米の白濁化が助長されと考えられます。一方で、高温登熟による澱粉合成能の低下が澱粉分子構造そして顆粒形成に影響することも間違いありません。しかし、澱粉分子の鎖長構造に顕著な変化が見られない温度条件でも澱粉顆粒の形成異常が観察されます。おそらく澱粉合成と分解のバランスが重要であり、相対的に澱粉分解方向に傾くことによって澱粉顆粒の形成異常が起こるものと推察されます。玄米の白濁化は、腹部、背部、基部、中心部等に局所的に発生するが、それぞれの局所発生メカニズムはまだ良く分かっていません。やはりそれぞれの胚乳組織部位における澱粉合成と分解の機能のバランス異常によるものと考えられます。

玄米の白濁化は澱粉代謝系ではない酵素・機能タンパク質の発現異常によっても起こります。例えば、GLUTELIN PRECURSOR MUTANT6 (GLUP6)¹² や GLUTELIN PRECURSOR ACCUMULATION 3 (GAP3)¹³ などがあげられます。GLUP6 や GAP3 はゴルジ体から液胞への貯蔵タンパク質の輸送に関わる因子です。加えて、イネオートファジー変異体 *Osatg7*¹⁴ においても白濁粒が生じます。オートファジーは、細胞が持っている細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つです。このように玄米の白濁化は極めて複雑であり、今後、様々な視点での詳細解析が必要であることは言うまでもありません。現在、私達の研究

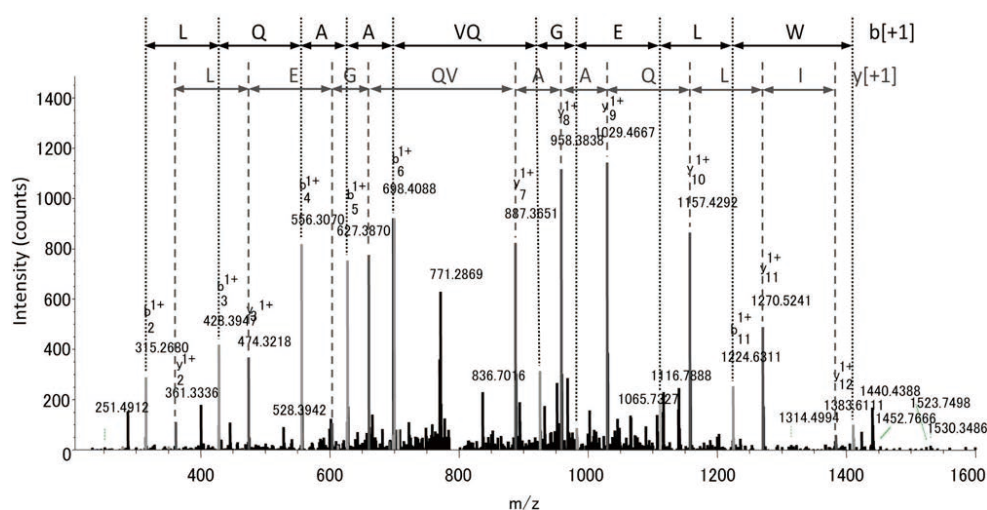


図3：高温登熟によって生じた乳白部位のショットガンプロテオミクス解析によって検出された代表的な AmyII-3 ペプチドの MS/MS スペクトル
質量分析装置, LTQ Orbitrap XL; 検出ペプチド数, 14; 配列カバー率, 18.31%; スコア, 51.37

室では、高温登熟による玄米のペプチド・ドーム・デグラドームの変化を探っています。

5. おわりに

玄米の白濁化メカニズムは、最終的には澱粉の合成・分解バランス異常による澱粉顆粒の形成不全によるものでありますが、様々な因子が関わり、そして多様な経路が複雑に絡み合っており、その詳細は依然として不明な点が多々残されています。澱粉集積の誘導期である開花から登熟期初期の間は高温ストレスの感受性が高く、この期間に異常高温に晒されると高温被害米の発生が著しく増えます。登熟期初期の高温ストレス処理によって子実プロテオームは大きく変化しており、登熟のためのプログラムの乱れが生じ、修復できずに登熟・成熟が進むために澱粉顆粒の形成不全が起こるのかもしれません。私達は、 H_2O_2 シグナルが高温登熟性の鍵因子の1つ¹⁵と考えていますが、玄米の白濁化メカニズムをさらに深く理解し、高温登熟性を効率的に改善する戦略を提案したいと考えています。

参考文献

1. Akazawa, T. et al. The Biochemistry of Plants Vol. 14, Academic: New York, 1988; Chapter 11.
2. Mitsui, T. et al. Trends Plant Sci 1997, 2, 255-261.
3. Asatsuma, S. et al. Plant Cell Physiol 2005, 46, 858-869.
4. Villarejo, A. et al. Nat Cell Biol 2005, 7, 1224-1231.
5. Nanjo, Y. et al. Plant Cell 2006, 18, 2582-2592.
6. Kitajima, A. et al. Plant Cell 2009, 21, 2844-2858.
7. Ochiai, A. et al. Biosci Biotechnol Biochem 2014, 78, 989-997.
8. Kaneko, K. et al. Rice 2016, 9, 26.
9. Tanaka, N. et al. Plant Biotechnol J 2004, 2, 507-516.
10. Asatsuma, S. et al. J Appl Glycosci 2006, 53, 187-192.
11. Hakata, M. et al. Plant Biotechnol J 2012, 10, 1110-1117.
12. Fukuda, M. et al. Plant Physiol 2013, 162, 663-674.
13. Ren, Y. et al. Plant Cell 2014, 26, 410-425.
14. Kurusu, T. et al. Autophagy 2014, 10, 878-888.
15. Shiraya, T. et al. Plant Biotechnol J 2015, 13, 1251-1263.

みつui としあき
新潟大学 教育研究院 自然科学系
生命・食料科学系列
t.mitsui@agr.niigata-u.ac.jp
<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~nkariwa/>

新しい細胞膜透過ペプチド 『ポリヒスチジンペプチド』

1. はじめに

新潟大学・中馬吉郎先生からペプチドニュースレター寄稿のお話をいただき、この度本稿を執筆させていただくことになりました。このような貴重な機会をいただきましたことを、厚く御礼申し上げます。



岩崎 崇

私は2009年に筑波大学・生命環境科学研究科にて山川稔教授のもと学位を取得し、2010年に鳥取大学農学部に着任いたしました。鳥取大学農学部は講座制ではないため、一教員として研究室を持たせていただいております。研究室立ち上げの初期は、大学のシステムにも不慣れで、教育・研究の両面で苦心することも多くありましたが、同学部の河野強教授の多大なるご支援のもと、今日では研究室を軌道に乗せることができております。

私の学生時代の研究テーマは、抗菌性ペプチドが生体膜に与える影響の研究でした。また、学生時代にペプチド学会の先生方には大変お世話になりましたので、引き続きペプチド討論会には参加し続けたいと考えておりました。このような背景から、鳥取大学で新しい研究テーマを立ち上げる際に、『ペプチド』と『膜』という二つのキーワードを軸に研究展開を試みました。その過程におきまして、新しい細胞膜透過ペプチドとして『ポリヒスチジンペプチド』を発見し、現在では研究室の主軸テーマとして展開するに至っております。そこで本稿では、ポリヒスチジンペプチドの発見の経緯から現在得られている研究成果の一部についてご紹介させていただきたいと思います。

2. ポリヒスチジンペプチド発見の経緯

細胞膜透過ペプチド (CPP: Cell-penetrating peptide) は核酸やタンパク質の細胞内輸送キャリアーとして、現在幅広い分野で利用されています。近年、100種を超える CPP が報告されており、これらはアルギニンやリジンといった塩基性アミノ酸を豊富に含有することが知られています。代表的な例として Penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK-NH₂)¹, HIV-Tat (48-60) (GRKKRRQRRRPQ-NH₂)², Octa-arginine (R8) peptide (RRRRRRRR-NH₂)³ などが世界的に有名な CPP として挙げられます。これらの CPP は生理的条件下で高密度の正電荷を帯び、細胞表面の負電荷を帯びた糖鎖と相互作用することにより、細胞膜を透過することが知られています⁴⁻⁶。すなわち、CPP にとって正電荷は重要な driving force であると考えられています。

一方で話は変わりますが、腫瘍組織では無秩序な血管・組織形成が行われるため、その内部が低酸素状態 (Hypoxia) にあることが知られています。ゆえに、腫瘍組織の内部では嫌気呼吸が亢進し、酸性代謝産物が蓄積していることが分かっています。そのため、腫瘍組織内部は低 pH (弱酸性) 環境にあることが知られています^{7,8}。近年では、この腫瘍組織内部の微小環

境である低 pH 環境を標的とした薬物輸送技術の開発が盛んに進められています。

そこで我々は、この『低 pH 環境』を標的とした『CPP』を開発することで、『腫瘍組織に選択的な CPP』をつくれるのではないかと考え、研究テーマを立ち上げました。低 pH 環境を標的とした CPP を設計するにあたり、我々は低 pH 環境で限定的に機能発現をする CPP の設計を目指しました。前述の通り、CPP の原動力は正電荷であることが広く知られておりますので、低 pH 環境で限定的に正電荷を帯びるペプチドを設計することができれば、低 pH 選択的な CPP として機能するのではないかと考えました。そこで、我々は低 pH 選択的な CPP を設計するために、ヒスチジンを利用することにしました。ヒスチジンは側鎖にイミダゾール基を有しており、側鎖の解離定数 (pK_a) が 6.04 であるため、生理的 pH 条件下では電荷的に中性である一方で、低 pH 条件下では正電荷を帯びる性質を有しています。ゆえに、ヒスチジンを低 pH 応答性のトリガーとして利用することで、低 pH 選択的に正電荷を帯びるペプチド（すなわち、低 pH 選択的な CPP として期待されるペプチド）を開発できると考えました。そこで、我々は、ヒスチジン残基のみから構成される様々な鎖長のポリヒスチジンペプチド (PHP: Poly-histidine peptide) を合成し、pH 環境と電荷と細胞膜透過能の関係性を調べることにしました (図 1a)。

最初に、HepG2 (ヒト肝癌細胞株) を用いて、生理的 pH 条件 (pH7.4) と低 pH 条件 (pH6.0) における PHP の細胞膜透過を調べました。その結果、面白いことに、PHP を構成するヒスチジン残基数が増えるにしたがって PHP の細胞膜透過能は上昇し、ヒスチジン 16 残基 (H16 peptide) においてピークに到達することが明らかになりました。さらに予想外であり、

かつ極めて興味深いことに、PHP の細胞膜透過は生理的 pH 条件 (pH7.4) および低 pH 条件 (pH6.0) において、ほとんど差がないことが分かりました (図 1b)。PHP は生理的 pH 条件 (pH7.4) ではほとんど正電荷を帯びない一方で、低 pH 条件 (pH6.0) においては高い正電荷を帯びるペプチドです。しかし、pH 条件 (正電荷の有無) に関係なく、PHP は細胞膜透過を示したことから、PHP は正電荷に依存しない CPP であることが明らかになりました。すなわち、低 pH 選択的な CPP を開発するという当初の目的は果たせませんでした。従来、CPP とは異なる新しいタイプの CPP として PHP を発見するに至りました。

続いて、PHP の細胞選択性を明らかにするため、当研究室で保有している様々なヒト培養細胞株を用いて実験してみたところ、PHP は RERF-LC-AI (ヒト扁平上皮肺癌細胞) や HT1080 (ヒト線維肉腫細胞) といった細胞株に対して、特に高い細胞膜透過を示すことが分かりました。そこで以降の研究では、H16 peptide を代表的な PHP として用い、HT1080 細胞を標準細胞株として使用することで、PHP の分子輸送能を解明することにしました。

3. PHP の高分子輸送能

PHP の薬物輸送技術への応用を志向して、PHP のひとつである H16 peptide について、分子輸送能の解明を試みました。まず、H16 peptide のタンパク質輸送能を明らかにするために、RFP (赤色蛍光タンパク質) に H16 peptide を融合した RFP-H16 を遺伝子工学的手法により調製しました。この過程において、(当然と言えば当然なのですが) RFP-H16 は抗 His-tag 抗体を用いた Western blotting により検出が可能であることや、Ni 固定化樹脂を用いたアフィニティー精製

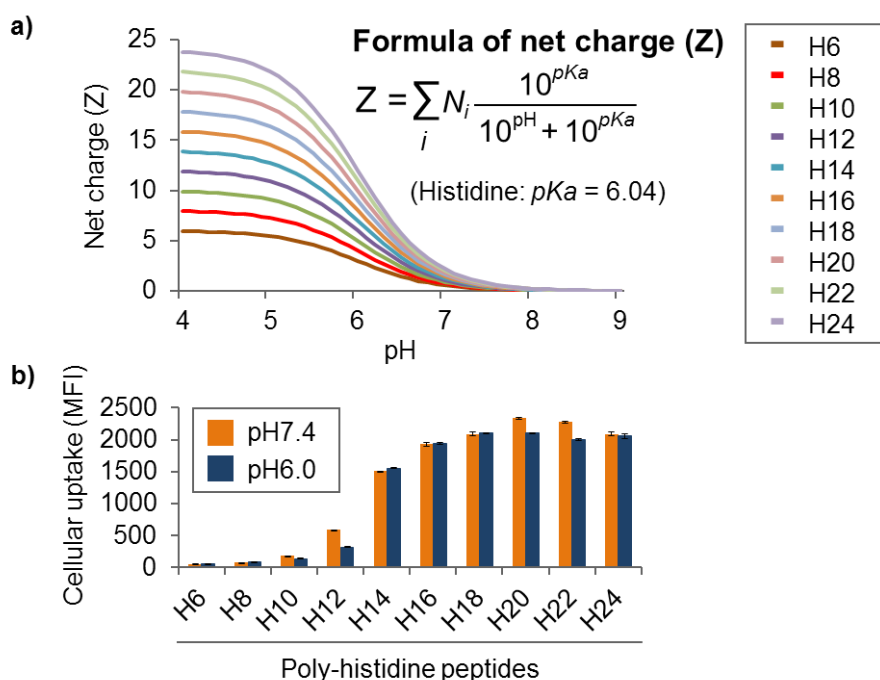


図 1 (a) PHP の鎖長と pH 環境と電荷 (Z) の相関図、(b) 生理的 pH 条件 (pH7.4) および低 pH 条件 (pH6.0) における PHP の細胞膜透過、Tetramethylrhodamine 標識した PHP の細胞膜透過をフローサイトメーターにより定量解析した。

により単離できることが確認されました。さらに、精製した RFP-H16 を HT1080 細胞に投与したところ、細胞内に移行することが確認されました (図2a)。すなわち、H16 peptide をタンパク質に融合することで、簡便な検出・精製・細胞内導入が可能であることを示すことができました。

我々は次に、より高分子であり、また薬物輸送キャリアーとしても利用されているリポソームに着目し、H16 peptide のリポソーム輸送能について評価しました。まず、リポソーム表面に H16 peptide を効率的に修飾するために、Stearyl 基を修飾した Stearyl 化 H16 peptide (以下 STR-H16 と呼称する) を合成しました。次いで、Fluorescein (緑色蛍光色素) を内包したリポソーム {DOPC : Cholesterol = 10 : 1 (mol/mol), 粒径約 100 nm} を調製し、このリポソームに対して STR-H16 を処理しました。リポソームの脂質二重層の疎水領域に Stearyl 基を導入することで、リポソーム表面に H16 peptide を表出した H16 peptide 修飾リポソーム (以下 H16-Lipo と呼称する) を調製しました。H16-Lipo の細胞膜透過を調べたところ、リポソーム表面に導入する STR-H16 の量に比例して、H16-Lipo の細胞膜透過量が増加することが確認されました (図2b)。このことから、H16 peptide は粒径約 100 nm 程度のリポソームであれば、細胞内へ輸送する能力を有していることが確認されました。H16-Lipo の細胞内分布を調べてみたところ、H16-Lipo は細胞内でゴルジ体やリソソームに集積することが分かりましたので、現在はゴルジ体/リソソームを標的とした薬物輸送に H16-Lipo を役立てられないか研究を進めています。

4. PHP の *in vivo* 腫瘍ターゲティング能

ここまで、PHP の *in vitro* における研究成果をご紹介

してきましたが、*in vivo* ではどのような挙動を示すのか? という疑問が湧きました。そこで、次に我々は PHP (特に H16 peptide) の生体内挙動を明らかにすることにしました。まず H16 peptide が高い選択性を示した HT1080 細胞をマウスに移植し、胆癌マウスを作製しました。次いで Dylight750 (近赤外蛍光物質) 標識した H16 peptide と代表的な CPP である R8 peptide を、それぞれ尾静脈注射により胆癌マウス体内に投与しました。経時的な生体内挙動を観察したところ、R8 peptide と H16 peptide の両者は生体内投与後に速やかに腎排出されたのに対して、H16 peptide のみは腫瘍部位に対して顕著な集積を示すことが確認されました (図3a)。さらに興味深いことに、H16 peptide を生体内投与してから 132 時間が経過した後においても、腫瘍部位に H16 peptide が残留していることが確認されました。

生体内において H16 peptide が安定した残留性を示すことができる理由については、H16 peptide の血清に対する非感受性が関与しているのではないかと考えています⁹⁻¹¹。実は、H16 peptide は血清存在下においても阻害効果を受けることなく、血清非存在下とほぼ同じ細胞膜透過を示すことが *in vitro* において確認されています (図3b)。この特性ゆえに、H16 peptide は生体内から排除されにくく、安定した生体内残留性を示していると我々は考えています。この点に関しましては、まだ確認しなければならないことがいくつかありますが、以上の結果から H16 peptide は生体内において腫瘍 (線維肉腫) に対する有力な薬物輸送キャリアーになり得る可能性が示されたと言えます。

5. 植物細胞に対する PHP の細胞膜透過

これまでの研究から、PHP は多彩な応用性を秘めている CPP であることが確認されました。しかし、

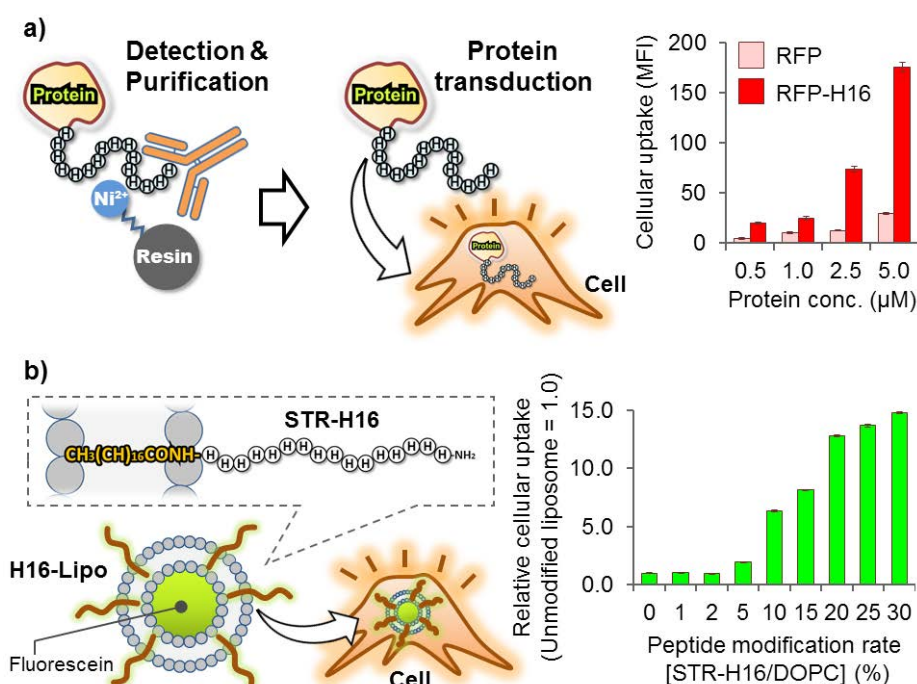


図2 (a) PHP のタンパク質輸送能, (b) PHP のリポソーム輸送能, RFP-H16 および Fluorescein 内包 H16-Lipo の細胞膜透過は、ともにフローサイトメーターにより評価した。

これらの研究成果はすべて動物細胞を対象とした研究に由来するものでした。一方で、動物以外の細胞種では、植物細胞もまた物質生産や品種改良といった観点から産業的に利用価値の高い細胞であり、CPPの応用先としては有力な細胞種であると言えます¹²。しかし植物細胞は、動物細胞には存在しない細胞壁を有しており、この細胞壁が物理的障壁としてCPPの応用を阻んでいます。実際に、アルギニン/リジンに富んだ従来のCPPは細胞壁にトラップされてしまうため、植物細胞に対しては有効でないことが報告されています^{13,14}。この理由としては、負電荷に富んだ細胞壁に対して、正電荷に富んだ従来のCPPが電荷的にトラップされてしまうためであると考えられています。この点において、ポリヒスチジンは正電荷に依存しない新しいタイプのCPPであることから、細胞壁を有する植物細胞に対しても有効な細胞膜透過を示す可能性が期待されました。そこで我々は、PHPの植物細胞に対する細胞膜透過を評価し、植物細胞に対する応用性について検証しました。

様々な鎖長のPHPを用いて、植物細胞（タバコBY-2細胞）に対する細胞膜透過を調べました。その結果、非常に面白いことに、植物細胞に対しては短鎖（ヒスチジン6～8残基）のPHP（H6～8 peptide）が高い細胞膜透過を示すことが確認されました。一方で、ヒスチジン10残基以上のPHPは細胞壁にトラップされ、細胞膜を透過できないことが確認されました（図4）。以上の結果から、動物細胞に対しては長鎖（ヒスチジン16残基以上）のPHPが高い細胞膜透過を

示したのに対して、細胞壁を有する植物細胞に対しては短鎖（ヒスチジン6～10残基）のPHPが高い細胞膜透過を示すことが確認されました。細胞壁の有無により、植物細胞と動物細胞で正反対の結果が得られたことは、大変興味深いことです。このような結果が得られた理由は未だ明らかになっていませんが、短鎖のPHPが植物細胞に対して有効なCPPであることが確認されたことから、今後は植物細胞に対する分子輸送キャリアーとして、物質生産や品種改良への応用を視野に入れた研究を展開していく予定です。

6. おわりに

本研究を通じて、我々は新しいCPPとしてPHPを発見しました。動物細胞に対しては、長鎖PHPが高い細胞膜透過を示し、タンパク質やリポソームといった高分子を細胞内へ輸送可能であることや、生体内では腫瘍ターゲティング能を発揮することを明らかにしました¹⁵。逆に、植物細胞のように細胞壁を有する細胞に対しては、短鎖PHPが高い細胞膜透過を示すことが明らかとなりました¹⁶。これらの知見より、動物細胞に対しては長鎖PHP、植物細胞に対しては短鎖PHPといったように、標的細胞に応じてヒスチジン鎖長を使い分けることで、効率的かつ選択的な分子輸送技術につなげることが可能であると考えています（図5）。一方で、『PHPは細胞膜上でどのような分子と相互作用しているのか?』『どのようにして細胞内に入っているのか?』といった基礎的な点については、まだ未解明な部分が多々あります。今後は、こういっ

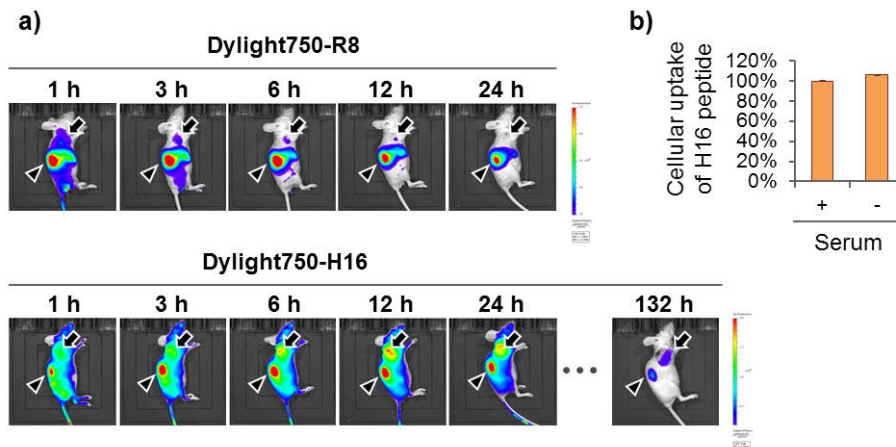


図3 (a) PHPの*in vivo*腫瘍ターゲティング能、矢印はHT1080細胞由来の腫瘍部位を、矢頭は腎臓を示す。(b) H16 peptideの血清非感受性

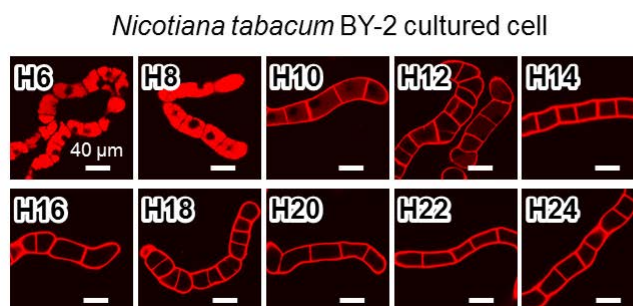


図4 植物細胞に対するPHPの細胞膜透過、Tetramethylrhodamine標識したPHPの細胞膜透過を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

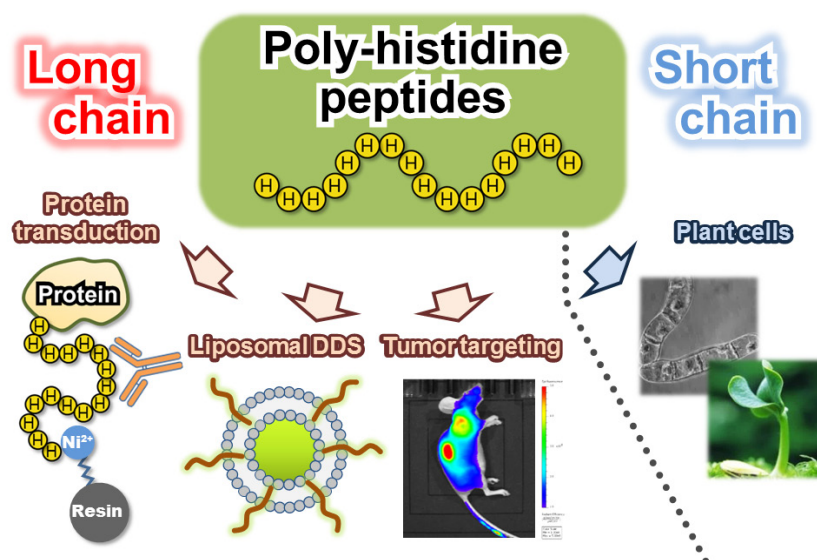


図5 PHPの応用展開の構想図

た基礎的な研究にも力を入れ、ペプチド討論会で順次ご報告していきたいと考えています。

末筆になりましたが、本研究の一部は、アステラス病態代謝研究会、加藤記念バイオサイエンス振興財団、住友電工グループ、ならびに文部科学省（科研費）の支援のもと遂行したものです。この場をお借りしまして、心より感謝申し上げます。また、本稿執筆の機会をいただきましたPNJ編集委員の先生方に、厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. J Biol Chem 1994, 269, 10444-10450.
2. Vives, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. J Biol Chem 1997, 272, 16010-16017.
3. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. J Biol Chem 2001, 276, 5836-5840.
4. Poon, G. M.; Gariepy, J. Biochem Soc Trans 2007, 35, 788-793.
5. Futaki, S.; Nakase, I.; Tadokoro, A.; Takeuchi, T.; Jones, A. T. Biochem Soc Trans 2007, 35, 784-787.
6. Melikov, K.; Chernomordik, L. V. Cell Mol Life Sci 2005, 62, 2739-2749.
7. Pan, J. G.; Mak, T. W. Sci STKE 2007, e14.
8. Tannock, I. F.; Rotin, D. Cancer Res 1989, 49, 4373-4384.
9. Kosuge, M.; Takeuchi, T.; Nakase, I.; Jones, A. T.; Futaki, S. Bioconjug Chem 2008, 19, 656-664.
10. Youngblood, D. S.; Hatlevig, S. A.; Hassinger, J. N.; Iversen, P. L.; Moulton, H. M. Bioconjug Chem 2007, 18, 50-60.
11. Javadvpour, M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. C.; Bishop, S. M.; Alberty, J. B.; Cowell, S. M.; Becker, C. L.; McLaughlin, M. L. J Med Chem 1996, 39, 3107-3113.
12. Hyun, S.; Lee, S.; Kim, S.; Jang, S.; Yu, J.; Lee, Y. Biomacromolecules 2014, 15, 3746-3752.
13. Mizuno, T.; Miyashita, M.; Miyagawa, H. J Pept Sci 2009, 15, 259-263.
14. Chang, M.; Chou, J. C.; Lee, H. J. Plant Cell Physiol 2005,

46, 482-488.

15. Iwasaki, T.; Tokuda, Y.; Kotake, A.; Okada, H.; Takeda, S.; Kawano, T.; Nakayama, Y. J Control Release 2015, 210, 115-124.
16. Kimura, S.; Kawano, T.; Iwasaki, T. Biosci Biotechnol Biochem 2016, 81, 112-118.

いわさき たかし
鳥取大学 大学院農学研究科 生体制御化学分野
itaka@muses.tottori-u.ac.jp

PNJ 研究室紹介 「山形大学大学院理工学研究科 バイオ化学工学専攻今野研究室」

はじめに

山形大学の今野博行と申します。この度、研究室紹介の機会を与えて頂きましたので、山形大学と私の研究室を紹介いたします。

研究室の構成

私の研究室は8年前に発足して以来、教員は私1名です。学生数は徐々に増え現在は博士課程1名、修士課程8名、学部学生11名、短期ポストドク1名で21名を数えるまでになりました。8年間で私の研究室から卒業した学生は30名になります。小出隆規先生、藤井信孝先生、そして赤路健一先生の各研究室で過ごした助手時代、私が指導した学生は10名ですので、3倍に増えたことになります。おかげで？自分で実験する時間が激減しており何とかしなければと思っています。新年度からは若干減って17名の学生たちと研究活動を行って参ります。



今野 博行

山形大学の概要

山形大学は県内に4つの拠点を有する分散型キャンパスを持ち、人文・地域教育・理（山形小白川）・医（山形飯田）・農（鶴岡）・工（米沢）の計6学部から構成されています。新年度に大規模な改組を控えており、新・山形大学として始動する予定です。

私が所属する山形大学大学院理工学研究科（工学系）・工学部は山形県南端・米沢市にあります。山形新幹線のおかげで首都圏とのアクセスはよいのですが、日頃はそんなことも忘れてのんびり暮らしています。米沢と言えばまず思いつくことは米沢牛あるいは上杉鷹山でしょうか。四方を山々に囲まれた典型的な盆地のため夏は暑く、冬は寒い！（世界一の豪雪地帯であると自負しています）今年も暖冬で少雪のため、執筆時で2メートル程度の積雪しかありません。この豊富な水源は古くからこの町の繊維産業を支えてきました。そのDNAは脈々と受け継がれ、現在の山形大学工学部では高分子、電子材料の研究開発が活発に行われており、大学の看板になっています。また本学における研究体制の特徴は一部を除いて講座制を採用せず個々が研究室を運営している点にあるかと思います。そのため、問題、課題も多いのですが、学内の先生方との垣根が低く共同研究が簡単に行える点は利点であると考えています。学内でバックグラウンドの異なる教員から構成されるプロジェクトが簡単に形成可能です。私も「ヘルスケア材料社会実装研究拠点」（詳しくは化学と工業1月号をご覧ください）に属しています。

理工学研究科8専攻の中で、私たちの研究室はバイオ化学工学専攻に属し研究教育活動を行っています。バイオが付けば何でもありのカオスな集団で、化粧品や消臭剤の開発、キノコの栽培、ペニバナ色素の合成など研究課題は多種多様です。バイオ化学工学専攻は7年前に新設されたこともあり設備等で不自由はありますが、自由な雰囲気です。アットホームな研究教育活動ができています。

2009-2016

8年前、赤路健一先生の研究室から現所属に移動しました。赴任した時、スペース（研究室）がないと言われ小さな会議室で配属された卒論研究生4名とひと月を過ごしたことをよく覚えています。はじめは（大げさではなく）机や実験台、ドラフトがなく、いかにそれまでお世話になった先生方に良い環境を与えてもらっていたかがよく理解でき、勉強になりました。それから少しずつ研究室（2号館3階）を整備し、新研究棟への引越（新3号館3階）を経て現在に至っております。その間、東日本大震災（PNJ2011年5月号をご覧ください）を経験し、その年に山形で開催予定の「若手ペプチド夏の勉強会」が中止に追い込まれるという苦い思い出もありました（当時は皆様に本当にご迷惑をおかけしました。2年後、第19回ペプチドフォーラムを開催させて頂きました）。あれから6年、三陸の復興や福島原発の問題とは今後も向き合っていかなければいけないと思っています。

一方で山形地区のペプチド科学コミュニティーは確



写真2. 冬の米沢キャンパス（工学部3号館）



写真1. 2016年グループメンバー

実に広がっていると実感しています。大学近くにある浜理薬品の皆様はもちろんですが、学会に所属なくともペプチドを扱っている方が近くにおられることがわかり、そういった先生方とよいディスカッションができるよう日々努力しなければと思っています。

研究室の様子

私の研究室では週1回のペースで雑誌会 (Journal club) と研究報告会を行っています。エジプト人ボスドクのおかげで英語での資料作成や発表が日常になってきました。またこの他に勉強会を週1回行っています。勉強会とは有機合成反応や分析機器のスペクトル演習です。いずれも準備、予習が大変なのですが、「為せば成る」を信じて取り組んでいます。研究でもまじめに取り組んでくれる学生が多く本当に助けてもらっています。研究環境はお世辞にも充実しているとは言えませんが、なんとかやりくりして頑張っています。

研究内容

今野研究室は「有機合成が好き！自分で作った分子が何かのレスポンスを示す瞬間に立ち会いたい!!」をモットーとしています。学生時代に学んだ天然物合成とボスドク、助手時代に経験したペプチド化学を融合させたテーマを設定しています。生理活性物質を扱うとアッセイが必要になりますので、出来ることはなるべく自分たちで評価するようにしています。よって、キーワードは天然物、ペプチド、生理活性でしょうか。以下概要を紹介させていただきます。

1. 異常アミノ酸含有ペプチドの合成研究

抗 HIV 活性や細胞毒性、抗菌活性など顕著な生理活性を有するペプチドの合成を行っています。特に異常アミノ酸と言われる非蛋白性アミノ酸を含有するタイプの合成研究を通じて、そのアミノ酸に合った立体制御法（不斉触媒、酵素、キラルプールなど）を構築することに力点を置いています。さらに合成できたアミノ酸を用いたペプチドの組立て、組み合わせによる構造活性相関ではアッセイを行いながら進めています。

す。^{1,2}このような研究を通じて感じることは天然物のすばらしさです。活性の強さはもちろんのこと、合成時に様々な課題を私たちに与えてくれます (図1)。

2. アミロイドβ凝集体の構造を制御する小分子化合物の探索

アルツハイマー病原因物質と考えられているアミロイドβペプチドですが、その凝集阻害剤の探索は治療薬開発の観点から世界中で行われています。しかしその有効な薬剤は見出されていません。私たちはウコンに含まれるクルクミンに着目し、その治療戦略の足がかりとなる研究を展開しています。クルクミンの極度な難水溶性を克服するため、構造活性相関を行うことで水溶性クルクミンを開発しました。³ またアミロイド検出試薬への応用を展開しています。ペプチドと低分子の相互作用解明が当面の目標になっています (図2)。

3. SARS プロテアーゼ阻害剤探索

システインプロテアーゼ cathepsin B 阻害剤、重症急性呼吸器症候群 (SARS) プロテアーゼ阻害剤の探索を基質配列から始め、低分子化へ向けた構造展開を行っています。⁴ 現在、シュミレーションも取り入れた薬剤設計を行い、非ペプチド分子へ展開しています。赤路先生の所で行っていた研究をきっかけに少しずつ構造変更中です (図3)。

4. その他⁵

ポリオキソメタレート (POM) の試薬としての活用、アルカロイド系天然物の合成研究、蛋白質断片をモチーフにした機能性分子の創成などのテーマを展開しています。いずれもペプチド、蛋白質を標的にした有機化学的な取り組みを行っています。

おわりに

以上、私の研究室を紹介させていただきました。研究内容はいずれもクラシカルなテーマで有機合成を基盤にしたものですが、1) 自己を満足させる研究、2) 世の中で認知される研究、を目指して化合物を作り続けます。今後ともよろしくお願いいたします。

研究テーマの設定には様々な先生方からのご指導や

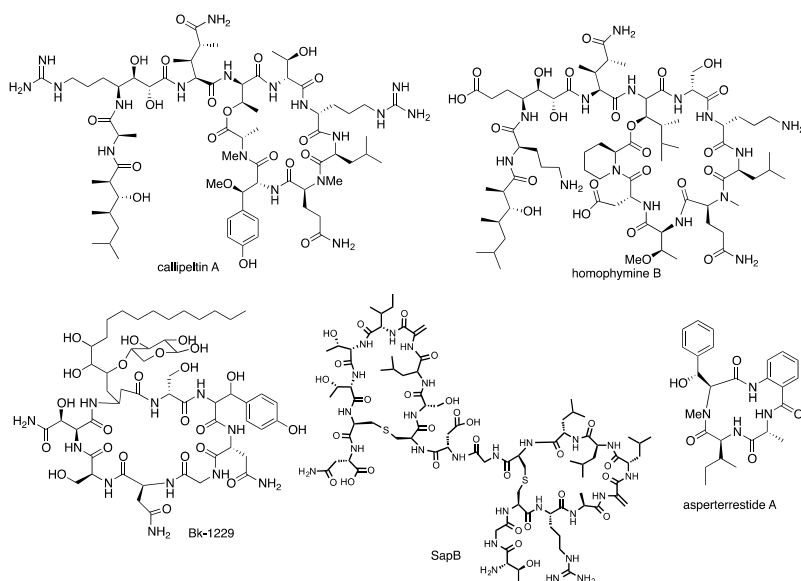
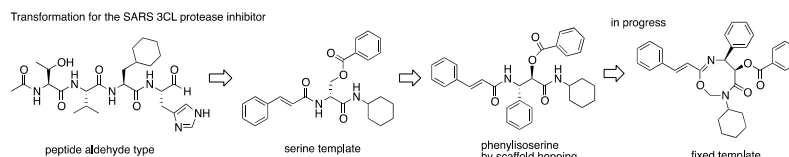


図1 現在取り組んでいる異常アミノ酸含有ペプチド



ご助言がありました。特に赤路健一先生には現在も多くのご指導、ご支援を賜っております。心から感謝申し上げます。また研究の遂行のみならず多くのイベントなどで研究室を盛り上げ尽力頂いた今野研究室の学生諸君に感謝を述べたいと思います。

今回、PNJ編集委員の中馬吉郎先生より執筆の機会を与えて頂きました。編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Kikuchi, M.; Konno, H. *Org Lett* 2014, 16, 4324-4327.
2. Tokairin, Y.; Takeda, S.; Kikuchi, M.; Konno, H. *Tetrahedron Lett* 2015, 56, 2809-2812.
3. Endo, H.; Nikaido, Y.; Nakadate, M.; Ise, S.; Konno, H. *Bioorg Med Chem Lett* 2014, 24, 5621-5626.
4. Konno, H.; Wakabayashi, M.; Takanuma, D.; Saito, Y.; Akaji, K. *Bioorg Med Chem* 2016, 24, 1241-1254.
5. Konno, H.; Makabe, H.; Hattori, Y.; Nosaka, K.; Akaji, K. *Synthesis of solamin type mono-THF acetogenins using cross-metathesis. Tetrahedron* 2010, 66, 7946-7953.

こんの ひろゆき
山形大学大学院理工学研究科
バイオ化学工学専攻生物有機化学分野
konno@yz.yamagata-u.ac.jp
http://bioorg.yz.yamagata-u.ac.jp

日本ペプチド学会 第23回ペプチドフォーラム 開催報告

「ペプチド・タンパク質の革新的化学修飾法によるケミカルバイオロジー・創薬への挑戦」

日時：2017年1月18日（水）

13：00～17：30

場所：東京大学 薬学系総合研究棟10階会議室

主催：日本ペプチド学会、東京大学大学院薬学系研究科・薬学部



相馬 洋平

共催：日本薬学会、日本化学会

オーガナイザー：相馬洋平（東大院薬）、後藤佑樹（東大院理）

ペプチド・タンパク質を自在に化学修飾することができれば、医薬化学、バイオマテリアル、構造生物学、ケミカルバイオロジーなどの分野の進展に大きく貢献できます。ケミカルライゲーションに代表される収束的な合成法は、信頼性の高い方法論として確立していますが、現在でも、糖タンパク質、膜タンパク質、ヒストンタンパク質などにおいて挑戦的な基質も存在します。もう一つには、生体共役型の反応（bioconjugation）が挙げられますが、特に天然型アミノ酸残基を標的とするペプチド・タンパク質の生体共役反応は、生体条件適合性（中性pH、室温程度、水系反応等）をもって、化学選択性・官能基選択性を実現する必要があるため、反応開発難度が極めて高くなります。今回、ペプチドの更なる可能性・新たな方向性を考える契機となることを期待し、ケミカルライゲーションおよび生体共役反応を基盤にペプチドに関連するケミカルバイオロジー、医薬化学研究を進めておられる先生方に話題を提供いただきました。

フォーラム前日に開催されたERATO金井触媒分子生命プロジェクト最終成果報告会にプリンストン大学のTom Muir先生をインバイトでできることになったため、ペプチドフォーラムにも是非ご参加いただけるようお願いし幸いご快諾いただくことができました。また、距離的にも分野的にも近い後藤佑樹先生（東大院理）にオーガナイザーをご一緒していただけることになり、さらに、新進気鋭の先生方（生長幸之助先生（東大院薬）、岡本亮先生（阪大院理）、築地真也先生（名工大））にご講演いただけることになりました。

本フォーラムは、化学会及び薬学会機関誌への掲載や東京大学薬学部内の関連分野の先生方への配信など、できるだけ広く周知しました。その甲斐もあってか、当日は、アカデミック及び企業から合わせて約100名の方々にご参加いただくことができ、大変盛会であったように思います。ペプチド学会員の方々に加えて、非会員の方々に多数ご参加いただくことができ、ペプチド学会の活動の一端をアピールすることができたのではと期待しています。発表はいずれ



も極めてエキサイティングかつ分かりやすい内容で、Tom Muir 先生からも「本当に内容の良いミーティングだった」とおっしゃっていただきました。

最後に、Tom Muir 先生のペプチドフォーラムへの参加をご支援くださった金井求先生（東大院薬）、オーガナイザーと一緒に務めてくださった後藤先生、ご講演および座長を快諾くださった諸先生方、ご参加いただいた先生方や企業の方々、スタッフとしてご協力いただいた金井研の学生の皆さん、そして温かいご支援・ご協力をいただきました日本ペプチド学会の皆様がこの場をお借りして心より厚く御礼申し上げます。

講演者（敬称略）および演題（発表順）

1. 相馬洋平（東大院薬）
「アミロイド構造を区別して酸素化する光触媒の開発」
2. 岡本亮（阪大院理）
「O-GalNAc 修飾をもつ O- 結合型糖タンパク質の化学合成」
3. 生長幸之助（東大院薬）
「有機ラジカルを用いた化学選択的タンパク質変換法の開発」
4. 後藤佑樹（東大院理）
「試験管内人工生合成系を用いた擬天然物ペプチドの創製」
5. 築地真也（名古屋工業大）
「局在性リガンドによる細胞シグナル制御」
6. Tom Muir（プリンストン大）
「Discovery and Application of Ultrafast Inteins」

そうま ようへい
東京大学大学院薬学系研究科有機合成化学教室
JST・ERATO
ysohma@mol.f.u-tokyo.ac.jp

2nd Peptides and Proteins Society of Singapore Symposium (P2S2 2016) 参加報告

2nd Peptides and Proteins Society of Singapore Symposium (P2S2) が2016年12月8-9日の2日間、シンガポールの Nanyang Technological University (NTU), School of Biological Sciences, Classroom 11において、James P. Tam 教授と David P. Lane 教授の co-



小早川拓也

chairs により開催されました（図1）。約200人の参加者があった盛況な学会であり、日本人は長浜バイオ大学から向井秀仁准教授、東京薬科大学から谷口敦彦講師、東京医科歯科大学から玉村啓和教授と私の計4人が参加致しました。

NTU は、シンガポールのダウンタウン（図2）から Mass Rapid Transit (MRT; シンガポールの公共鉄道) を利用して約40分要する南西方位にあり、計画的に設計された巨大な敷地（約200ヘクタール）の中で学部生・大学院生が教育を受けています。大学の保有施設内で研究生生活を送れることも世界大学ランキングで上位に入る理由なのかと思いつつ、2日間通わせて頂きました。

実際のシンポジウムでは、日本人としては向井秀仁准教授、谷口敦彦講師、玉村啓和教授の3人が講演され、オーラル・ポスター発表を通じて“ペプチド・プロテイン”を切り口とした多種多様な研究に触れることができ、強く良い刺激を受けました。また、私のポ

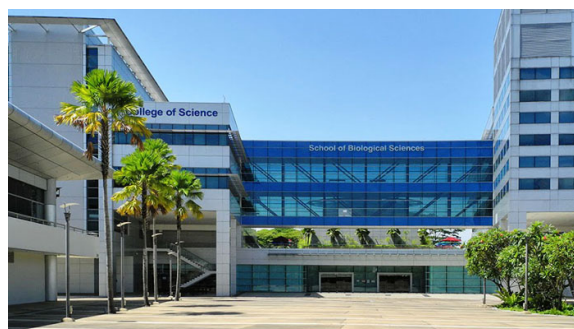


図1 会場前の風景（P2S2のHPより参照）

スター発表に興味をもって来て頂いた方々はフランクかつアグレッシブであり、充実したディスカッションができたのと同時に、“Science”の世界に“国境”は無いのだと強く感じました（あるのだとすれば、私の“言語力”ですね）。そのため、これまで以上に、（Scienceの楽しさ・奥深さを忘れることなく）研究に対して愚直に努力・精進しなければいけないと痛感しました。

このような貴重な機会を下さった世話人の James P. Tam 教授、David P. Lane 教授および P2S2 組織委員の各関係者の皆様に御礼申し上げます。また、今回の発表では幸運にも“Best Poster Award”を受賞することができました（図3）。P2S2 シンポジウムへの参加および、この度の受賞は玉村啓和教授、共同研究でお世話になりました東京薬科大学の野水基義教授、保住建太郎講師の御指導により実現することができました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。次回の3rd Peptides and Proteins Society of Singapore Symposium は2017年12月初旬に Biopolis, Singapore にて開催される予定です。

最後になりましたが、このような執筆の機会を与えて下さった東京薬科大学林良雄先生、新潟大学中馬吉郎先生、およびペプチドニュースレター編集委員の先生方に心より御礼申し上げます。

こばやかわ たくや
東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
tkobmr@tmd.ac.jp
<http://tamamura-tmd.sakura.ne.jp/>

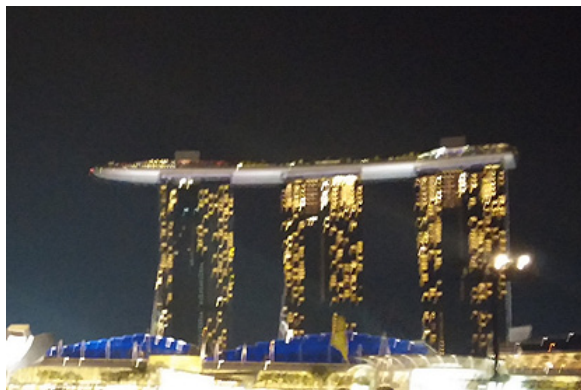


図2 ダウンタウンにあるマリーナベイ・サンズ

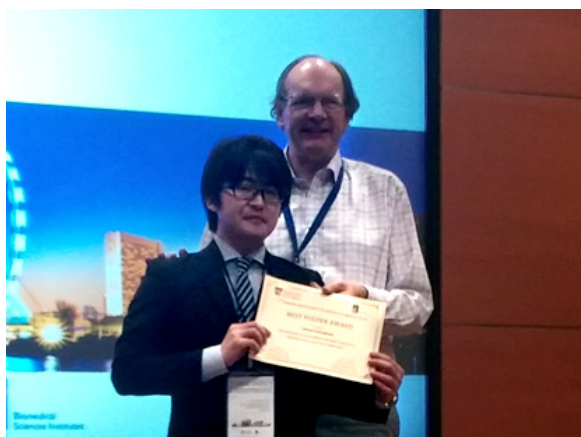


図3 受賞時の写真 ; David P. Lane 教授と共に

第49回若手ペプチド夏の勉強会開催のお知らせ

2017年8月5日（土）から8月7日（月）までの2泊3日で、第49回若手ペプチド夏の勉強会を長崎県長崎市にて開催いたします。今回の会場は、「世界新三大夜景」に認定された稲佐山中腹にある「長崎ブルースカイホテル」です。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：

2017（平成29）年8月5日（土）～8月7日（月）

場所：

長崎ブルースカイホテル

〒852-8007 長崎県長崎市江の浦町18-1

TEL：095-811-0303, FAX：095-826-1922

URL：http://nshc.nagasaki.jp/nagasaki-blueskyhotel
（JR長崎駅からホテルまでの送迎バスを準備しています）

世話人：

大庭 誠（長崎大学 薬学部）

加藤太郎（鹿児島大学 理学部）

出水 庸介（国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部）

*参加方法等の詳細に関しては、追ってメールにてお知らせ致します。

（お問い合わせは E-mail：wakatepep49@gmail.com までお願い致します）

《平成29年度：海外のペプチドシンポジウム （若手参加支援対象）》

平成29年6月25日－平成29年6月26日

21st Korean Peptide Protein Symposium
(Cheju, Korea)

平成29年10月15日－平成29年10月19日

12th Australian Peptide Symposium
(Queensland, Australia)

新編集委員



大石 真也

4月より編集委員を拝命いたしました。微力ながらPNJ誌の充実のために尽力してまいりたいと思います。新しい試みも採り入れていきたいと思いますので、ご意見やご要望等をぜひお寄せください。

編集後記

新年度も始まり桜前線も順調に北上しているようです。本号は日本海側の地域でご活躍されている先生方を中心にペプチド研究に関連した話題をご提供いただいております。日本海側は未だ雪が残っている地域もありますが、冬が長い分雪解け後の春の喜びはひとしおです。研究においても様々な苦難や壁が立ちほだかることがあります。それらを乗り越えた時の喜びや感動は、春の訪れと相通ずるものがあると感じます。皆さまの研究のますますの発展を祈念するとともに、今後も本誌の内容を充実すべく尽力していきたいと思っております。

(編集委員：中馬 吉郎)

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-8686 箕面市稲 4-1-2

一般財団法人蛋白質研究奨励会内

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・FAX 025-262-6160

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

中瀬 生彦 (大阪府立大学 NanoSquare 拠点研究所)

TEL・FAX 072-254-9895

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

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

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

(本号編集担当：中馬 吉郎)