PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN
No.116 2020年4月
THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY
https://www.peptide-soc.jp/

ペプチドタグデザインによる タンパク質１分子レベルの電子顕微鏡解析

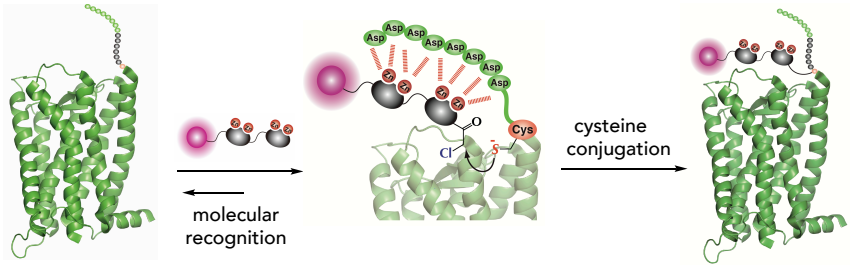
王子田 彰夫

(1) はじめに

タンパク質の特異的ラベル化は，細胞など生体夾雑環境における標的タンパク質の機能解析や機能制御を可能にする。タンパク質にペプチドタグを導入して，これと特異的に相互作用する分子プローブによりラベル化を行う，いわゆる「ペプチドタグ法」は従来から数多く開発されており，生細胞におけるタンパク質の蛍光イメージングを中心とした解析応用が行われてきた[1]。ペプチドタグ法では，標的タンパク質に短いペプチドタグを導入する。従って，例えばタンパク質の蛍光イメージングに用いられる GFP などの蛍光タンパク質と比較して標的タンパク質に対する機能阻害が少ないなどの利点を有する。我々はこれまでに，ペプチドタグを用いたタンパク質の特異的ラベル化法として「リアクティブタグ法」の開発を進めてきた[2]（図 1）。リアクティブタグ法は，反応性のシステイン残基を含むアスパラギン酸リッチな Asp タグあるいはヒスチジンリッチな His タグと特異的に相互作用（K_d = 55 nM）する金属錯体プローブ **1**-4Zn(II) により標的タンパク質のラベル化を行う手法である。これまでに我々は，リアクティブタグ法を用いて細胞表層に発現させた膜タンパク質の蛍光イメージングを報告してきた。しかしながら，このような蛍光イメージングはリアクティブタグ法を用いなくても，蛍光タンパク質や Halo タグ法などによっても問題なく達成できることが多い。化学ラベル化であるリアクティブタグ法でしか達成できない生体解析応用はないのか？ この問いに対する一つの答えが，本小論で紹介するタンパク質一分子レベルの電子顕微鏡解析である[3]。

電子顕微鏡は，タンパク質を一分子レベルで検出できる他の解析法では達成できない極めて高い分解

(a) リアクティブタグ法の概念図



(b) 亜鉛錯体型プローブの構造とペプチドタグの配列

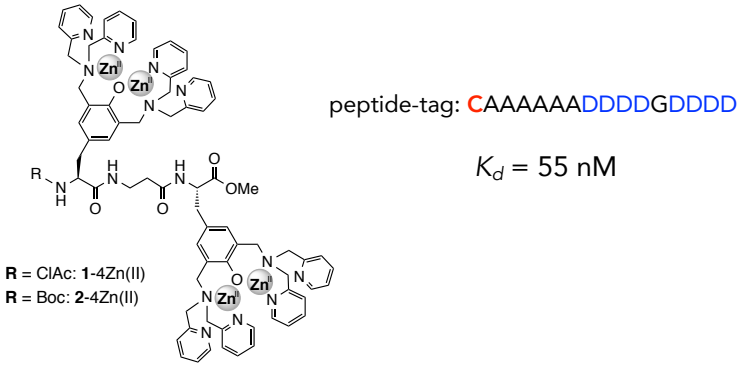


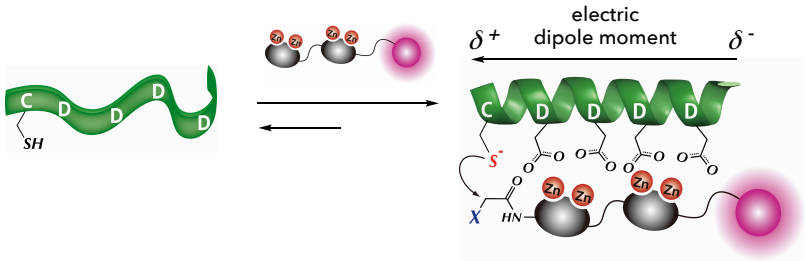
図 1　リアクティブタグ法について

能を持つ。従来，電子顕微鏡によるタンパク質の局在解析は，特異抗体を用いて標的タンパク質を金ナノ粒子でラベル化する免疫電顕法により行われてきた。しかしながら免疫電顕法では分子サイズの大きな抗体（150 kDa）をラベルとして用いるため，標的タンパク質と検出マーカーである金ナノ粒子の位置のズレが生じてしまう。すなわち免疫電顕法は，タンパク質の正確な位置情報を知ることができない問題があることが以前から指摘されてきた。また，タンパク質複合体を形成するタンパク質を同時に複数の抗体でラベル化して検出することは立体障害のため困難である。すなわち免疫電顕法はタンパク質複合体の一分子レベルの解析に応用することは難しい。以上のような免疫電顕法の問題をサイズの小さなリアクティブタグ法は解決できるのではないか？ 生理学研究所の重本 隆一先生（現在オーストリア IST 研究所 教授）から提案された本アイデアに基づいて我々は，リアクティブタグ法の電子顕微鏡イメージング応用についての共同研究を開始した。

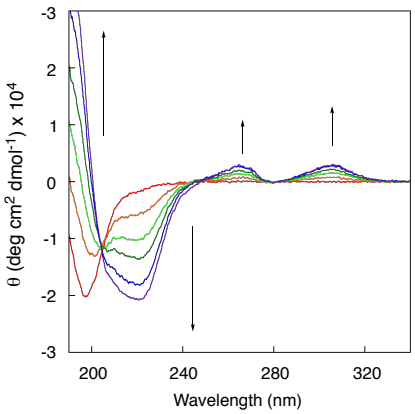
(2) 新しいリアクティブタグ法の開発

当初に開発したリアクティブタグ法は，D4 ペプチドタグ（CAAAAAADDDDGDDDD）と α-クロロアセタミド基を持つ亜鉛錯体プローブ **1**-4Zn(II) の組み合わせであった[2]（図 1）。このペアは細胞表層に発現させた GPCR タンパク質の蛍光ラベル化に応用することができたが，プローブの反応性が高過ぎるために非特異反応を起こしやすい問題があった。このような非特異ラベルは，蛍光イメージングではバックグランドシグナルとして取り扱うことも可能であるが，タンパク質一分子そのものを観察する電子顕微鏡解析では偽陽性シグナルとして解析に大きな影響を与えてしまう。この問題を解決するため我々は，非特異反応性が低減された新しいリアクティブタグ法の開発にまず取り組んだ。非特異反応は基本的にプローブの反応性を低下させれば抑えることができ

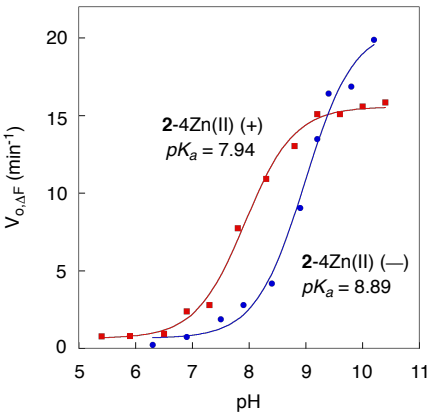
(a) ヘリックス形成型の高反応性ペプチドタグ



(b) **2**-4Zn(II)添加時のpeptide-**a**のCD変化



(c) peptide-**b**のシステイン残基のpK_a解析



(d) 2-4Zn(II)添加時のタグペプチドのpKaと反応速度 (k, sec^{-1})

	pK_a	k (x 10^{-2}, s^{-1})
peptide-**a**： Ac-YADAAADAAADAAAD-NH_2	—	—
peptide-**b**： Ac-YG**C**AAADAAADAAADAAAD-NH_2	7.94	1.51
peptide-**c**： Ac-GG**C**PYADAAADAAADAAAD-NH_2	7.46	5.11
peptide-**d**： Ac-KK**C**PYSDAAADAAADAAAD-NH_2	7.13	7.60
peptide-**e**： Ac-YG**C**AAAAAADDDDGDDDD-NH_2	8.22	1.78

図 2　高反応性タグペプチドのデザインと機能評価

る。しかし，それのみではペプチドタグとの反応が進まずラベル化効率は下がってしまう。そこで我々はペプチド配列デザインにより，タグの反応性を向上させてラベル化効率を高めることとした。

α-ヘリックスの N 末端にあるシステン残基は，ヘリックスの双極子モーメントの影響を受けて低い pK_a を持つため高反応性となる事が知られている。この知見に基づいて我々は，$i, i+4$ の位置にアスパラギン酸を持つ peptide-**a** をデザインした（図 2）。まず，peptide-**a** と亜鉛錯体 **2**-4Zn(II) との相互作用を CD にて観察すると，α-ヘリックス特有の CD シグナルが観察された。また，蛍光滴定より peptide-**a** と亜鉛錯体 **2**-4Zn(II) の相互作用は解離定数（K_d）にして 73 nM と非常に強いことが分かった。次に peptide-**a** の N 末端にシステインを導入した peptide-**b** の pK_a 値を求めた。この pK_a 値の測定は，チオールと反応して蛍光を発するモノクロロビマン（mCBI）との反応初速度を異なる pH 条件下で評価を行い，得られた結果を Henderson-Hasserlbalch の式を用いて解析することで行った。その結果，peptide-**b** の pK_a 値は **2**-4Zn(II) との相互作用により 8.89 から 7.94 に大きく低下することを明らかとした。さらに我々は peptide-**b** の pK_a 値を下げるペプチドデザインに基づいて高反応性ペプチドタグの探索を行った。グルタレドキシンファミリーのタンパク質は -Cys-Pro-Xaa-Cys- の共通配列を持ち，その N 末端の Cys チオールの pK_a 値は 3.8 と非常に低いことが知られている。そこで類似配列 -Cys-Pro-Tyr-Ala- を組み込み（peptide-**c**），さらに pK_a 値を下げるため Cys に隣接する部位にカチオン性側鎖を持つ Lys を導入した peptide-**d** をデザインところ，Cys 残基の pK_a 値を **2**-4Zn(II) 存在下で 7.1 まで低下させることに成功した。同条件において従来のペプチドタグである peptide-**e** の pK_a 値は 8.22 であった。また，多くのデザインペプチドの mCBI との反応速度 k（s^{-1}）は，それらの持つシステイン残基 pK_a 値と非常によく相関しており，低い pK_a 値を持つ peptide-**c** の反応性は peptide-**b** よりも 5 倍以上高いことが分かった。この結果は，我々の pK_a 制御による高反応性ペプチドタグのデザイン戦略が正しいことを示している。

プローブとの反応性の向上のため配列のチューニングをさらに行い，最終的に peptide-**f**（以下 helixD2 タグと呼ぶ）をペプチドタグとして選択して，これを導入した MBP タンパク質のラベル化を試験管内で検討した。反応性の穏やかなマイケルアクセプターを反応基として持つ蛍光性プローブ **3**-4Zn(II) を用いてタグ導入 MBP のラベル化を行ったところ反応は迅速に進行した（半反応時間 $t_{1/2}$ = 0.28 hr）。次に helixD2 タグを導入したブラジキニン受容体を HEK293 細胞に発現させ，細胞表層でラベル化を行ったところ受容体特異的なラベル化が進行することを蛍光イメージングにより確認した（図 3）。また，細胞表層での非特異反応を蛍光イメージングにより確認したところ，マイケルアクセプター型の **3**-4Zn(II) は，従来の α-クロロアセタミド基を持つプローブよりも細胞膜タンパク質に対する非特異反応性が大きく低減されている事を確認した。

⑶ 電子顕微鏡解析への応用

次に今回開発したリアクティブタグ法をタンパク質の電子顕微鏡解析へと応用した[3]（図 4）。helixD2 タグを導入したブラジキニン受容体をビオチン型プローブ **4**-4Zn(II) を用いてラベル化を行った後に細胞膜レプリカを作成した。得られた膜レプリカを 1.4 ナノメーターサイズの金ナノ粒子を持つストレプトアビジンで処理後に，検出を容易とするために銀増感を行い電子顕微鏡で観察した。その結果，細胞表層側の E-face に銀増感された金ナノ粒子が観察された。一方で細胞膜の内側にあたる P-face レプリカにはブラジキニン受容体に付加した EGFP を免疫染色した 5 ナノメーターサイズの金ナノ粒子が観察された。図 4 に示す二枚の E-face および P-face のレプリカは，その膜形状から同じ細胞の裏と表の膜であることが判断できる。この事はリアクティブタグ法によりラベル化されたブラジキニン受容体を E-face で検出できていることを強く示唆する結果である。次に我々は 1.4 ナノメーターの金ナノ粒子を直接導入したプローブ **5**-4Zn(II) を用いてタグ修飾ブラジキ

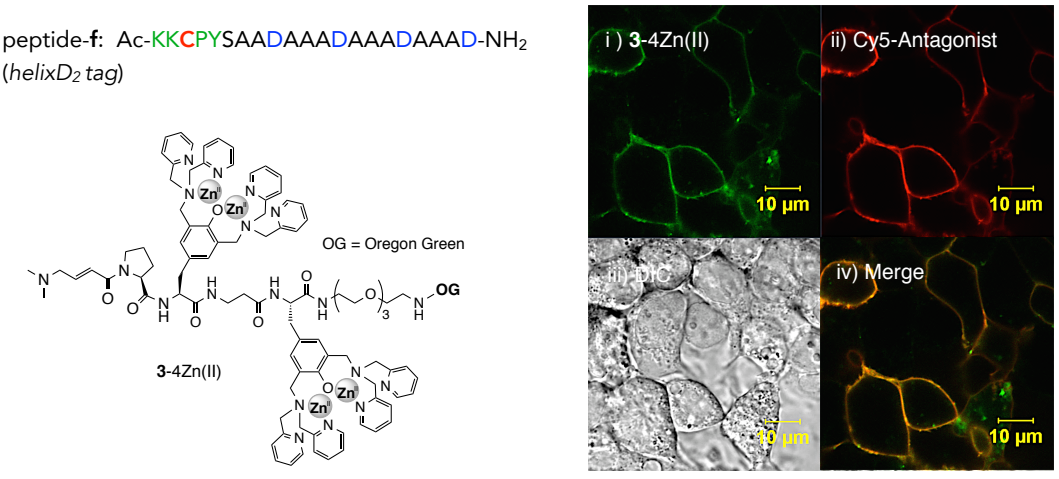


図 3　リアクティブタグ法を用いたブラジキニン受容体の蛍光イメージング

ニン受容体のラベル化を行った。その結果，E-face 上にブラジキニン受容体のクラスターを検出することに成功した。興味あることに **5**-4Zn(II) によるラベル化によってクラスター領域に観察される金ナノ粒子の密度は，Flag tag を介して免疫修飾した場合よりも高い事が判明した。この事は，リアクティブタグ法のラベル化効率が免疫電験法と同等以上であることを意味している。さらにラベル化した細胞の ultrathin section を用いた電子顕微鏡観察からリアクティブタグ法は免疫電験法と比較して，より高い空間分解能を持つことを明らかにすることができた。

⑷ おわりに

以上のように本小論では，ペプチドデザインに基づいたリアクティブタグ法の開発と，その電子顕微鏡解析への応用について紹介を行った。本研究は化学修飾法を用いてタンパク質の一分子可視化に成功した初めての例となる。今回紹介した成果については，研究を初めてから論文発表までに 9 年以上の歳月を必要とした。研究の途中では，自らのラボで電子顕微鏡観察にトライしたこともあったが，良い成果が得られないままに数年の期間を過ごした。最終的には当研究室の田畑栄一博士に共同研究先の重本研（オーストリア IST 研究所）に留学してもらい電子顕微鏡解析に専念することで，今回の成果を得ることに成功した。結局は専門家の下でなくては良いデータは得られなかった訳であり，少し言い方は悪いが「餅は餅屋」のことわざの意味を痛感した。一方で本研究を通じて異分野間の共同研究の面白さを十分にエンジョイすることができた。ケミカルバイオロジーを専門する筆者と脳神経科学を専門とする重本教授とが連携を組むことで，それまでお互いに想像できなかった学際研究がスタートし，時間をかけて成果にたどり着けた事は研究者として非常に貴重な体験ができたと感じています。今後は，今回の成果をさらに発展させ，リアクティブタグ法を用いたタンパク質複合体解析へと応用したいと考えている。最後になりますが，この場を借りて，共同研究者の重本隆一先生，そして本研究の中心人物である田畑栄一博士に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Schneider, A. F. L.; Hackenberger, C. P. R. Curr Opin Biotechnol 2017, 48, 61–68.
2. Nonaka, H.; Fujishima, S.; Uchinomiya, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. J. Am Chem Soc 2010, 132, 9301–9309.
3. Tabata, S.; Jevtic, M.; Kurashige, N.; Fuchida, H.; Kido, M.; Tani, K.; Zenmyo, N.; Uchinomiya, S.; Harada, H.; Itakura, M.; Hamachi, I.; Shigemoto, R.; Ojida, A. iScience 2019, 22, 256–268.

おうじだ あきお
九州大学 薬学研究院
創薬ケミカルバイオロジー分野
ojida@phar.kyushu-u.ac.jp
http://bunseki.phar.kyushu-u.ac.jp/

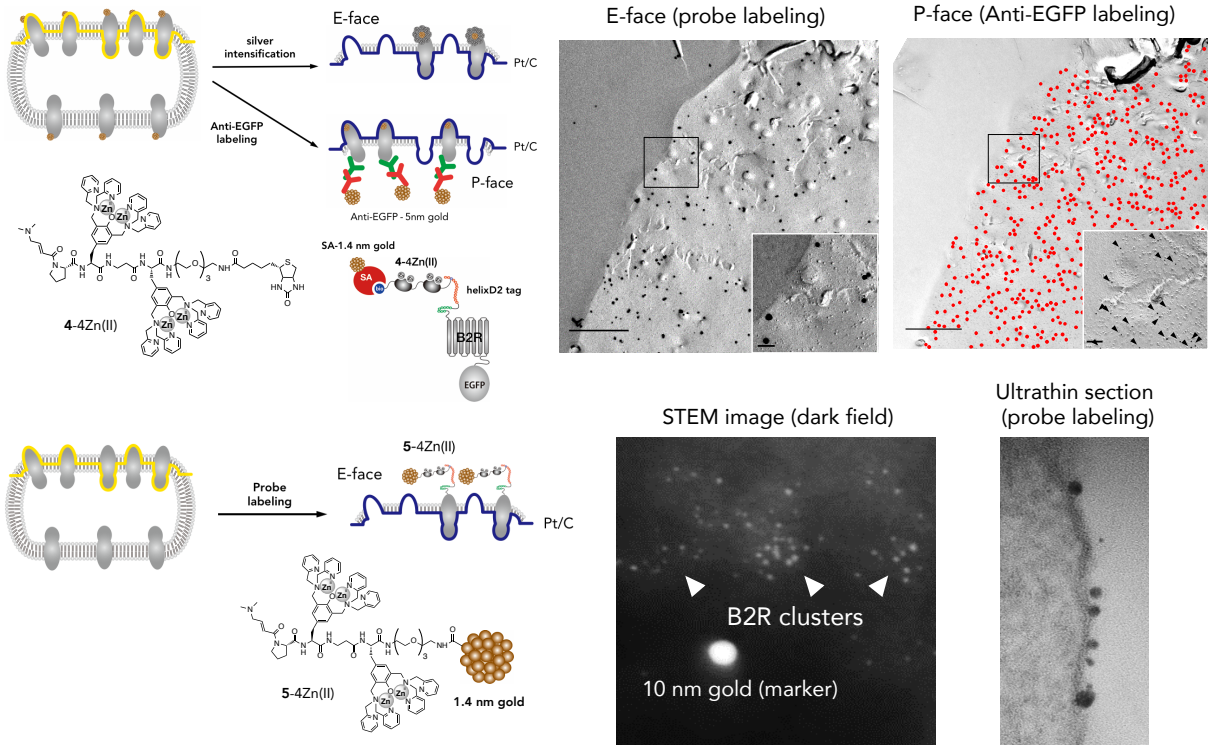


図 4　リアクティブタグ法を用いたブラジキニン受容体の電子顕微鏡検出

北のアカデミア発創薬拠点として

はじめに

野村 尚生

北海道大学 大学院薬学研究院 創薬科学研究教育センターが発足してから 10 年目を目前とした本年に，編集委員の鎌田瑠泉先生から執筆の機会をいただきました野村と申します。ペプチド学会の皆様にもぜひ我々のセンターの存在を知っていただき，さらに創薬シーズの発掘，支援をさせていただきたいとおもい，本センターの概要説明，宣伝をさせていただきます。

創薬科学研究教育センターの概要

本センターは北海道大学 大学院薬学研究院に設置されたアカデミア発の創薬を目的としたセンターになります。平成 23 年より発足しており，創薬研究に適した研究環境・機器の整備を進め始め，現在では設置台数などの規模は小さいものの大手創薬メーカーと遜色ない陣容を整えております。さらに，北海道内外の創薬シーズ発掘，スクリーニング方法の構築，非常に多くのアカデミア化合物ライブラリーを構築している東京大学創薬機構（https://www.ddi.u-tokyo.ac.jp/）化合物ライブラリーの申請支援，北海道大学の化合物を中心とした北大化合物ライブラリーの構築と提供，各種アッセイ系スクリーニング技術の高度化と機器使用支援を進めることで，北海道の創薬拠点として活動を進めてきました。

一般に創薬研究とは，以前は伝統治療薬の有効成分の同定など，宝探しのようにして展開されてきましたが，今日における創薬研究とは様々な疾病，感作などから原因を割り出し，その理解から見出された創薬ターゲットに対し有効な薬剤を発見・創出することです。ステップとしては，創薬ターゲットに対して化合物ライブラリーから有効なヒット化合物を同定するスクリーニング，ヒット化合物の誘導体展開および評価，薬物動態や毒性を確認する ADMET 評価，マウスなどのモデルを用いた動物試験，その後，臨床試験にいたります。そのため創薬研究は，その過程において，生化学などによる原因の解明，有効な薬剤を評価する分析化学や物理化学，新規薬剤への発展を目指した有機化学などを必要とする，総合科学研究になります。専門性を有しながら幅広い知識（まだまだ勉強中ではありますが）を必要とするため，本センターは現在，9 名の専任教員および 1 名の製薬会社出身の技術員，技術補助員等 3 名からなる研究体制を整えており，北海道発創薬にむけて日々，研究および支援活動を進めております。

化合物ライブラリーについて

上述しましたように本センターでは薬学研究院を中心に北海道大学に所属する複数の有機化学系研究室から提供していただいた化合物を中心に北大化合物ライブラリーを構築しております。この化合物ライブラリーは非常に特色のあるライブラリーとなっており，ペプチドはもちろん，核酸関連化合物や糖鎖関連化合物，複数の天然物関連化合物を有したライブラリーになっております。現在までの研究支援活動において，本ライブラリーはヒット率が高いことが判明しており，有用なライブラリーであると我々は考えております。さらに，北大ライブラリーには既存薬ライブラリーも内包しており，現在，日本で上市されているほぼ全ての薬剤（～3600 種類）を整備しております。この既存薬ライブラリーは，すでにヒトでの安全性および薬物動態が確認されているため，新たな薬効を確認することで，創薬ステップをスキップすることができ，非常に低コストで臨床レベルの実験に進むことができます。

さらに，本センターは現在，日本医療研究開発機構「創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業」（https://www.binds.jp/，以下 BINDS）および「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」に採択されており，同事業に基づく連携として，北里大学の大村天然物化合物ライブラリー，東京大学 創薬機構の化合物ライブラリーの窓口としての活動も行なっており，多くの創薬研究に化合物分与支援を行なっております。東大化合物ライブラリーは，20 万化合物を超える非常に強力なアカデミア化合物ライブラリーとなっており，多くの創薬研究を支援しています。北海道からも，本センターを窓口として，北大内外を問わず複数の研究に化合物分与を行なっています。

化合物スクリーニング支援

化合物ライブラリーはあくまでも薬の素であり，この中から薬効を持った化合物をスクリーニングする必要があります。本センターでは，化合物ライブラリーの分与だけで終わらず，この化合物スクリーニングも支援しております。疾病の原因であるタンパク質や，反応，モデル細胞系を用いて，化合物をスクリーニングしますが，実際の実験系がどのようになっているか？ アッセイに必要な時間や費用，再現性などの確認を行います。さらに，標準偏差などからアッセイ系の評価を行い，精度良く化合物を評価可能か診断します[1]。化合物ライブラリーは数千から数万種類の化合物で構成されるため，特にアカデミアでは，費用に関して制約がある点から，例として ¥100/1assay の場合，1 万化合物をスクリーニングしますと 100 万円必要になり，実際に行えるか判断を必要とします。多くの場合，有効な薬効を示す化合物がライブラリー中に複数存在する場合もありますので，化合物ライブラリーの規模に応じたアッセイ系構築ができているかが障壁となっております。また，非常に複雑なアッセイ系の場合，時間がかかり全化合物のスクリーニングが完了するまで，5 年かかった例も我々の支援にはあります。このような長期間のスクリーニングの場合，完了するまでの時間・費用・人員調整といった点を事前に入念に計画することで，有用なヒット化合物を得ることができます。特に，アカデミアの場合，学生の入れ替わりなどもあり，再現よくスクリーニングを行うことができな

い場合も見受けられ，系の再構築や習熟の時間など必要となることもあります。しかし，これらのハイスループットスクリーニングに一見不向きなアッセイ系でもアカデミアでは地道にスクリーニングを実施できるので，企業では難しい系に取り組むことのできるメリットがあります。

標的タンパク質を用いたスクリーニング

私の専門はペプチド・タンパク質工学ですので，主にターゲットタンパク質が確定している創薬研究の支援を主に行なっております。タンパク質と化合物の相互作用を解析する手法は数多く存在します。核磁気共鳴法や等温滴定型熱量計などは非常に感度高く相互作用を解析することができます。また，表面プラズモン共鳴法や水晶振動子マイクロバランス法では簡便に相互作用を解析可能です。しかし，これらの手法では数百種類の化合物程度であればなんとか解析可能ではありますが，数千，数万種類の化合物をスクリーニングするには莫大な労力，時間，費用を要します。そのため，スループット性がよく，感度も比較的高い手法が必要になります。我々のセンターでは，標的分子がタンパク質の場合，示差走査型蛍光定量法（Differential Scanning Fluorimetry；DSF）を用いたスクリーニングを推奨しています[2]。この手法は，タンパク質の熱安定性を解析する手法であり，蛍光色素をタンパク質溶液と混合し各温度での蛍光を測定します（図 1）。基本的にタンパク質は表面が親水性ですので，蛍光色素はタンパク質がフォールディングしている状態では結合することができません。タンパク質の熱安定性に応じて，疎水性領域が表面に露出しますが，その領域と蛍光色素が結合します。水中から疎水性に蛍光色素の環境が変化しますので，蛍光強度は増大されます。最終的にタンパク質は分子間で相互作用し，凝集体を形成しますが，蛍光色素はその際に押し出されてしまい，蛍光強度が減少します。この手法にさらにライブラリー化合物を添加しますと，もしも化合物がタンパク質と相互作用した場合，タンパク質の熱安定性に変化が生じ変性曲線も変化します。この変化量を指標に結合の有無を解析します。専用の機器が必要かと思われる方もいらっしゃるかもしれませんが，温度制御が可能で，蛍光を測定する機器は意外と身近に存在します。リアルタイム PCR 装置です。蛍光色素は Sypro® Orange（Thermo Fisher）を使用しています。リアルタイム PCR 装置では，液量もかなり抑えることができ，5 – 20 µL で測定が可能です。液量を抑えることができると，化合物の添加量も減らすことができます。化合物のストックは 2 mM で分与されるケースが多く，アッセイプレートに直接分注する方法と，娘化合物プレートを作成する方法があります。液量が微量であると，化合物の量もさらに微量になりますので，本センターでは複数の分注機を用いてそれらに対処しています。DSF の場合ですと，アッセイプレートに直接分注する場合が多く，およそ 100 nL 程度を分注したものを作成しています（図 2；実際に分注する装置）。このアッセイプレー

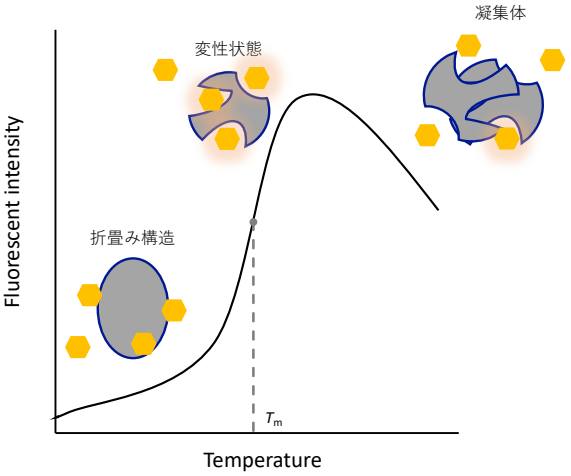


図 1　示差走査型蛍光定量法の概念図変性カーブから変性中点温度を算出することができる。

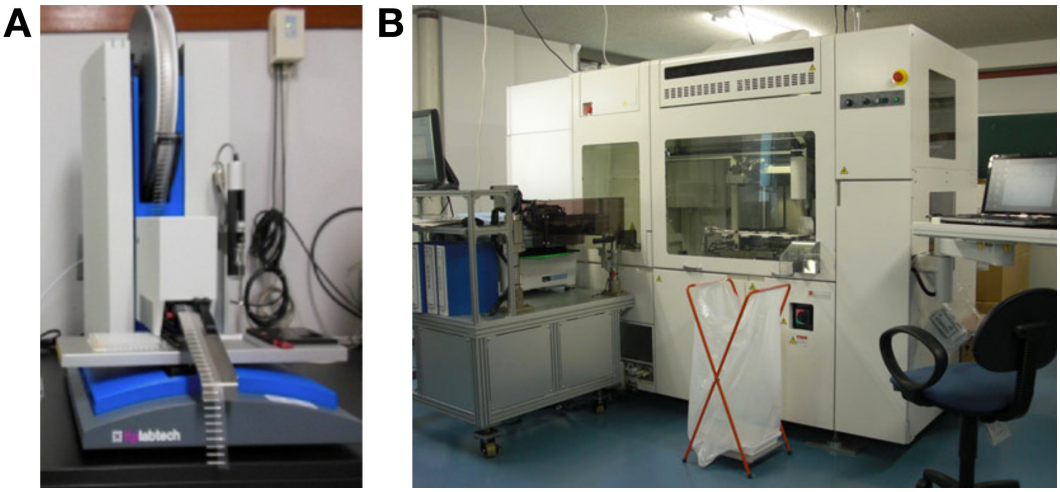


図 2　微量分注装置 Mosquito（A）と創薬支援自動化スクリーニング装置 HORNET-HTS（B）。（A）微量分注できる針が特徴で 50 nL から 1.2 mL までプレートに分注することができる。（B）サンプル調整からアッセイまでを全自動処理可能です。プレートも 96 – 384 ウェルまで対応。

トに混合調製したタンパク質溶液を加え，測定を行います。

タンパク質によっては，表面に蛍光試薬が相互作用しやすいものや，NAD や FAD が補酵素として相互作用しているものなどがあり，これらのタンパク質は DSF に不向きなタンパク質となります。また，多量体構造形成するタンパク質の場合，見かけの変性温度と実際の構造の変性温度に差があり，結果の解釈が難しい場合があります。一般的に，蛍光試薬は低 pH の場合，蛍光強度が増大しますので差を優位に測定するため，それぞれの pH における DSF を条件検討として行うことで，比較的簡単にスクリーニング系構築の情報を得ることができますが，生体内での機能発現に構造変化を必要とするタンパク質などもありますので，実際に作用する pH に近づけ，蛍光強度の変化量を明確に読み取れる条件を探す必要があります。例として，実際にスクリーニングに用いたモデルタンパク質を用いた各種 pH における DSF の結果を示します（図 3）。

もし標的タンパク質で DSF が行えない場合，本センターでは構造が決定されているタンパク質限定になりますが，一度，*in silico* スクリーニングを行い，数百化合物に絞った後，表面プラズモン共鳴解析装置 Biacore T200 や等温滴定型カロリメトリー Auto-iTC200 などの自動化結合解析装置を用いて実際に化合物が標的タンパク質との結合能を解析します[3]。

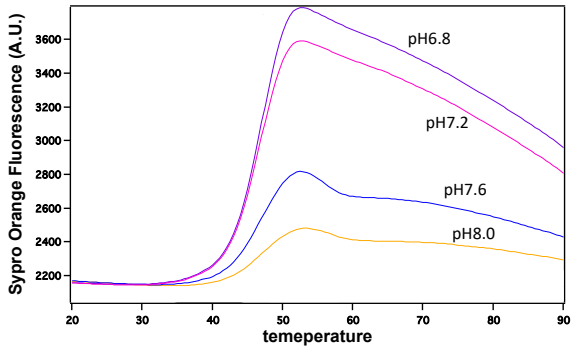


図 3　モデルタンパク質による pH 変化による蛍光強度の変化蛍光強度の変化だけでなく，波形の形状変化から構造変化が予測され，より native 状態でのスクリーニングを行った。

スクリーニング後の支援

上述のように標的タンパク質がわかっている場合の化合物スクリーニングや細胞系を用いたフェノタイプアッセイ（もちろんこちらのアッセイ系も詳細は記載しませんが支援しています）を終えた後，幸いにもヒット化合物を得ることができましたら，その後はヒット化合物の評価を行います。これは有機化学系研究者がさらに加わり，濃度依存性解析などの生化学的データと照らし合わせ，合成展開を見据えて，方向性を決定していきます。また，この際に議論するデータですが，1 次スクリーニングと異なる実験系で 2 次スクリーニング評価がなされていると，偽陽性を除く意味でも好ましいと考えています。1 次スクリーニングが DSF だった場合，化合物を絞れていますので，より直接的に相互作用を解析可能な実験系；表面プラズモン共鳴解析法や熱力学的解析法を用いることができ，特に両手法からは熱力学的パラメータであるエンタルピー変化量が計算されるため，今後の合成展開可能な化合物の選択に大きな情報をもたらします。

北大化合物ライブラリーを用いた場合, 本センターを介してヒット化合物を合成した有機化学系研究者とも円滑に連携することができます。ヒット化合物の類縁体の傾向から，誘導体展開の方向性，その合成法も元々ヒット化合物を合成した研究者ですので，比較的容易に合成を依頼することが可能です。

さらに，ヒット化合物の構造活性相関を進めることで，誘導体展開だけでなく，タンパク質科学的新規発見などの副次的な結果を得ることもあり，核磁気共鳴法や X 線結晶構造解析，加えてクライオ電子顕微鏡解析も本センターでは取り組んでいます。Structure Based Drug Design[4]や Fragment-Based Drug Design[5,6]を複数研究において支援しており，構造生物学からも創薬研究へのアプローチを行なっております。

前臨床研究である動物実験も支援しており，薬効評価のみならず，連携を行うことで ADMET 評価も取り組んでおり，膜透過性などの解析を行える環境を構築しています。本センターでは，東京大学創薬機構（BINDS ケミカルシーズ・リード探索ユニット（構造展開領域））と課題内連携を通して，できるだ

有機化学系実験室　　スクリーニング系実験室　　生化学系実験室

図 4　各種実験室を整備 1 フロアに有機化学系，生化学系，スクリーニング系実験室を完備！ 訪問研究者への貸し出しスペースもそれぞれに整備しています。

● 分注機器
HORNET-HTS
Mosuquito, HydroSpeed
C.Pick EDR-24LS など

● 物理化学測定
円二色性J-820
Biacore T20
Auto-iTC200
VP Capilary DSC
RT-PCR CFX-96, -384
Zetasizer μV など

● フェノタイプアッセイ
Plate reader En Spire,
High content image Operetta
FCM Gallios,
Cell sorter SH800 など

● 有機合成関連
Microwave Initiator8
Semi-auto LC Isolera
UPLC/MS Xevo G2-Qtof など

図 5　創薬スキームと機器運用創薬科学研究教育センターで支援している装置，他にもまだまだあります！

けヒット化合物が決定した早い段階でこれらの評価を行うことで，研究支援者のモチベーションを守るだけでなく，今後の創薬研究の指針として活用しています。

前臨床研究まで全ての試験で良い成績を残した化合物を得た場合，臨床研究に進めますが，本センターでは，これを北海道大学病院 臨床研究開発センターと提携を組むことで，橋渡し研究支援を行なっております。また，知財に関しては北海道大学 産学・地域協同推進機構と提携を組み，特許，製薬メーカーへの導出，ベンチャー企業設立の支援などを行なっています。

以上から，本センターは北のアカデミア発創薬拠点として，シーズ探索の初めから臨床研究，全ての創薬ステップに応じて支援を行っております。創薬研究では各ステップで使用する機器が複雑に入り組んでおり，1 研究室でこれらを揃えて創薬研究を推進するのは非常に難しい現状です。そこで，本センターではこれらの機器を整備，支援運用することで多くの研究者の方に創薬研究に取り組んでいただくことを目指しております（図 4）。上述している機器以外にも質量分析装置やタンパク質調製用 FPLC といった，有機化学系研究者，および生物化学系研究者，それぞれが必要とする機器類をオープンファシリティ化し運用しています（図 5）。詳細は本センター HP などに利用料金（アカデミアは比較的少額での利用可能です）など詳しく記載しておりますので，ご確認の上，必要に応じて利用を検討していただけると幸いです。創薬研究以外でも機器の利用は可能ですので，もし必要とする機器が近隣にない場合，少し遠いかもしれませんが，北海道での機器利用はいかがでしょうか？ 北海道でお待ちしております！（追記；新型コロナウイルスの問題のため，来道するのが難しいかもしれません。機器利用に関しては試料送付の上で，状況によってはこちらで測定可能な場合もございますので，ご相談ください）

北海道大学 大学院薬学研究院 創薬科学研究教育センター
https://japanese-apricot.pharm.hokudai.ac.jp/

参考文献

1. Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. J Biomol Screen 1999, 4, 67–73.
2. Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. Nat Protoc 2007, 2, 2212–2221.
3. Kakuguchi, W.; Nomura, T.; Kitamura, T.; Otsuguro, S.; Matsushita, K.; Sakaitani, M.; Maenaka, K.; Tei, K. Cancer Med 2018, 7, 6269–6280.
4. 本間光貴 蛋白質 核酸 酵素 2009, 54, 1582–1589.
5. Hajduk, P. J.; Greer, J. Nat Rev Drug Discov 2007, 6, 211–219.
6. 半沢宏之；滝沢剛 YAKUGAKU ZASSHI, 2010, 130, 325–333.

のむら たかお
北海道大学 大学院薬学研究院
創薬科学研究教育センター
nomu@pharm.hokudai.ac.jp
https://japanese-apricot.pharm.hokudai.ac.jp/

Acyl Imidazole 反応基を用いた 細胞内蛋白質のラベル化・プロテオーム解析

1）はじめに

三木 卓幸

東京工業大学生命理工学院の三木卓幸と申します。この度は，本ニュースレターへの執筆の機会を頂き，大変光栄に存じます。お声をかけて頂きました鎌田瑠泉先生に心より感謝申し上げます。私は 2016 年に，京都大学・浜地格先生のご指導の下，博士号を取得し

ました。その後，JSR 株式会社でポリマーの研究・開発を 2 年間行った後，2018 年 4 月から東京工業大学・三原久和先生の下でペプチド工学をテーマに研究活動を行っております。現在の研究テーマに関しては，未発表データがほとんどですので，ここでは浜地研究室で行ってきた Acyl Imidazole（AI）反応基を用いた，蛋白質ラベル化技術および，AI 反応基を応用した“コンディショナルプロテオミクス”の開発に関して，最近の進展を含めて述べさせて頂きます。

2）LDAI 化学による Pulse-chase 解析[1]

細胞内では，極めて多様な蛋白質が混在し，これらが動的に相互作用をして複雑なシステムを構築しています。その為，蛋白質の機能や局在は，生きた細胞の中で直接的に解析することが好ましく，“その場解析”を可能にする技術が求められています。一般的には，標的蛋白質に蛍光蛋白質を遺伝子工学的に融合して観察する手法が広く用いられますが，蛍光蛋白質の大きいサイズ（～27 kDa）や発現量の違い等の影響から，そのアーティファクトも問題視されています。より天然の状態に近い手法で蛋白質をラベル化する強力なツールとして，有機化学的ラベル化法が挙げられます。これは，小分子ラベル化剤を生細胞に添加することで，内在的に発現する蛋白質を小分子プローブで修飾する方法です。

これまで，我々は，細胞内で標的の蛋白質を特異的にラベル化する“リガンド指向性ラベル化法”を開発してきました。その 1 つに，“リガンド指向性アシルイミダゾール（LDAI）化学”があります[2]。これは標的蛋白質と結合するリガンドと蛍光色素等のプローブ分子をアシルイミダゾール（AI）求電子剤反応基で連結したラベル化剤を用います（図 1-a）。ラベル化剤が標的蛋白質と相互作用し，AI 基が蛋白質表面上の求核性残基（アミノ酸側鎖のアミンや，水酸基）に近接することで，アシル転移反応が生じます（図 1-b）。この過程で，イミダゾールを有するリガンド部位が脱離し，それに伴いプローブ分子が蛋白質表面に修飾されます。

筆者らは，この LDAI 化学を用いて，細胞表層に存在する膜蛋白質をラベル化し，その局在変化や蛋白質寿命についての解析（Pulse-chase 解析）を行いました。まず，細胞表層に発現する炭酸脱水酵素 CA12 を標的にして，CA12 と親和性を有するベンゼンスルホンアミドリガンドをもった LDAI ラベル化剤を設計・合成しました。このラベル化剤を A549 細胞に添加すると，3 時間のインキュベーションで内在的に発現する CA12 をラベル化できます。その後の細胞培養におけるラベル化 CA12 の減少を western blotting で解析することで，CA12 の寿命が $t_{1/2}$ = 9 hour であることが判明し，また蛍光イメージングの結果から，同様なタイムスケールで CA12 が蛋白質分解を司るリソソームに移行することが明らかとなりました（図 1-c）。

更に，同様な蛋白質寿命や分解経路の解析を GPI アンカー型蛋白質である葉酸受容体や，GPCR であるブラジキニン受容体，NMDA 受容体サブユニットである GluN1 膜蛋白質に対しても適用でき，本手法が膜蛋白質の汎用的なラベル化・解析ツールであることが判明しました。

この LDAI 化学による Pulse-chase 法は，蛋白質の寿命解析（western blotting）とイメージングの双方に適用可能であり強力な解析ツールです。近年でも，LDAI ラベル化法は様々な蛋白質にも適用され，薬剤のスクリーニングなどの様々な応用例が報告されています[3]。

3）コンディショナルプロテオミクス[4]

蛋白質ラベル化法は，反応の特異性を下げて，特定の条件にあった蛋白質“群”を選択的にラベル化することでプロテオーム解析法としても応用が可能です。例えば，Benjamin F. Cravatt らが開発した Activity-Based Protein Profiling（ABPP）は，特定の活性を有する酵素群をラベル化でき，薬剤の off-target 解析などに展開されています。また，Alice Ting らが開発した proximity labeling 法は，特定のオルガネラに存

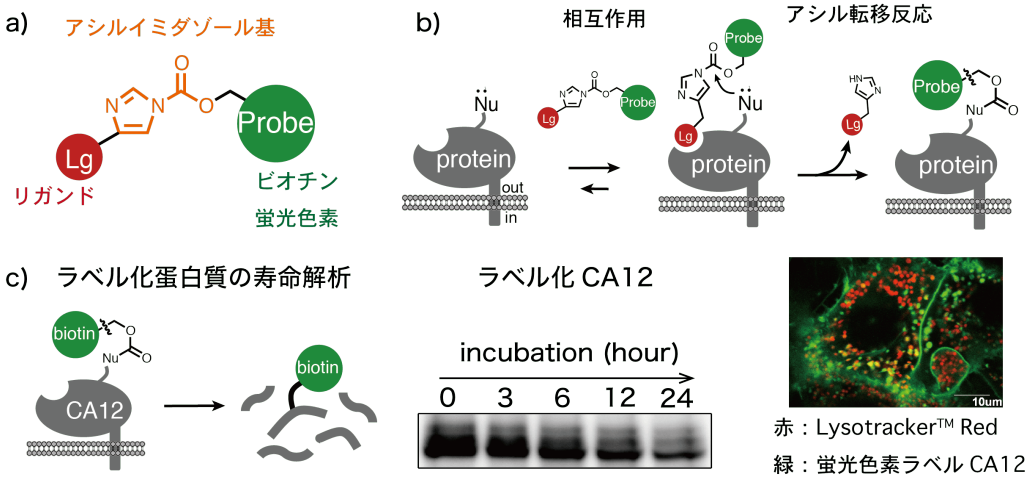


図 1　リガンド指向性アシルイミダゾール化学による蛋白質寿命・分解経路解析。（a）LDAI ラベル化剤の分子構造，（b）LDAI ラベル化反応スキーム，（c）LDAI Pulse-chase 法による内在的に発現した炭酸脱水酵素 CA12 の寿命及び分解経路解析。

在する蛋白質群等を網羅的にラベル化する技術として近年注目を浴びています。

これに対して，我々は細胞内の局所環境に応じた蛋白質群の網羅的ラベル化およびそのプロテオームを解析する “コンディショナルプロテオミクス” を開発することにしました。

まず我々は Zn^{2+} イオン環境に着目しました。Zn^{2+} は，細胞内外でシグナル伝達物質としての働きがあることが示唆されています。例えば，酸化ストレスの際には，細胞内サイトゾルの Zn^{2+} 濃度が一過的に上昇し，その後，Zn^{2+} が特定のオルガネラに隔離されます。しかし，動的に変化する Zn^{2+} シグナルに関与する蛋白質群を網羅的に解析する技術は皆無であり，Zn^{2+} を隔離するオルガネラの正体も明らかではありませんでした。そこで，我々は Zn^{2+} イオンに応じて活性化するラベル化剤を用いて，高濃度 Zn^{2+} 空間に存在する蛋白質群を選択的にラベル化し，解析する方法を考案しました（図 2-a）。

まず，Zn^{2+} イオンに応じて活性化するラベル化剤を開発する必要があります。我々は，前節で述べた LDAI 化学と同じ Acyl Imidazole 基に注目をしました。アシル転移反応の脱離基となるイミダゾールには共役アミンが存在するため，その N 原子に Zn^{2+} が配位するようにジピコリルアミン構造を連結した化合物（AIZin）を設計しました（図 2-b）。ルイス酸性の Zn^{2+} が配位することで，イミダゾール環の電子密度の低下に伴った脱離能の向上により，蛋白質との反応性が加速されると期待しました。実際，Zn^{2+} との錯体形成によって，反応初速度が 23 倍程増加し，Zn^{2+} をキレータ（TPEN）で除去すると反応性が著しく低下することが判明しました。

細胞内透過性の優れた AIZin-2 を用いると，細胞内で Zn^{2+} に応じて蛋白質を Fluorescein 色素でラベルできます。この AIZin-2 を用いて，酸化ストレスにおける Zn^{2+} シグナルに対して “Zn^{2+} コンディショナルプロテオミクス” を実施しました。一酸化窒素ドナー（SNOC）によって酸化ストレスを与えた C6 細胞では，直後では一過的に Zn^{2+} 濃度がサイトゾルで増加し，その数時間には，特定のオルガネラに Zn^{2+} が濃縮されることが Zn^{2+} 蛍光センサー FluoZin-3 による観察から明らかとなっています。

そこで，我々は，酸化ストレスを与えていない C6 細胞，あるいは酸化ストレスを与えて 15 分及び，3 時間経った C6 細胞に対して，AIZin-2 を添加してラベル化を行いました。その結果，酸化ストレスを与えた条件では，多数の蛋白質がラベル化され，さらにそのラベル化された蛋白質の種類は，酸化ストレス後 15 分と 3 時間とで異なることが分かりました（図 3-a）。これは，Zn^{2+} の細胞内の分布が，酸化ストレス後に変化し，それを反映して蛋白質群がラベル化されていることを示唆します。

この 3 条件でラベル化した蛋白質群を LC-MS/MS を用いて定量プロテオーム解析しました。具体的には，ラベル化蛋白質群を anti-Fluorescein 抗体を用いた免疫沈降法によって回収し，trypsin を用いてペプチド断片に消化しました。サンプル間で，ラベル化蛋白質の比較を行うために TMT 安定同位体（刺激なし：Light，SNOC 刺激後 10 min サンプル：Medium，180 min 後サンプル：Heavy）で標識し，これらを等量混合し， LC-MS/MS 解析を行いました（図 3-b）。

その結果，331 個の蛋白質が検出され，その中で酸化ストレス 3 時間後のサンプルで強く検出された 31 個の蛋白質に注目したところ，小胞や ER などに局在する蛋白質群が濃縮されていました。この多くは，ER とゴルジ体の双方に局在することが知られる蛋白質であったため，ER とゴルジ体を行き来する COP-I や COP-II，中間ベシクル（ERGIC，ER-Golgi intermediate compartment）が，未知な Zn^{2+} を貯蔵

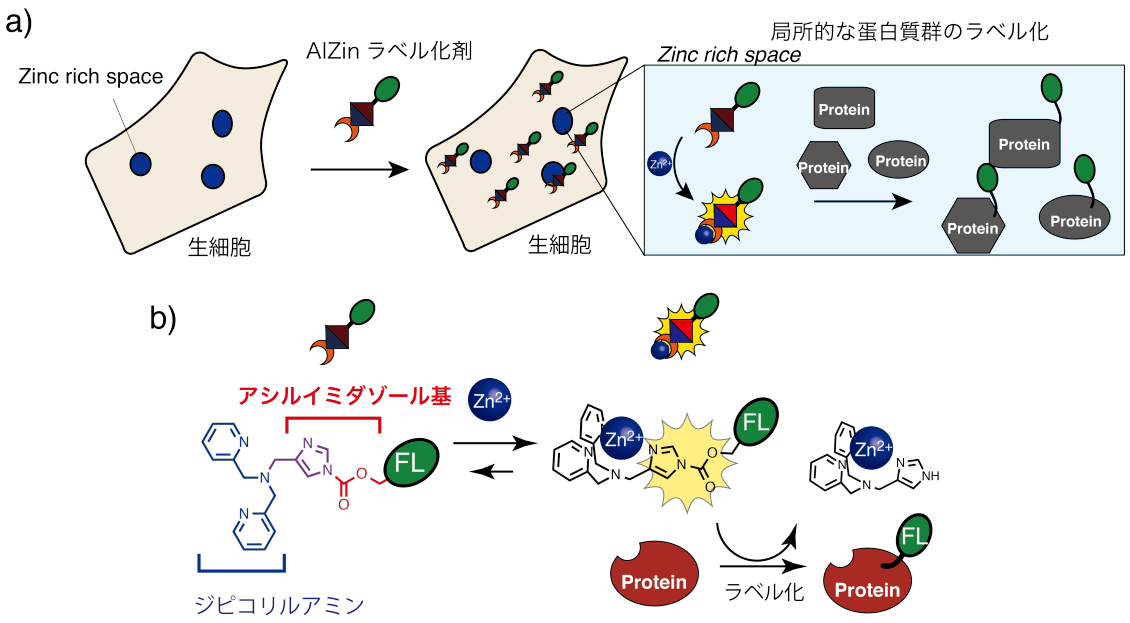


図 2　亜鉛イオン条件的ラベル化。（a）生細胞での亜鉛イオン条件的ラベル化の反応スキーム，（b）AIZin ラベル化剤の構造及び亜鉛イオンによる活性化。

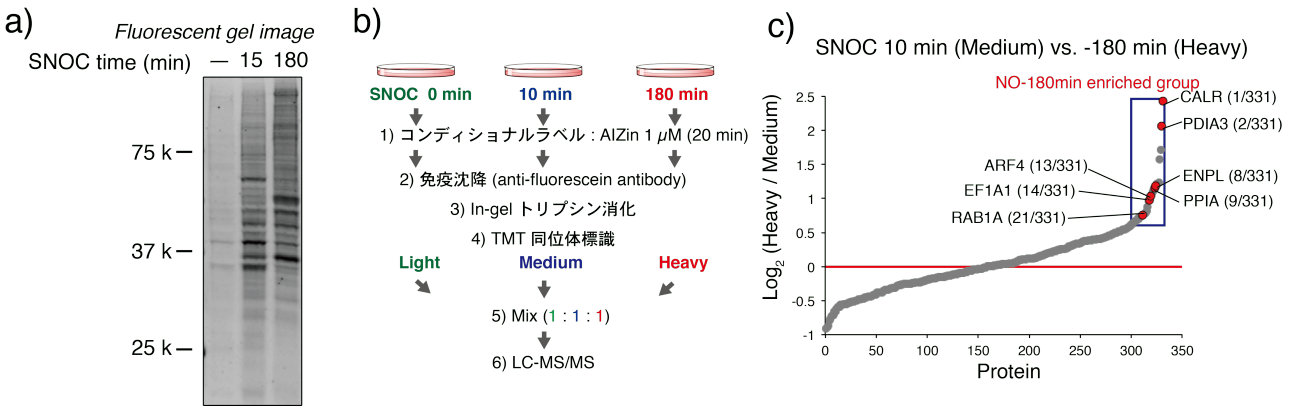


図 3　亜鉛イオン条件的プロテオーム解析。(a) NO 刺激前後の亜鉛イオン応答的な蛋白質ラベル化，(b) ラベル化蛋白質の定量プロテオーム解析方法，(c) NO 刺激 10 分後と 180 分後でのラベル化蛋白質解析。y 軸 ($\mathrm{Log_2}$(Heavy/Medium)) の高い方が SNOC 180 分後でより検出された蛋白質であり，値の序列で検出された蛋白質を 1 つずつ x 軸に沿ってプロットしている。SNOC 180 分サンプルでより検出された、右側の青枠内の蛋白質群（31 個）を解析した。

するオルガネラの正体であると予想されました（図 3-c)。これを確かめるため，酸化ストレスを与えて 3 時間後の Zn^{2+} 分布と ERGIC マーカーの局在を観察すると，双方が極めてよく一致しました。

以上の検討から，SNOC による酸化ストレスによって，一時的にサイトゾル等の細胞全体で Zn^{2+} 濃度が増加することが確認でき，その後に ERGIC をメインとしたオルガネラに Zn^{2+} が濃縮されることが判明しました。

このコンディショナルプロテオミクスは，Zn^{2+} 環境だけではく，最近では一酸化窒素（NO）環境に応答したコンディショナルプロテオミクスに展開しており[5]，さらなる汎用的な手法へと展開しつつあります。

4）おわりに

本研究は，京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻の浜地研究室で行った成果であり浜地格教授，田村朋則講師，名古屋大学 清中茂樹教授に厚く御礼申し上げます。現在は，東京工業大学 生命理工学院の三原久和教授の下で，主に自己集合性ペプチドを応用した研究を行なっております。簡単に申し上げますと，従来開発されてきた de novo 設計の自己集合性ペプチドをタグとして用い，細胞内で蛋白質を集積化する試みを行なっています。

また，最後になりましたが，本稿執筆の機会を頂き，ペプチドニュースレター編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考論文

1. Miki, T.; Fujishima, S.; Komatsu, K.; Kuwata, K.; Kiyonaka, S; Hamachi, I. Chem Biol 2014, 21, 1013–1022.
2. Fujishima, S.; Yasui, R.; Miki, T.; Ojida A.; Hamachi, I. J Am Chem Soc 2012, 134, 3961–3964.
3. Yamaura, K.; Kiyonaka, S.; Numata, T.; Inoue, R.; Hamachi, I. Nat Chem Biol 2016, 12, 822–830.
4. Miki, T.; Awa, M.; Nishikawa, Y.; Kiyonaka, S.; Wakabayashi, M., Ishihama, Y.; Hamachi, I. Nat Methods 2016, 13, 931–937.
5. Nishikawa, Y.; Miki, T.; Awa, M., Kuwata, K.; Tamura, T.; Hamachi, I. ACS Chem Biol 2019, 14, 397–404.

みき たかゆき
東京工業大学 生命理工学院
miki.t.ai@m.titech.ac.jp

短鎖エラスチン様ペプチド（ELP）の環状化による温度応答性自己集合能の増強

1. はじめに

巣山 慶太郎

九州大学基幹教育院・生体分子化学研究室の巣山慶太郎と申します。このたびは本ニュースレターへの寄稿の機会をいただき，心より感謝申し上げます。このような自らの研究を紹介する機会を与えていただいき，大変ありがたく存じます。はじめに簡単に自己紹介をさせていただきます。現在，私はペプチドに関する研究を行っていますが，学生時代に香月 勗先生のもとで有機化学を学んだ経験を活かし[1,2]，下東康幸先生のもとで生物化学の研究を開め，近年においては，特に，ペプチドの化学合成を基盤とした研究を進めています。特に，最近は温度に応答して可逆的な自己集合を示す「エラスチン様ペプチド」(ELP) を合成し，その自己集合の分子メカニズムの解明や ELP を基とする分子ツールの開発に関する研究を行なっています。その過程で私は，短鎖の ELP を環状化することで自己集合能が著しく向上することを見出し，これら環状 ELP の自己集合の分子機構

について報告しました[3]。本稿ではその研究を中心に関連する研究をご紹介したいと思います。

2. 弾性タンパク質・エラスチンとそれに由来するペプチド・ELP の特徴的な自己集合能

「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，エラスチンの生合成には，その前駆体タンパク質・トロポエラスチンの特徴的な性質である「コアセルベーション」が重要とされています。コアセルベーションは「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，これ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 など）が関与していることが知られています。また，この繰り返し配列を模倣したエラスチン様ペプチド（Elastin-like peptide：ELP）も同様に自己集合特性を示し，たとえば，200 残基以上の鎖長を有する $(VPGVG)_n$ 配列を持つ ELP がコアセルベーションを示すことが報告されていました[4–7]。ELP は近年，タンパク質性の分子素材に対してその自己集合能を付与することが可能であること[8]や生体適合性が高いことから，薬物送達システムの担体や組換えタンパク質の精製用タグ[9,10]への応用が期待されています。こうした中，我々の共同研究者であり，長年エラスチンの研究をされてきた前田衣織先生（九州工業大学准教授）は，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・$(FPGVG)_n$ および $(WPGVG)_n$ 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]。これを契機として，我々は，このような短鎖でコアセルベーションを示す ELP が分子素材として有用であるだけでなく，短鎖 ELP のコアセルベーションの分子機構を検証して自己集合に関与する構造要因を調べることにより，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，特に，この (FPGVG) 配列を有する短鎖 ELP のアナログを用いた研究を行ってきました[13–14]。

一方，近年では温度応答性 ELP を基材とする有用な分子素材の開発のため，多様なペプチドを設計す

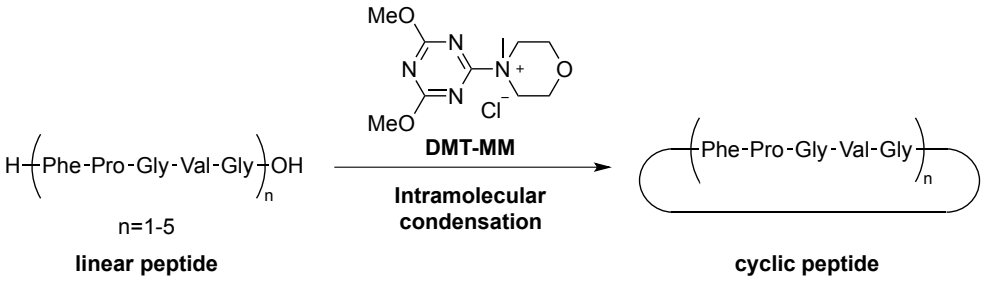


図 1　環状エラスチン様ペプチド cyclo[FPGVG]$_n$ の合成

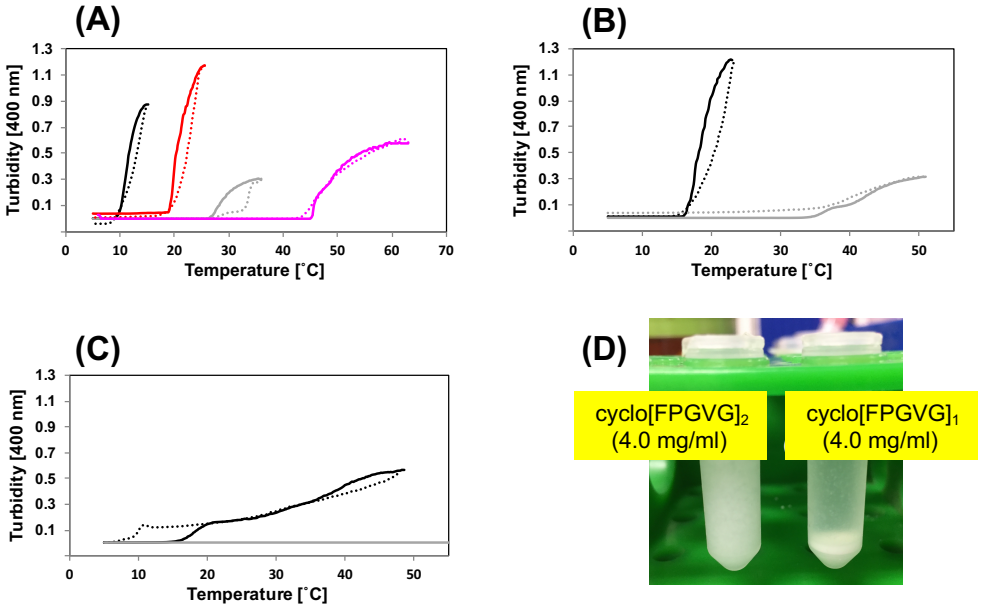


図 2　Cyclo[FPGVG]$_n$ の水溶液の温度変化に伴う濁度変化（実線は昇温時，破線は降温時の変化）。(A) Cyclo[FPGVG]$_5$（黒：4.0 mg/mL，灰色：1.0 mg/mL）および Ac–(FPGVG)$_5$–NH_2（赤：4.0 mg/mL，マゼンタ：1.0 mg/mL），(B) Cyclo[FPGVG]$_4$（黒：4.0 mg/mL，灰色：1.0 mg/mL），(C) Cyclo[FPGVG]$_3$（黒：4.0 mg/mL，灰色：1.0 mg/mL），(D) Cyclo[FPGVG]$_2$（4.0 mg/mL）および cyclo[FPGVG]$_1$（4.0 mg/mL）。この 2 種類のペプチドは 4.0 mg/mL の濃度では水に溶解しなかった。

る研究が展開されています。それらの研究により，高度に分岐した分枝状の構造を有する非直鎖型 ELP は，対応する直鎖型 ELP とは大きく異なる物理的特性（溶解度，粘度，およびタンパク質分解に対する耐性）を示すことが明らかとなり[15–17]，このような非直鎖型 ELP は温度応答性分子素材をデザインするための新たなコンセプトを示す分子になりうると考えられました。我々は新しい非直鎖型ペプチドとして，ELP を環状化して分子のコンホメーションを制限することにより，分子同士がスタックしやすくなり自己集合能が増強するのではないかと考え，(FPGVG) 配列を有する環状 ELP 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，自己集合における環状化の影響および立体構造の解析を実施することにしました。

3. エラスチンペプチドの環状化によるコアセルベーション能の増強

まず，環状化 ELP の原料となる H–(FPGVG)$_n$–OH（n = 1–5）を合成し，N 末端アミノ基と C 末端カルボニル基を縮合させることにより，5 種類の環状 ELP・cyclo[FPGVG]$_n$（n = 1 – 5）を合成しました（図 1）。この反応では水溶性の縮合剤である DMT-MM を使用して室温で反応を行うことにより，ペプチド鎖の伸長を伴うことなく，目的の環状ペプチドが高収率で得られました。続いて，合成した環状 ELP 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（相転移温度）を求めることで，それぞれのペプチドのコアセルベーション能を評価しました。その結果，(FPGVG)$_5$ の直鎖型ペプチドは安定してコアセルベーションを示すには 30 mg/mL の濃度，38 °C の温度を必要とするのに対し，対応する環状 ELP・cyclo[FPGVG]$_5$ は 4 mg/mL という低濃度でも 11 °C 前後でコアセルベーションを示すことが判明しました（図 2）。ELP の自己集合には分子間の疎水性相互作用が重要であると考えられているので，cyclo[FPGVG]$_5$ は環状化によってイオン化される末端官能基を喪失し，疎水性が高くなったことで自己集合能が向上したことが考えられました。しかしながら，この環状ペプチドは H–(FPGVG)$_5$–OH の両末端を保護した直鎖型 ELP である Ac–(FPGVG)$_5$–NH$_2$ より高い自己集合能を示したことから（図 2，3），単純な疎水性の変化ではなく，環状化されたこと，それ自体が自己集合能の向上に寄与していることが明らかとなりました。同様に，より短鎖の環状化 ELP である cyclo[FPGVG]$_4$ および cyclo[FPGVG]$_3$ も同様にコアセルベーションを示しましたが，鎖長が短くなるほど自己集合能は低下しました。一方で，より短鎖の cyclo[FPGVG]$_2$ および cyclo[FPGVG]$_1$ はコアセルベーションを示さず，加えて，配列の繰り返し回数が 3 以上のアナログよりも水溶性が低下していることが明らかとなりました。したがって，これらの短鎖 ELP においては，ある程度のペプチド鎖長を持つことが ELP の自己集合能のみならず水溶性にも関与するのではないかと考えられました。

4. 温度変化に伴う ELP の分子構造変化の解析

現在，ELP の自己集合の駆動力は温度変化に伴う分子間の疎水性相互作用の変化であると考えられています[18]。したがって，自己集合の前後でその相互作用変化の要因となる ELP 分子の構造変化が起こっていると推測されます。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，cyclo[FPGVG]$_5$

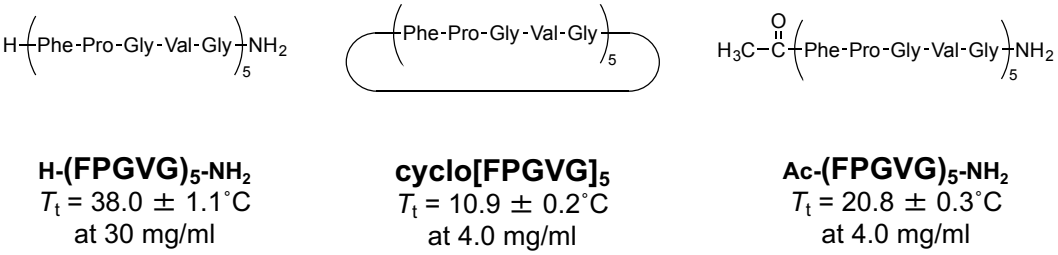


図 3　直鎖型 ELP と環状 ELP の相転移温度の比較

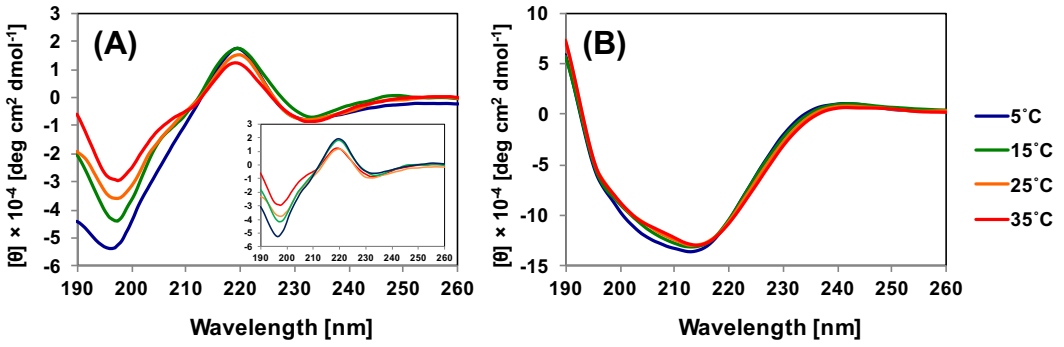


図 4　環状 ELP の温度上昇に伴う CD スペクトルの変化。（A）Cyclo[FPGVG]$_5$（枠内は温度を下降させながら測定した場合の結果），（B）Cyclo[FPGVG]$_1$。

および cyclo[FPGVG]$_1$ の CD スペクトル測定を行いました（図 4）。その結果, cyclo[FPGVG]$_5$ の CD スペクトルは直鎖型 (FPGVG)$_5$ のものと類似しており[12]，スペクトルの形状から，低温においてはポリプロリンⅡ（PPII）ヘリックス様の構造を有することが示唆されました[19]。また，cyclo[FPGVG]$_5$ の CD スペクトルは温度に依存して可逆的な変化を示し，高温では PPII のピークが減少すると同時にⅡ型 β ターン構造に特徴的な 205 nm のピークが出現しました[20]（図 3）。さらに，212 nm に等吸収点（isodichroic point）が存在することから，ペプチドが二種類の状態をとることが示されました[21]。これらの結果から，環状 ELP が溶液中で PPII ヘリックス様の可溶構造から β ターン構造の豊富な疎水的構造に遷移していることが示唆されました。一方で，cyclo[FPGVG]$_1$ のスペクトルは PPII ヘリックス様構造，Ⅱ型 β ターン構造のいずれとも異なる形状を示し，さらに温度変化に伴うスペクトル変化もほとんど見られませんでした。従って，cyclo[FPGVG]$_1$ は環が小さく剛直であるためヘリックス様構造をとることができず，このため水溶性が低下したのではないかと考えられました。この知見は，cyclo[FPGVG]$_5$ 等のコアセルベーションを示す環状短鎖 ELP が，低温において水に溶解するための二次構造あるいは局所構造をとることを示唆するものでした。

5. 環状 ELP・cyclo[FPGVG]$_5$ の凝集体構造の解析

環状 ELP がコアセルベーションに伴って形成する凝集体について，粒径測定と光学顕微鏡による観察を行いました。動的光散乱による粒径測定の結果，cyclo[FPGVG]$_5$ は相転移温度以下で 100 nm 程度の微小な凝集体を形成しており，溶液の温度が相転移温度に達すると微小な凝集体同士が集合して数 μm 程度のコアセルベートを形成することが判明しました（図 5）。また，光学顕微鏡による観察でも，cyclo[FPGVG]$_5$ は 40 °C で 3 μm 程度の凝集体を形成し，4 °C に冷却すると凝集体が解離するという可逆的な変化が見られました（図 6）。さらに，水溶性の色素を含む溶液中で 40 °C に加熱すると，色素を内部に包含した凝集体が観察され，この cyclo[FPGVG]$_5$ の凝集体は 25 °C で 24 時間静置してもある程度安定に存在し，そこから温度を下げると速やかに解離するという性質を示したことより，薬物送達システムの担体をはじめとする温度応答性の分子素材として有用であることが示されました。

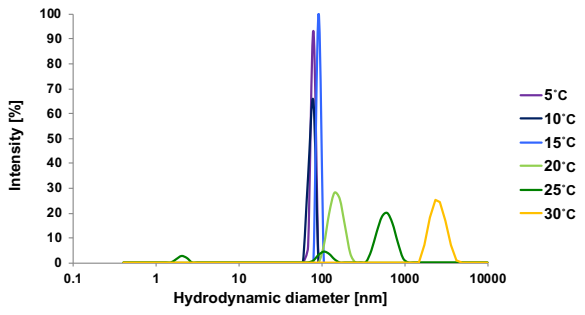


図 5　さまざまな温度における cyclo[FPGVG]$_5$ の粒子径分布

6. おわりに

本研究では，エラスチン様ペプチド (FPGVG)$_n$ を環状化することによって，直鎖型ペプチドよりもコアセルベーション能が著しく向上するが，一方で，鎖長が短いペプチドを環状化すると水溶性が低下することを明らかにしました。また，CD スペクトル測定による構造解析の結果，コアセルベーション能が向上した cyclo[FPGVG]$_5$ は低温では PPII 様のヘリックス構造，高温ではⅡ型 β ターン様構造豊富な構造をとり，この温度変化に伴う分子構造の変化がペプチドの可溶・凝集の状態を制御していることが示唆されました。さらに，cyclo[FPGVG]$_5$ は内部に水溶性化合物を包含した凝集体を形成することが可能であり，この凝集体は 25 °C で 24 時間以上安定に存在し，冷却すると速やかに解離することから，薬物送達システムの担体をはじめとする分子素材に応用できることが示唆されました。このように，本研究ではコアセルベーションの分子機構の本質の探求と，新規環状 ELP の素材として応用を検討するという二つの視点から考察を行いました。このように理学的・工学的な研究が相互に協調しながら進むことによって，エラスチンおよび ELP の研究はさらなる発展を遂げることの可能な分野であると考えられます。ELP という興味深い分子の研究がより発展していくため，当研究室では引き続き主に理学的視点からさらなる研究を進めていきたいと考えています。

本研究は九州大学基幹教育院生体分子化学研究室において実施されたものであり，ご指導いただいた野瀬健先生，前田衣織先生ならびに研究に関わった学生諸氏に心から感謝申し上げます。最後に，本研究を遂行するにあたり，科研費（JP26550068, JP17K20066），株式会社 E&C ヘルスケア，株式会社 ECC の支援をいただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

参考文献

1. Suyama, K.; Matsumoto, K.; Katsuki, T. Heterocycles 2009, 77, 817–824.
2. Suyama, K.; Sakai, Y.; Matsumoto, K.; Katsuki, T. Angew Chem Int Ed 2010, 49, 797–799.
3. Suyama, K.; Tatsubo, D.; Iwasaki, W.; Miyazaki, M.; Kiyota, K.; Takahashi, I.; Maeda, I.; Nose, T. Maeda, I.; Taniguchi, S.; Ebina, J.; Watanabe, N.; Hattori, T.; Nose, T. Protein Pept Lett 2013, 20, 905–910.
4. Kaibara, K.; Akinari, Y.; Okamoto, K.; Uemura, Y.; Yamamoto, S.; Kodama, H.; Kondo, M. Biopolymers 1996, 39, 189–198.
5. 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.
6. Iwanaga, A.; Endo, M.; Maeda, I.; Okamoto, K. Pept Sci 2007 2006, 290–291.
7. Brigida, B.; Antonietta, P.; Maria, C.; Nicolas, B.; Stephanie, Baud.; Manuel D. Soft Matter 2015, 11,

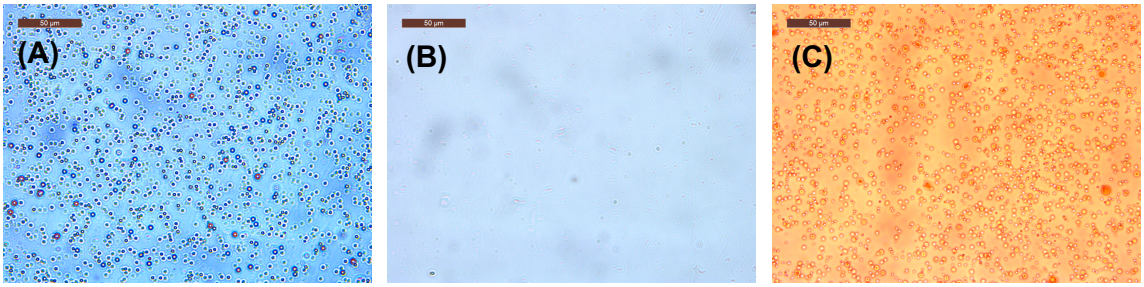


図 6　Cyclo[FPGVG]$_5$ が形成する凝集体の光学顕微鏡による観察結果。（A）40 °C での観察結果，（B）40 °C での観察結果，（C）水溶性色素（カルミン酸）存在下における 40 °C での観察結果。

3385–3395.
8. MacEwan, S. R.; Chilkoti, A. Biopolymers 2010, 94, 60–77.
9. Floss, D. M.; Schallau, K.; Rose-John, S.; Conrad,U.; Scheller, J. Trends Biotechnol 2010, 28, 37–45.
10. Maeda, I.; Taniguchi, S.; Watanabe, N.; Inoue, A.; Yamasaki, Y.; Nose, T. Protein Pept Lett 2015, 22, 934–939.
11. Taniguchi, S.; Watanabe, N.; Nose, T.; Maeda, I. J Pept Sci 2016, 22, 36–42.
12. Suyama, K.; Taniguchi, S.; Tatsubo, D.; Maeda, I.; Nose, T. J Pept Sci 2016, 22, 236–243.
13. Tatsubo, D.; Suyama, K.; Miyazaki, M.; Maeda, I.; Nose, T. Biochemistry 2018, 57, 1582–1590.
14. Zhou, M.; Shmidov, Y.; Matson, J. B.; Bitton, R. Colloids Surf B 2017, 153, 141–151.
15. Bracci, L.; Falciani, C.; Lelli, B.; Lozzi, L.; Runci, Y.; Pini, A.; De Montis, M. G.; Tagliamonte, A.; Neri, P. J Biol Chem 2003, 278, 46590–46595.
16. Navon, Y.; Zhou, M.; Matson, J. B.; Bitton, R. Biomacromolecules 2016, 17, 262–270.
17. McDaniel, J. R.; Radford, D. C.; Chilkoti, A. Biomacromolecules 2013, 14, 2866–2872.
18. Shi, Z.; Woody, R. W.; Kallenbach, N. R. Adv Protein Chem 2002, 62, 163–240.
19. Nuhn, H.; Klok, H. A. Biomacromolecules 2008, 9, 2755–2763.
20. 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/

日本ペプチド学会
第 26 回ペプチドフォーラム 開催報告

「機能性ペプチド材料の創製と評価」
日時：2019 年 10 月 5 日 (土) 13:00〜18:00
場所：鳥取大学工学部 講堂
主催：日本ペプチド学会
共催：日本化学会
後援：高分子学会
オーガナイザー：松浦　和則（鳥取大学 学術研究院 工学系部門）
参加者数：87 名

松浦　和則

日本ペプチド学会第 26 回ペプチドフォーラムは，来年度に第 57 回ペプチド討論会が開催される鳥取において，プレシンポジウムも兼ねて「機能性ペプチド材料の創製と評価」と題して開催されました。近年，ペプチド配列を精密設計することで，期待通りの二次構造・三次構造および集合構造（四次構造）を創製することができるようになっています。また，ランダムライブラリーからのセレクションにより，狙った機能を有するペプチド材料の創製も盛んに行われています。

本フォーラムでは，ペプチドの高次構造を分子デザインすることにより機能性ペプチド材料を創製・評価する研究分野においてご活躍中の玉村啓和教授（東京医科歯科大学），川野竜司准教授（東京農工大学），稲葉央助教（鳥取大学），新井亮一准教授（信州大学），高谷光准教授（京都大学），溝端知宏准教授（鳥取大学）から，以下に示す講演タイトルで貴重なご講演を賜ることができました。ペプチドからなるナノ集合体・イオンチャネル・触媒・細胞機能調節材

写真 1　講演者の先生方（左上から，玉村先生，川野先生，稲葉先生，新井先生，高谷先生，溝端先生）

写真 2　講演中の会場内の様子

料の創製と評価について，講演者から大変興味深い話題を提供して頂き，参加者からも活発な質疑討論が行われました。当日は，大学教職員 23 名，（主に鳥取大学の）学生 62 名，企業関係者 2 名の計 87 名の方に参加いただき，非常に盛況なフォーラムでありました。今回は，あえてペプチド学会に入っておられない先生方にも講演を依頼することで，ペプチド学会の活動を広く知っていただく機会になったかと思います。本フォーラムを通じて，材料化学や創薬・医療への展開に関して討論したことで，「関連分野の研究者同士の新たな交流」も生まれ，非常に有意義な会であったと感じております。

本ペプチドフォーラムのご講演および座長を快諾してくださった諸先生方，三原会長をはじめとする全国各地から参加いただいた先生方や企業の方々，会場係としてご協力いただいた松浦研の学生の皆さん，そして開催にあたりご支援いただきました日本ペプチド学会の皆様にこの場をお借りして心より厚く御礼申し上げます。

最後に，今年の 11 月 9 ～ 11 日に第 57 回ペプチド討論会が，鳥取市のとりぎん文化会館にて開催されます。ちょうどカニが解禁される時期でもありますので，皆さまのご参加をお待ちしております。

講演者（敬称略）および演題（講演順）

1. 玉村 啓和（東京医科歯科大学）
「機能性素材・創薬を指向したペプチドミメティック」
2. 川野 竜司（東京農工大学）
「脂質二分子膜デバイスを用いた膜ペプチド計測」
3. 稲葉　央（鳥取大学）
「Tau 由来ペプチド設計に基づく微小管内部空間の機能開拓」
4. 新井 亮一（信州大学）
「タンパク質ナノブロックによる自己組織化ナノ構造複合体の創製」
5. 高谷　光（京都大学）
「メタル化ペプチドを基盤とする人工酵素の創製」
6. 溝端 知宏（鳥取大学）
「環境応答型分子シャペロンが見せる可逆線維化反応とその応用」

まつうら かずのり
鳥取大学 学術研究院
工学系部門 応用化学講座
ma2ra-k@tottori-u.ac.jp

留学体験記（ダブル・ディグリー・プログラム）

1. はじめに

中川 夏美

私は，北海道大学 大学院総合化学院 生物化学コース 生物化学研究室にて坂口和靖先生のご指導のもと，細胞内でのタンパク質機能の解明による生命原理の理解に努め，4 月より久留米大学医学部化学教室の助教に着任いたしました。博士後期課程において北海道大学 大学院総合化学院とモントリオール大学とのダブル・ディグリー・プログラム生として，癌抑制タン

パク質 p53 における四量体形成ドメインの翻訳後修飾と進化について研究を行い，北海道大学とモントリオール大学より学位を授与されることとなりました。本留学体験記では，私が経験した「ダブル・ディグリー・プログラム」の制度について述べ，博士後期課程 2 年次に一年間（2018 年 4 月〜2019 年 3 月），カナダ・モントリオール大学の James G. Omichinski 先生の研究室に所属していた時の研究および日常生活について報告します。

2. ダブル・ディグリー・プログラムについて

「ダブル・ディグリー・プログラム」は，学生が所属する日本の大学と留学先の海外の大学との両大学にて教育および研究指導を受けることにより，両大学から学位を取得することができるプログラムです。日本の大学に在籍しながら海外の大学にフルタイムの正規生として留学できることが特長です。北海道大学 大学院総合化学院とモントリオール大学は，ダブル・ディグリー・プログラムに関する協定を結んでいます。私は修士 1 年次にモントリオール大学の Omichinski 先生の研究室へ 2 ヶ月間の研究留学をしており，それがきっかけでダブル・ディグリー・プログラムに挑戦しました。一年間留学し研究を行う上で，モントリオール大学の入学試験・入学料・授業料は免除されました。また，一年間留学した上で，在学期間を延長することなく修了できたことも大きなメリットでした。留学中に受講し取得した単位は，北海道大学に単位認定され，単位についても問題なく修了要件を満たすことができました。現在，ダブル・ディグリー・プログラム制度を導入する大学・部局が増えつつあります。北海道大学 大学院総合化学院の新システムでは，私が一人目のダブル・ディグリー・プログラム生でしたので，不安はありつつもファーストペンギンとして挑戦してみようという気持ちでおりました。先生方や事務の方のサポートのおかげで，学位取得までやり遂げることができました。次に挑戦する後輩たちが少しでも楽に取り組んでもらえれば良いなと思っています。

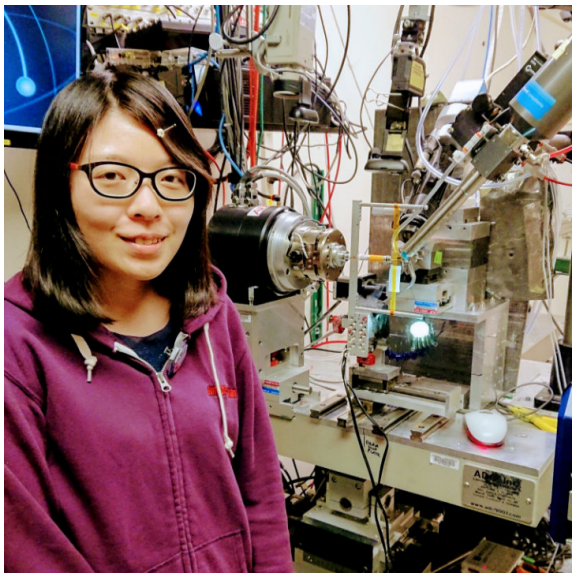


図 1　コーネル大学のシンクロトロン施設にて

3. 研究と学位取得について

私はこれまで，癌抑制タンパク質 p53 の四量体形成ドメインの安定性制御を介した機能制御機構について明らかとすることを目的として研究を進めてきました。p53 は，紫外線や放射線などの遺伝毒性ストレスを含む多様な細胞ストレスに応答し，細胞周期停止やアポトーシスを誘導することでゲノムの完全性を維持するタンパク質であり，その機能発現には四量体形成ドメインを介した四量体化が必須です。修士からは，脊椎動物における p53 四量体形成ドメインの進化について研究を始め，魚類から哺乳類までの p53 四量体形成ドメインの構造安定性解析および転写活性に与える影響を解析してきました。Omichinski 先生は，タンパク質の構造解析におけるプロフェッショナルであり，X 線結晶構造解析および NMR によるタンパク質の立体構造解析を行い，それに基づいてタンパク質–タンパク質相互作用を理解するということを研究室で取り組んでいらっしゃいます。そのためのタンパク質の大腸菌発現・精製の方法や設備，相互作用解析のための等温滴定カロリメトリーなどの装置も整っています。そこで私は，脊椎動物の p53 四量体構造を明らかとするため，四量体形成ドメインペプチドの X 線結晶構造解析を実施しました。計画した生物種のうち，脊椎動物の進化過程で最も重要なシーラカンスの p53 四量体構造を明らかとすることができました。X 線結晶構造解析のため，アメリカ・コーネル大学のシンクロトロン施設を訪問し，自分が作製した結晶の X 線回折を測定させていただき，感激しました（図 1）。

2019 年 1 月には，モントリオール大学側の博士中間報告会があり，坂口先生にモントリオールに来ていただき，Omichinski 先生と副指導教員の Stephen Michnick 先生と discussion を行いました（図 2）。建設的で前向きな discussion をしていただき，アドバイスをいただきました。その中で，education というものを強く認識し，何を質問してどのように引き出すと discussion が楽しく感じられるかを意識しようと思った出来事でした。2019 年 12 月には，Omichinski 先生と Michnick 先生に北海道大学まで来ていただ

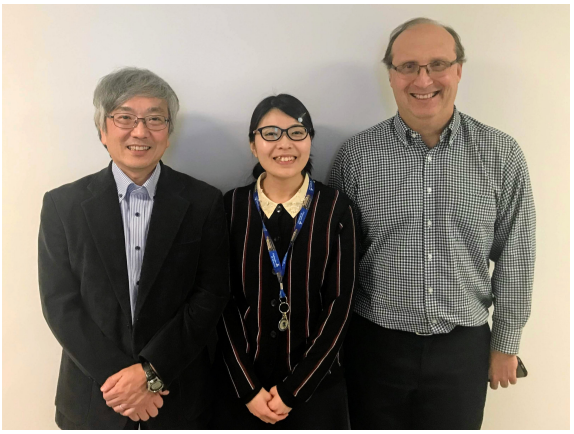


図 2　坂口先生（左）と Omichinski 先生

き，北海道大学，モントリオール大学および外部委員の合計 7 名の審査員による学位論文の defense を行いました（図 3）。公開論文説明会では，defense と同様に英語で発表しました。

4. 日常生活について

モントリオールは，フランス語圏であり，街の看板から道路標識まで全てフランス語で書かれています。モントリオール大学は，私立の名門校で，パリ大学に次ぐ第 2 位のフランス語の大学です（図 4）。学部の講義のほとんどはフランス語で行われますが，研究室では私を含めフランス語を話さない留学生が多く，Omichinski 先生も英語圏のご出身だったこともあり，研究室内においては英語でのコミュニケーションで問題ありませんでした。大学院生向けの講義は，受講する学生に合わせて先生が言語を決めているそうで，私が受けた生体分子の構造解析に関する講義は英語でした。座学で学んだ後には，クライオ電子顕微鏡や小角 X 線散乱（SAXS）などモントリオール大学にある最先端の装置を実際に使う講義があり，大変勉強になりました。ただし，大学からのメールや書類はほとんどがフランス語で書かれていたので，フランス語を話す学生にいつも助けてもらっていました。私は，一年間で簡単な自己紹介と数字くらいなら分かるようになり，初対面の人がフランス語で道を尋ねてきても対応（こちらは英語で）できました。何を言っているかは分からなくても，何を言いたいのかは分かるということを学びました。

実験室と学生たちの居室は，Omichinski 先生と奥様の Pascale Legault 先生の研究室とで共有されています。研究室のメンバーの出身は，カナダ，フランス，スペイン，ドイツ，インド，エジプト，モロッコと様々でした。先生夫妻を含めて，育児と研究を両立させているメンバーも多く，研究の進め方や時間の使い方など，とても参考になりました。1 年の中で，夏のバカンスと冬のクリスマス休暇を本当に楽しみにしている様子でした。バカンスは，各々自分の好きな時期に 1〜2 週間休むので，秘書さんたちもお休みがずれていて，大学全体の機能としてはストップしませんでした。クリスマスは，学科と研究室でのクリスマスパーティーが早めに開催された後，年始まで休みの期間がありました（図 5）。学科のクリスマスパーティーは，前半にビュッフェスタイルのお食事があり，後半はお酒を飲みながらのダンスパーティーでした。先生方や学生の子供たちも会に参加していました。研究室のパーティーは，学生がお料理を一品ずつ持ち寄るスタイルでした。様々な国籍のメンバーが集まっているので，お料理も様々でとても楽しめました。休暇前に仕事を終わらせて，休暇後はリフレッシュしてまた仕事を頑張れるという切り替えがモチベーション維持に重要なのだと感じました。

5. おわりに

ダブル・ディグリー・プログラムへの挑戦を応援してくださり，ご指導いただいた，坂口先生，Omichinski 先生に厚く御礼申し上げます。このプログラムによって得られた経験や気づきは，私の研究者としての将来にとって大きなアドバンテージとなりました。今後は，それらを学生たちに伝えるとともに，多くの学生が留学のチャンスを手にすることを強く願っています。

末筆ではございますが，今回の留学体験記を執筆する機会をくださった鎌田瑠泉先生をはじめとする PNJ 編集委員の先生方に感謝申し上げます。

なかがわ なつみ
北海道大学 大学院総合化学院
生物化学コース 生物化学研究室
（4 月より久留米大学 医学部 化学教室）
nakagawa_natsumi@med.kurume-u.ac.jp

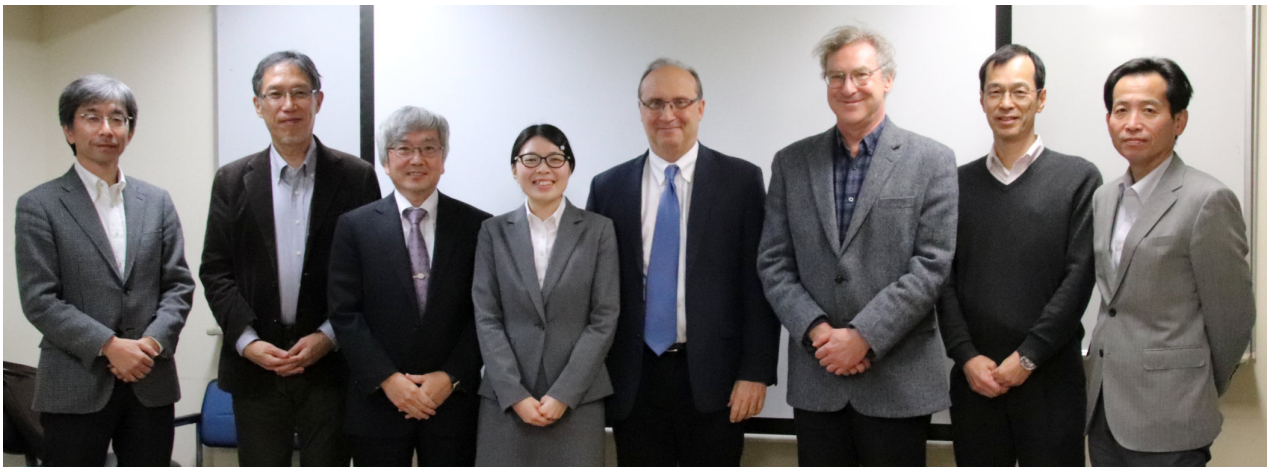


図 3　defense 後に審査員の先生方と

図 4　モントリオール大学 Pavillon Roger-Gaudry

図 5　クリスマスパーティーにて

第 52 回若手ペプチド
夏の勉強会開催中止のお知らせ

第 52 回若手ペプチド夏の勉強会を，2020 年 8 月 10 日 ㈪ ～12 日 ㈬ の日程で，福島県郡山市にて開催する予定でしたが，昨今の新型コロナウイルス感染症の拡散状況及びそれに係る行政の方針等を考慮しまして，本会世話人及び若手ペプチド夏の勉強会幹事会の協議において，誠に残念ながら中止することに決まりました。

次回は 2021 年に，小松徹先生（東京大学），門之園哲哉先生（東京工業大学），三木卓幸先生（東京工業大学）のお世話のもと開催される予定です。

第 52 回若手ペプチド夏の勉強会 世話人
谷口 敦彦，田口 晃弘（東京薬科大学）

若手ペプチド夏の勉強会幹事会 代表
高山 健太郎（京都薬科大学）

2020 年度日本ペプチド学会
「奨励賞」候補者推薦募集

2020 年度日本ペプチド学会「奨励賞」候補者を奨励賞選考規程および内規に従って募集します。下記の「推薦書の作成要領」に従って，会長宛の推薦書類（推薦書および添付の主要論文 3 編からなる）を作成し，日本ペプチド学会事務局まで郵送ください。また，同時に，郵送書類の PDF ファイルを電子メールで送付してください。

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/shorei.doc

書類の送付先：
〒562–0015 箕面市稲 4–1–2
日本ペプチド学会事務局
日本ペプチド学会 2020 年度「奨励賞」候補者受付
PDF ファイルの送付先：
日本ペプチド学会事務局
E-mail：jps@peptide-soc.jp
締切：
2020 年 5 月 31 日（郵送分は消印有効）

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にお願いいたします。

推薦書の作成要領：

1. 所定の様式に従って，A4 判用紙に作成のこと。
2. 1 頁目に，推薦者および被推薦者とも，日本ペプチド学会会員番号を明記すること。
3. 1 頁目に，被推薦者の生年月日および年齢を明記し，奨励賞選考規程および内規に準じていることを明示すること。
4. 推薦者は 1 頁目に氏名を記入し，捺印した書類を郵送，送付すること。ただし，PDF ファイルでは捺印無しのものを送付しても良い。
5. 「推薦理由」は 2,000 字程度で記載すること。
6. 対象の研究業績リストは，新しい年代のものから順に番号を付して記し，主要論文 3 編には番号の前に◎印を付すこと。なお，主要論文 3 編のコピー（各 1 部）を添付すること。電子メールで送付の書類では，各論文の PDF ファイルを同時に添付して送付すること。
7. ペプチド討論会での発表リストは，新しい年代のものから順に番号を付して記し，本人が発表のものには番号の前に○印を付すこと。

Akabori Memorial Award 2020
授賞候補者推薦募集（予告）

Akabori Memorial Award 2020 授賞候補者の推薦募集について，2020 年 4 月頃（予定）に学会ウェブサイトにてお知らせいたします。募集締切は 6 月を予定しています。

受賞者の方には，2020 年 11 月 9 日～11 日に鳥取で開催される「第 57 回ペプチド討論会」にて受賞講演を行っていただきます。

2020 年度行事予定

2020 年 4 月 25 日 ㈯
第 103 回新旧合同理事会（ウェブ会議，メール審議）

2020 年 8 月 10 日 ㈪ ～12 日 ㈬
第 52 回若手ペプチド夏の勉強会（中止）

2020 年 11 月 8 日 ㈰
日本ペプチド学会市民フォーラム 2020
場　所：とりぎん文化会館（鳥取県鳥取市）
世話人：松浦 和則（鳥取大学）

2020 年 11 月 8 日 ㈰
第 104 回理事会・第 39 回評議会合同会議

2020 年 11 月 9 日 ㈪ ～ 11 月 11 日 ㈬
第 57 回ペプチド討論会
場　所：とりぎん文化会館（鳥取県鳥取市）
世話人：松浦 和則（鳥取大学）

2020 年 11 月 10 日 ㈫
2020 年度日本ペプチド学会通常総会

2021 年 1 月（予定）
第 105 回理事会

新編集委員

矢野 義明

本年より PNJ の編集委員を担当させて頂きます，京都大学の矢野と申します。ペプチド学会の皆様にはいつもお世話になり，常日頃から研究者として多くの刺激を頂いており感謝しております。編集委員として，先生方にお願いする事が多々あると思いますが何卒ご協力のほどよろしくお願い申し上げます。

編集後記

ペプチドニュースレター No. 116 号をお届けいたします。本号では，ペプチド・タンパク質化学やアカデミア発創薬まで幅広い分野の先生方にご執筆をお願いしました。また，第 26 回ペプチドフォーラムの開催報告，留学体験記をご寄稿いただきました。どうぞお楽しみください。本号でも読者アンケートを実施いたします。ご協力のほどよろしくお願いいたします。

新年度が始まりましたが，新型コロナウイルスへの対応で皆様は慌ただしい日々をお過ごしかと思います。また，今年度の若手ペプチド夏の勉強会が非常に残念ながら中止となるなど，大きな影響が出ております。この状況がいつまで続くのかはわかりませんが，一日でも早く通常の生活が送れるようになることを願っています。

116 号アンケートフォーム URL：
https://forms.gle/6Up6qQDES4LtgyG5A

（編集委員：鎌田 瑠泉）

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 4 月 27 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
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
矢野 義明（京都大学大学院薬学研究科）
TEL 075-753-4529，FAX 075-753-4578
E-mail：yano.yoshiaki.6z@kyoto-u.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：鎌田 瑠泉）