



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.119

2021年1月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

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

新年のご挨拶

新年あけましておめでとうございます。

昨年4月に新型コロナ感染拡大の初期に会長を拝命し、変わらないコロナ禍の中で年を越してしまいました。早期のワクチンと治療薬の開発が望まれるところですが、しばらくはコロナ禍が続くものと予想されます。私の会長任期中に新型コロナが収束して終息することを願うばかりです。

2020年は新型コロナによるパンデミックで、緊急事態宣言や東京オリンピック延期など時代が一変する年でした。テレワークやオンライン授業の拡大、ニューノーマルといった生活様式、皆様の生活も大きく変わったのではないのでしょうか。日本ペプチド学会においても、会員の皆様のご協力により、新たなスタイルによる学会活動を行ってまいりました。本年度の理事会と評議員会はすべてオンラインで行いました。通常総会は書面総会として開催しましたところ、会員数329名中185名が投票し議決権行使をしていただき、議案の採決を行うことができました。56%を超える会員の皆様に投票いただけたこと大変感謝致しております。

日本ペプチド学会の最も重要な活動である2020年度ペプチド討論会は鳥取大学の松浦和則先生と河野強先生のお世話により11月9～11日の日程で、初めての試みとなるオンラインで開催されました。討論会の概要は本ニュースレターの開催報告を見ていただけたとわかりますように、初めての試みということもあり多少戸惑うところもありましたが、大変盛会のうちに終わることができました。改めて、松浦先生、河野先生、スタッフの先生方のご尽力に感謝申し上げます。今回のオンライン開催からいろいろなことを学んだのではないかと思います。講演はオンラインの方がしっかり聞くことができるし、質疑応答も十分に行うことができます。ポスターも10分間程度のポスター説明動画を見た後に各ポスターのZoomの部屋でリアルタイムに十分な討論ができたのではないかと思います。本来の目的である研究発表を聞いて理解して討論することに関してはオンライン開催の方が適しているかもしれません。しかし、学会で最も重要な交流と



野水 基義

いった面では、オンラインでは難しいのではないのでしょうか。実際に会場に集まり、顔を見ながら討論するといったこれまで行われてきた「ふれあい」が足りないような気がします。鳥取での開催にも関わらず、実際には各自の職場あるいは自宅からの参加となりました。懇親会で期待していたカニをはじめとした鳥取の料理、参加者の方々と親睦を深めるといったこれまでの学会ならではの醍醐味がない点が寂しく感じました。通常開催が待ち望まれますが、アフターコロナの時代においてもこのオンライン開催の良かった点を反映させていくことが必要かもしれません。また、2020年度第21回若手ペプチド夏の勉強会は谷口敦彦先生（東京薬科大学）、高山健太郎先生（京都薬科大学）、田口晃弘先生（東京薬科大学）が世話人として8月に福島県郡山市での開催を計画・準備していただきましたが、中止になりました。150人もの若手が集まり合宿形式での研究発表とディスカッション、更には親睦を深めることは、このコロナ禍の状況では不可能でした。残念ながら中止になりましたが、準備していただいた世話人の先生方に感謝したいと思います。

2020年度は日本ペプチド学会が授与する Akabori Memorial Award 選考の年にあたっており、赤路健一先生（京都薬科大学）に選考過程の取りまとめを行って頂きました。この場をお借りして、改めて赤路先生に御礼申し上げます。2020年度 Akabori Memorial Award は、世界各地の選考委員による厳正な選考の結果、Philip E. Dawson 先生（米国、スクリップス研究所）が受賞されることに決定いたしました。2021年度第58回ペプチド討論会において授賞講演を予定しています。日本ペプチド学会奨励賞につきましても別途選考委員会による選考が行われ、澤田俊樹先生（東京工業大学）と田口晃弘先生（東京薬科大学）のお二人が受賞者に決定いたしました。総会にて奨励賞受賞者の授賞セレモニーができなかったことは残念ですが、2020年11月の第57回ペプチド討論会でそれぞれの受賞内容について講演されました。また、2020年度のJPSトラベルアワードは、Barcelona (Spain) で開催予定であった第36回 European Peptide Symposium (EPS) / 第12回 International Peptide Symposium (IPS) に大川内健人氏（徳島大）、小吹桃子氏（大阪府立大）、坂口周弥氏（北海道大）、中村里菜氏（高知大）の4名が選考されましたが、2021年に延期されました。第24回 Korean Peptide Protein Symposium や第16回 Chinese International Peptide Symposium も国

内開催あるいは On-line/Off-line 併用開催となり、JPS トラベルアワードの募集も行いませんでした。世界的な新型コロナの終息が待たれるところです。

2021 年度は、若手ペプチド夏の勉強会、ペプチド討論会が予定されています。2021 年度第 22 回若手ペプチド夏の勉強会は、石川県金沢市において開催予定で、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）が世話人として準備をしていただいています。世話人の方々の色々なアイデアによりハイブリッド形式での開催が検討されています。ウィズ&アフターコロナ時代の新しい学会の流れができることに期待したいと思います。また、第 58 回ペプチド討論会（2021 年 10 月 20 ～ 22 日）と市民フォーラム（10 月 23 日）は、林良雄先生（東京薬科大学）のお世話で東京都八王子市での開催が準備されています。状況次第となりますが、従来型の討論会と懇親会の開催を計画されています。皆様に八王子でお会いできることを楽しみにしたいと思います。

2021 年度には、延期されました第 36 回 EPS / 第 12 回 IPS が 8 月に予定されております。2021 年に、Whistler (Canada) で開催予定の International Peptide Symposium となる第 25 回 American Peptide Symposium は 2022 年に延期されました。世界中の学会がオンライン開催あるいは延期となっている現状です。情報が入り次第、ホームページ等でご案内していく予定です。若手学会員の皆様が関連の国際学会に参加される JPS トラベルアワードの募集ができるようになることを祈るばかりです。

2021 年の学会事業においても新型コロナの状況に即した様々な対策が必要になってくると思います。新たなスタイルによる学会活動が求められてくると思いますが、会員の皆様の役に立つ学会活動を行っていきたいと思います。最後になりましたが、皆様方の健康と研究の進展を祈念して、新年の挨拶とさせていただきます。

のみず もとよし
第 16 期日本ペプチド学会長
東京薬科大学薬学部
nomizu@toyaku.ac.jp

第 57 回ペプチド討論会（オンライン）開催報告

第 57 回ペプチド討論会は、全世界で新型コロナウイルスの感染拡大が収まらない中、2020 年 11 月 9 日(月)から 11 日(水)の日程で、鳥取大学の松浦・河野が世話人代表として開催させていただきました。当初は鳥取県鳥取市にある「とりぎん文化会館」での開催を予定しておりましたが、感染拡大防止のため、やむをえず、本討論会は日本ペプチド学会 31 年の歴史の中で初めての「オンライン開催」となりました。我々世話人にとって、討論会のお世話をさせていただくことが初めてというだけでなく、初めてのオンライン開催の



松浦 和則



河野 強

ため、何をやるにしても手探り・試行錯誤で進めざるを得ず、参加者の皆様方には大変なご心配・ご迷惑・ご不便をおかけしたことかと思えます。オンライン開催のために、発表者および参加者が激減するのではないかとかなり心配していましたが、おかげさまで、実際には一般・学生・招待・賛助会員含め、計 297 名もの方々にご参加いただきました。今回の討論会では、口頭発表 39 題（内訳：受賞講演 2 演題、招待講演 3 演題、一般口頭発表 18 演題、若手口頭発表 16 演題）、ポスター発表 103 題の申し込みを頂くことができました。このような状況下にも関わらずオンライン講演いただきました先生方に重ねて感謝申し上げます。

本年度の討論会では、招待講演として、Max Ryadnov 先生（National Physical Laboratory, UK）、浜地格先生（京都大学大学院工学研究科）、佐竹炎先生（サントリー生命科学財団）の 3 名の先生方にご講演いただきました（図 1）。オンライン開催のため懇親会が無いにも関わらず、招待講演をご快諾していただきました先生方に厚く感謝申し上げます。Max Ryadnov 先生は、「Peptide bionanodesign: Old forms for new functions」というタイトルで、分子設計ペプチドによる人工細胞外マトリックスや、抗菌性ペプチド、ウイルス様ペプチド集合体の創製に関して、研究哲学から最近の成果までをご講演いただきました。途中何回か、イギリスからの Zoom の接続が途切れるなどのトラブルがあり

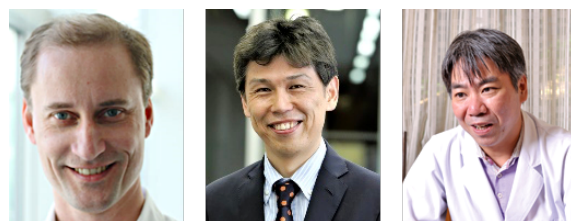


図 1 招待講演者：Max Ryadnov 先生（左）・浜地格先生（中央）・佐竹炎先生（右）

ましたが、貴重なお話が聞けて充実した時間を過ごせました。浜地格先生は、「Chemical modification of endogenous proteins in living systems」というタイトルで、細胞内のような分子夾雑環境下で標的タンパク質を特異的にアフィニティーラベル化する有機化学的手法の最近の成果についてご講演いただきました。反応活性基を有するアフィニティーラベル化分子の設計のエレガントさだけでなく、細胞内在性タンパク質の選択的ラベル化により、バイオイメーキング・プロテオミクス解析・ニューロン機能の解析など多岐にわたる応用を示され、大変感銘を受けました。佐竹炎先生は、「Neuropeptides, receptors, and their biological roles in the sister group of vertebrates, *Ciona intestinalis* Type A」というタイトルで、モデル生物ホヤの様々な短鎖神経ペプチドの産生細胞をイメージング質量分析法 (Imaging MS) を用いて可視化し、さらに、ペプチド受容体との位置関係から生理学的分子機構に解釈を与える方法論と最近の成果についてご講演いただきました。

討論会初日の若手口頭発表では、最優秀賞 (Excellent Stone Award) として Arafles Valenzuela Jan Vincent さん (京都大学) と佐々木愛理さん (東京薬科大学) の 2 件、優秀賞 (Good Stone Award) として Cui Yan さん (東京薬科大学)、坂本健太郎さん (京都大学)、大川内健人さん (徳島大学) の 3 件の演題が選ばれました (図 2)。ポスター発表でも事前投稿動画と Zoom によるリアルタイムディスカッションにより活発な意見交換が行われ、7 題がポスター発表優秀賞に選ばれました [受賞者: 加茂直己さん (東京大学)、宮本恵里花さん (慶應義塾大学)、谷愛海さん (北海道大学)、藤田聖矢さん (京都大学)、金田有加さん (大阪府立大学)、水沼正昂さん (新潟大学)、宇野早映さん (北海道大学)] (図 2)。受賞者の皆さんには、ご受賞のお祝いを申し上げると同時に、ご研究の益々の発展およびペプチド科学へのさらなる貢献をお願いしたいと思います。また、若手口頭発表賞およびポスター発表優秀賞の選考にあたっていただきました先生方にあらためて御礼申し上げます。

討論会 3 日目には、日本ペプチド学会「奨励賞」の受賞講演を行いました。2020 年度の「奨励賞」は、澤田敏樹先生 (東京工業大学)「フェージ提示ペプチドに基づく機能性ソフトマテリアルの創製」ならびに田口晃弘先生 (東京薬科大学)「ジスルフィド形成

を基盤とする新しいペプチド合成法の開拓 -Npys 化学の再発見-」のお二人に授与されました。両先生の益々のご研究の発展を祈念するとともに、若手研究者の交流の活発化をお願いする次第です。

例年の対面式の討論会ならば企業の製品展示・ランチョンセミナーがありました。今回はオンライン開催のため、3 日間のお昼の時間に「オンラインセミナー」として 4 社の企業様 (アステック株式会社、浜理薬品工業株式会社、SCIEX (株) エービー・サイエックス)、CEM Japan 株式会社) の製品・技術に関するご講演を Zoom で行っていただきました。また、本オンライン討論会開催にあたり、多くの企業・団体様に御寄附、協賛、要旨集広告・バナー広告掲載のお申込みを頂き、多大なご支援を賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本オンライン討論会の準備と運営、プログラム編成等にご協力頂きました、鳥取大学の岩崎崇先生、櫻井敏彦先生、稲葉央先生、八木寿梓先生ならびに各研究室の学生さんに心より御礼申し上げます (図 3)。事務、Web システム取扱に多大なご協力を頂いていた学会事務局の宮嶋令子様、森川和憲様に心より御礼申し上げます。また、Zoom によるオンライン開催システムについてご協力いただきました (株) ブランドコンセプト社の皆様に心よりお礼申し上げます。さらに、討論会開催のノウハウを懇切丁寧に教えて頂きました玉村啓和先生を初めとする第 56 回ペプチド討論会組織委員の先生方、様々なアドバイスを頂きました野水基義会長、三原久和前会長に心より御礼申し上げます。

来年度の第 58 回ペプチド討論会は、東京薬科大学

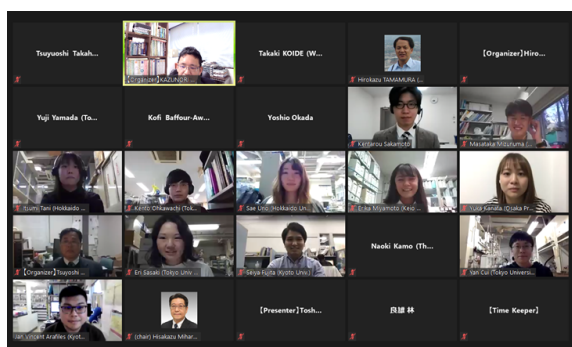


図 2 若手口頭発表賞・ポスター発表優秀賞受賞者 (Zoom 画面)



図 3 オンライン会場係の様子 (上) とメンバー (下)

の林良雄先生のお世話により 2021 年 10 月 20 日～22 日に東京都八王子市学園都市センターで開催される予定です。その頃にはこのコロナ禍が収まって対面式の討論会が開催されることを祈念したいと思います。

まつうら かずのり
鳥取大学 学術研究院 工学系部門
ma2ra-k@tottori-u.ac.jp
かわの つよし
鳥取大学 大学院持続性社会
創生科学研究科 農学専攻
kawano@tottori-u.ac.jp

令和二年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

この度は、日本ペプチド学会奨励賞という名誉ある賞をいただき、大変光栄に存じます。学会長の野水基義先生、選考に関わりました諸先生方に心より御礼申し上げます。本稿では、受賞研究である「ジスルフィド形成を基盤とする新しいペプチド合成法の開拓 -Npys 化学の再発見-」について概説させていただきます。



田口 晃弘

1. はじめに

私は、東京薬科大学を卒業後、同学大学院に進学し、林良雄先生のご指導のもと研究人生が始まりました。大学院ではペプチド創薬研究に従事し、「ネガマイシンによる遺伝病治療薬の創製研究」にて、学位を取得しました。遺伝病の約 2 割は、ナンセンス変異により構造遺伝子中に未熟終止コドン (PTC) が生じ、機能を有さない不完全長なタンパク質が生成することで発症します。天然由来ジペプチド型抗生物質ネガマイシンは PTC を読み飛ばし (リードスルー)、完全長タンパク質を発現させる作用を有します。この様なリードスルー活性を有する低分子化合物は、遺伝病治療薬の創薬シーズとして期待されています。私は、これまでにネガマイシンの創薬展開に必須な全合成経路の開発¹、や高リードスルー活性を有する誘導体の創製に成功しました^{2,3}。このペプチド創薬研究を通して、私はペプチド科学の重要性やペプチド研究の基礎を学ぶことができました。

学位取得後、私は林研究室の助教に着任し、新たにジスルフィドペプチドの効率的合成手法の開発に着手しました。ペプチドやタンパク質中に存在するジスルフィド結合は、その立体構造を固定化することで、生理機能の発現や酵素等に対する安定性向上に寄与します。一般的なジスルフィド結合の構築は、空気 (DMSO) 酸化やヨウ素酸化が挙げられますが、分子間反応を抑えるために大希釈条件下で酸化反応を行います。そのため、煩雑な反応溶媒の除去や精製操作が必要です。これまでに多様なジスルフィド結合構築法が開発されてきましたが、その中でも 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル (Npys) 基の化学は、様々なジスルフィドペプチドの合成に応用されてきました⁴⁻⁶。Npys 基は保護基として用いられますが、システイン側鎖 (チオール基) の保護においては、活性ジスルフィドとしても機能します。そのため、側鎖無保護のシステインが共存すると、活性ジスルフィドとのジスルフィド交換反応が選択的に進行し、最終的にジスルフィドペプチドが得られます (図 1)。我々は、このユニークな Npys 基の化学を基盤に、より効率的な中分子ジスルフィドペプチドの独自合成法、および新規ジスルフィド形成試薬の開発を実施してきました。以下にその概説を述べさせていただきます。

2. ワンポット固相ジスルフィドライゲーション法の開発

我々は、固相担持型 Npys-Cl を用いたワンポット固相ジスルフィドライゲーション法 (Solid-phase disulfide ligation; SPDSL) を開発しました (図 2)⁷⁻⁹。本法は、2 つの異なる分子、またはペプチドフラグメントから成るジスルフィド架橋体の効率的合成が可能です。図 2 に示すように本法は、2 つの工程で構成されます。まず、1 段階目として保護チオールを有する分子を Npys-Cl 樹脂と反応させ、活性ジスルフィドとして樹脂上に担持させます。得られた樹脂を洗浄した後、2 段階目として、樹脂上の活性ジスルフィドと無保護チオール基を有する分子とのジスルフィド交換反応により、ジスルフィド架橋体が反応溶液中に生成します。最後に反応溶液をろ過するだけで、高純度のジスルフィド架橋体を得ることが可能です。従来の液相法では困難な溶解性の異なる同士のジスルフィド架橋体 (例えば、難水溶性抗がん剤-水溶性ペプチドから構成される架橋体) も SPDSL 法を用いることで簡便かつ効率的に合成可能です^{8,9}。これより、SPDSL 法は多機能人工ペプチドや人工ジスルフィドタンパク質の様な有機分子の創製に繋がると考

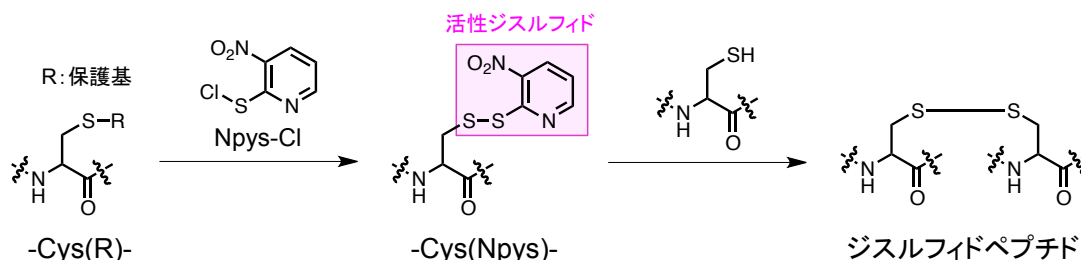


図 1 Npys 基による活性ジスルフィドを利用したジスルフィドペプチドの合成

えられます。また、SPDSL 法はペプチド分子のみならず生体分子の機能探索，創薬等，広範な研究領域において貢献できると期待されます。

3. ジスルフィド駆動型環状ペプチド合成法の開発

上記の SPDSL 法を基盤技術とし，新たな環状ペプチド合成法としてジスルフィド駆動型環状ペプチド合成法（Disulfide-driven cyclic peptide synthesis; DdCPS 法）を開発しました^{7,10}。一般的に環状ジスルフィドペプチドは，チオール基を有する直鎖ペプチドを構築した後，ジスルフィド結合形成による分子内環化を経て合成します。これに対して DdCPS 法は，先に 2 つの異なるペプチドフラグメントを SPDSL 法にて連結することでジスルフィドペプチドとし，分子内アミド結合形成に必要な反応点を空間的に近づけ，効率化させる手法です（図 3）。当該アミド結合形成には，一般的に用いられる縮合剤や優れたアミド結合形成法であるチオエステル法が利用できます。我々は，

DdCPS 法によりオキシトシン⁷およびヒトエンドセリン-2¹⁰の実践的合成を達成しております。DdCPS 法は従来法で問題とされるペプチドフラグメント間（分子間）のアミド形成時のラセミ化を抑制でき，新たな効率的ペプチド合成法として有用性は高いと考えられます。また，DdCPS 法は反応選択性及び効率性に優れ，実用的な手法です。そのため，本手法はジスルフィド結合を複数有するペプチドの効率的合成に繋がることが期待されます。

4. 新規ジスルフィド結合形成試薬の開発

研究を進めていく中で，我々は 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸エステルに大変興味を持ちました。当該化合物に関しては，約 40 年前にその合成法が報告されていましたが，詳細な分子機能については未報告でした¹¹。そこで，我々は複数の誘導体を合成し，そのジスルフィド形成能を評価したところ，驚くべきことに，3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸メチルエ

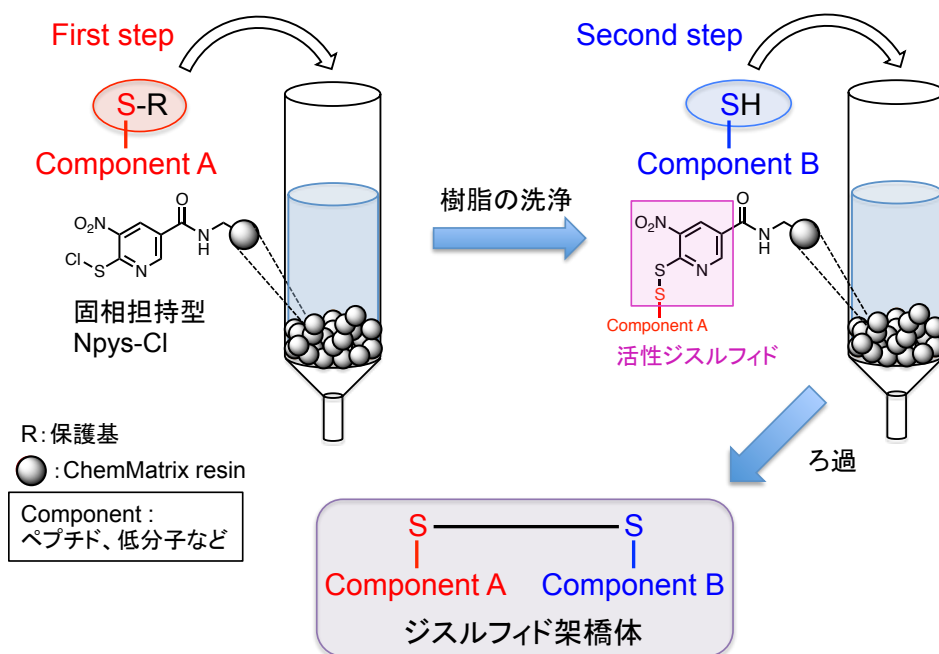


図2 固相担持型 Npys-Cl を用いたワンポット固相ジスルフィドライゲーション法

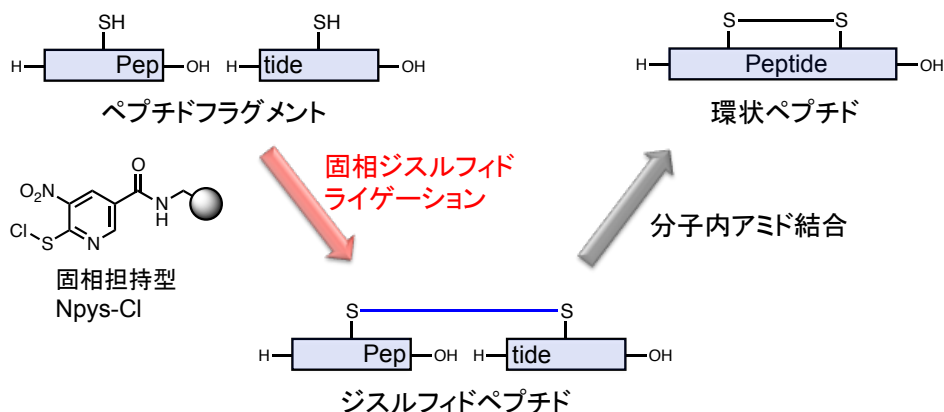


図3 ジスルフィド先導型環状ペプチド合成法

ステル (Npys-OMe) が画期的なジスルフィド形成試薬として機能することを見出しました¹² (図 4)。また、当該化合物の特性として、1) 弱酸性条件下、無保護システイン間の選択的なジスルフィド結合形成が可能、2) 酸化されやすいアミノ酸は酸化しない温和な反応、3) 空気酸化法で用いるペプチド濃度よりも高濃度 (1 mM ペプチド溶液) でも分子内ジスルフィド結合が可能であることを明らかにしました。Npys-OMe を用いたヒト心房性ナトリウム利尿ペプチドの効率的合成や α -コノトキシン ImI の位置選択的なジスルフィド結合形成を達成しており、中分子ペプチド合成への応用が示されました。更に、反応溶液をろ過するのみで高純度の環状ペプチドが獲得可能な固相担持型 Npys-OMe の開発にも成功しました。Npys-OMe と固相担持型 Npys-OMe は、ジスルフィド結合形成試薬として市販されています。今後、更なる 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸エステルに着目した研究展開により、更に興味深い化学特性や機能性を有する Npys 誘導体の創製が期待できます。

5. おわりに

以上、我々が最近取り組んできた Npys 基を用いたジスルフィドペプチドの合成手法の開発について紹介させていただきました。今後、我々の Npys 化学における「再発見」や「新発見」が、ペプチド合成およびペプチド科学の発展に寄与できれば幸いです。本研究を進めるにあたり、多大なるご支援をいただきました林良雄先生、谷口敦彦先生、今野翔先生、薬師寺文華先生 (現北海道大学)、山崎有理先生、高山健太郎先生 (現京都薬科大学) に心より感謝致します。また、日夜研究に取り組んでいただいた学生の皆様に深く感謝致します。特に本研究は六車共平博士、大学院生的小林清孝君、崔岩君の多大なる貢献によるものです。最後に、本研究は共同研究者の諸先生方のご協力により達成されたものです。御礼申し上げます。まだまだ未熟ではございますが、初心を忘れず研究に取り組み、ペプチド科学や日本ペプチド学会の発展に少しでも貢献できればと考えております。今後とも皆様のご

指導ご鞭撻の程、何卒よろしくお願い申し上げます。

参考文献

1. Nishiguchi, S.; Sydnes M. O.; Taguchi, A.; Regnier, T.; Kajimoto, T.; Node, M.; Yamazaki, Y.; Yakushiji, F.; Kiso, Y.; Hayashi, Y. *Tetrahedron Lett* 2010, 66, 314–320.
2. Hamada, K.; Omura, N.; Taguchi, A.; Baradaran-Heravi, A.; Kotake, M.; Arai, M.; Takayama, K.; Taniguchi, A.; Roberge, M.; Hayashi, Y. *ACS Med Chem Lett* 2019, 10, 1450–1456.
3. Taguchi, A.; Hamada, K.; Hayashi, Y. *J Antibiot* 2018, 71, 205–214.
4. Matsueda, R.; Walter, R. *Int J Pept Protein Res* 1980, 16, 392–401.
5. Rentier, C.; Fukumoto, K.; Taguchi, A.; Hayashi, Y. *J Pept Sci* 2017, 23, 496–504.
6. Matsueda, R.; Kimura, T.; Kaiser, E. T.; Matsueda, G. R. *Chem Lett* 1981, 737–740.
7. Taguchi, A.; Fukumoto, K.; Asahina, Y.; Kajiyama, A.; Shimura, S.; Hamada, K.; Takayama, K.; Yakushiji, F.; Hojo, H.; Hayashi, Y. *Org Biomol Chem* 2015, 13, 3186–3189.
8. Muguruma, K.; Shirasaka, T.; Akiyama, D.; Fukumoto, K.; Taguchi, A.; Takayama, K.; Taniguchi, A.; Hayashi, Y. *Angew Chem Int Ed* 2018, 57, 2170–2173.
9. Muguruma, K.; Yakushiji, F.; Kawamata, R.; Akiyama, D.; Arima, R.; Shirasaka, T.; Kikkawa, Y.; Taguchi, A.; Takayama, K.; Fukuhara, T.; Watabe, T.; Ito, Y.; Hayashi, Y. *Bioconjug Chem* 2016, 27, 1606–1613.
10. Taguchi, A.; Kobayashi, K.; Cui, Y.; Takayama, K.; Taniguchi, A.; Hayashi, Y. *J Org Chem* 2020, 85, 1495–1503.
11. Matsueda, R.; Kaiser, E. T. *Heterocycles* 1981,

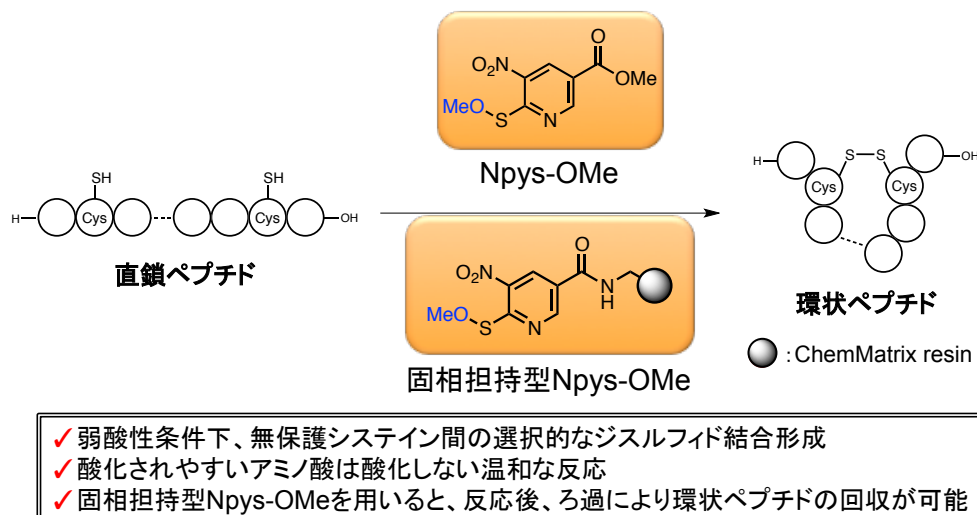


図 4 Npys-OMe によるジスルフィド結合形成反応

15, 1089–1092.

12. Taguchi, A.; Kobayashi, K.; Kotani, A.; Muguruma, K.; Kobayashi, M.; Fukumoto, K.; Takayama, K.; Hakamata, H.; Hayashi, Y. Chem Eur J 2017, 23, 8262–8267.

たぐち あきひろ
東京薬科大学 薬学部
薬品化学教室
ataguchi@toyaku.ac.jp
<https://www.hinka-toyaku.com/>

令和二年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

この度は日本ペプチド学会奨励賞という名誉ある賞を賜りまして、大変光栄に存じます。会長の野水基義先生をはじめ、選考委員の先生ならびに関係の諸先生方に心より御礼申し上げます。本稿では、受賞研究である「ファージ提示ペプチドに基づく機能性ソフトマテリアルの創製」について、繊維状ウイルス（ファージ）の遺伝子工学に基づく機能創発を概説させていただきます。



澤田 敏樹

1. はじめに

生体内では、生体分子が互いを認識しあうことによって機能を発現しており、これらの分子認識は生体システムの維持に重要な役割を担っています。この優れた分子認識能は、生体系が進化の過程で獲得したものであるため、生体分子が認識する標的は生体分子に限って考えられてきました。しかしながら、近年のバイオテクノロジーの発展により、生物学的に構築されたペプチドライブラリーとそれを用いるスクリーニング技術を利用すれば、人工物であるマテリアル化合物を認識して結合する新しいペプチドを獲得できることが明らかとなっています¹ (図 1)。これまでに、多様なマテリアルがペプチドの標的とされてきましたが、取扱いの容易さも相まって、繊維状ウイルスの一種であるファージの表層にペプチドを提示するファージディスプレイ (PD) 法が広く用いられています。得られたペプチドは、マテリアルへの結合能を示すことにとどまらず、マテリアル表面の機能化に利用できることも報告されています²。さらに最近では、ペプチドを提示したファージそのものを素材としたマテリアル構築も展開されており、PD 法がマテリアルの世界で広く利用できる可能性が明らかとなっています。

2. 高分子の構造を見分けるペプチドの同定とその応用

汎用性高分子の多くは、それらを共有結合により機能化するための反応性をもちません。それらの高分子に反応性を付与する手法は様々ありますが、高分子オ

リジナルの特性が変わる可能性を考慮する必要があります。これまでに、ペプチドの分子認識能を利用して高分子を機能化することを目指し、様々な高分子に特異的に結合するペプチドを PD 法により同定してきました³。それらのペプチドは、合成高分子に固有の立体構造^{4,5}や超分子重合するペプチドナノ材料の集合化状態や共集合といった様々な特有の構造^{6,7}を見分けることができることを見出しており、さらに分子認識能を適切に利用することで、機能性ソフトマテリアルが一般に創製できることを見出しています⁸。当初は実験的な容易さから、水に不溶な高分子を主な標的としてきましたが、最近ではより親水的な高分子へと研究展開し、ハイドロゲルや水に溶解した高分子であっても、ペプチドを介して機能化できていることを見出しており、それら研究の一端を具体的にご紹介致します。

2.1 高分子ミセル・ハイドロゲルからの薬剤分子の放出制御

親水的なポリエチレンオキシド (PEO) と疎水的なポリプロピレンオキシド (PPO) から構成されるトリブロックコポリマー (PEO-PPO-PEO) は濃度に応じてミセルやハイドロゲルを形成するため、ドラッグデリバリーや細胞培養足場として広く用いられる医用高分子です。このトリブロックコポリマーは、機能化に有効な官能基をもたないため、機能化は一般に困難であり、生物医学応用の妨げとなっています。このトリブロックコポリマーをペプチドの分子認識能を利用して機能化することを目指し、PPO に特異的に結合するペプチドを PD 法を利用して同定しました⁹。この PPO 結合性ペプチドに抗がん剤であるドキソルビシン (Dox) を化学修飾し、ハイドロゲルから放出される Dox 導入ペプチドを定量した結果、Dox 単独の場合や PPO に対する結合能が低下した変異ペプチドに Dox を導入した場合と比較して、放出速度が低下し、長期間に渡って Dox の効果が認められました (図 2)。また、ミセルに対するペプチドの結合特性を

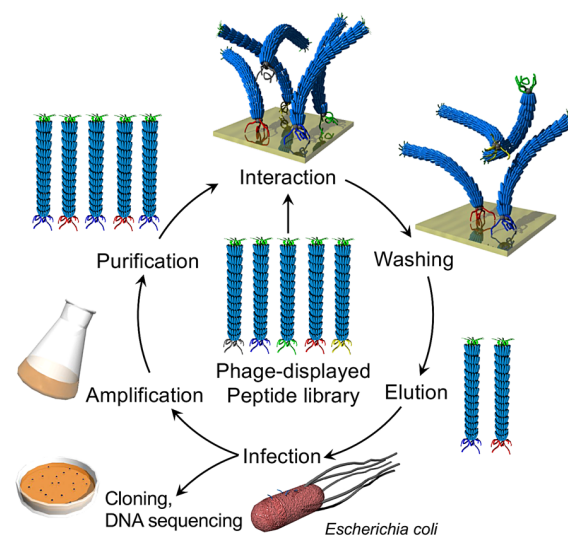


図 1 ファージ提示ペプチドライブラリーを利用したスクリーニングの模式図

評価した結果、ペプチドはミセルコアの PPO と確かに相互作用していることが明らかとなり、水中に分散したミセルに対しても確かにペプチドが結合能を示すことを明らかにしました。また、PEO と PPO の組成の異なるトリブロックコポリマーを用いると、ペプチドに導入した Dox の薬効を制御できることや、外部からのアクセシビリティを制御できることなども見出し、高分子の構造を適切に利用することで、ペプチドの分子認識に基づいた機能化が様々達成できることを見出しています¹⁰。

2.2 温度応答性高分子への結合に基づくペプチド融合タンパク質の機能制御

ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM) は代表的な温度応答性の水溶性高分子であり、下限臨界溶解温度 (LCST) を境にコイル-グロビュール転移します。この転移現象を利用し、リガンドを化学修飾した PNIPAM とそのリガンドに結合するタンパク質を共沈殿させる手法は、温和な条件下で生体分子を回収できるため有用です。しかしながら、PNIPAM へのリガンド導入は煩雑な操作を伴い、また反応性基の導入により LCST や転移挙動が変化するため、より簡便な手法が求められています。まず、PNIPAM のメソ配列に特異的に結合するペプチドを PD 法を利用して同定し、その結合特性を評価した結果、水に溶解した PNIPAM に対してもペプチドが結合し、その結合によって PNIPAM のグロビュール転移が誘起されることを見出しました¹¹。さらにこのペプチドでモデルタンパク質であるヒト血清アルブミン (HSA) を化学修飾することで、PNIPAM と HSA を効率良く共沈殿させることに成功しています¹² (図 3a)。この際の HSA の共沈殿率は 100% 近くに達し、ペプチド修飾しなかった場合には 20% 程度であることから、修飾したペプチドの分子認識に基づいて PNIPAM と共に共沈殿していることを明らかにしています (図 3b)。さらに最近では、蛍光基を導入したペプチド修飾 HSA の蛍光挙動を PNIPAM への結合やその後の温度変化で制御できることも見出し¹³、温度応答性高分子の構造転移と組み合わせることでペプチドを利用することで、新たな刺激応答性材料を構築できることを見出しています。

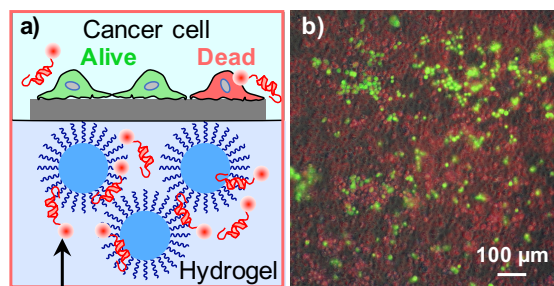


図2 ペプチドを利用した高分子ハイドロゲルからの薬剤分子徐放。a) 模式図, b) 細胞の蛍光顕微鏡像。b) では生細胞, 死細胞をそれぞれ緑色, 赤色に染色している (文献 9 より許可を得て一部改変して転載)。

3. 繊維状ファージを素材としたソフトマテリアルの創製

分子の自己集合に基づいて構築される集合体の構造を厳密に、かつ効率良く制御して機能創製へと導くことは、ナノ材料を構築するゴールの一つと言えます。中でも、生体分子を素材とする集合体の構築は、生体系がもつ優れた特性を利用できる有用性をもちます。生体分子の中でもウイルスは、構成するタンパク質のサイズや形状と言った情報がゲノム遺伝子によって厳密に規定されているため、プログラム可能な分子集合体として利用できる可能性が見出されつつあります¹⁴。これまで PD 法に利用してきたファージ (M13 バクテリオファージ) は、直径 5 nm, 長さ約 1 μm, 分子量約 1630 万と極めて細長く巨大な構造をもちますが、その繊維状形態や均一なサイズに基づいて液晶配向することが知られており¹⁵、規則的な集合構造を形成します。筆者らはこの規則的な集合特性と PD 法に基づく自在な機能化を利用することで、様々なソフトマテリアル素材としてこのファージが利用できることを見出し^{16,17}、以下にその一部を紹介致します。

3.1 ファージ提示ペプチドの分子認識に基づいて形成する構造制御されたハイドロゲル

ファージの規則的な集合化を利用し、これまで焦点が当てられることのなかったウェットなソフトマテリアルを構築することを目指しました。ファージは単独では高濃度で液晶配向し、絡み合ってゲル化することはありませんので、他の分子とのハイブリッドを検討しました。ここでは、様々な物理的・化学的に興味深い特性を示す金ナノ粒子に着目しました。遺伝子工学によりファージ末端に抗原ペプチドを提示させ、金ナノ粒子 (直径 15 nm) には抗体を固定化し、ファージ末端で両者が特異的に相互作用する分子設計としました。両者を適切な濃度比で混合して集合化させた結果、金ナノ粒子が数十マイクロメートルにもおよぶ規則的なネットワーク構造を形成し、またファージは液晶配向するほど規則的に集合化していることがわかりました (図 4)。この際、ファージ上の抗原ペプチドと金ナノ粒子上の抗体間の相互作用がこの規則的な集合化には不可欠であることも明らかにしており、

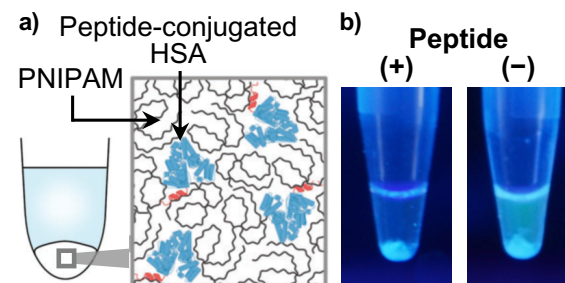


図3 ペプチドを利用したタンパク質の温度応答的な共沈殿。a) 模式図, b) ペプチド修飾もしくは未修飾タンパク質 (HSA) を共沈殿させた際の紫外光照射下の写真。b) では、HSA を蛍光ラベル化しているため、上清の HSA を視覚的に確認できる (文献 12 より許可を得て一部改変して転載)。

ファージ末端に提示させたペプチドを利用して位置特異的な相互作用を形成させることで、ウイルスからなる構造が制御された集合体を構築できる可能性を見出しました¹⁸。さらにこのシステムを利用することで、モデル薬剤として用いた複数の抗体分子の放出をそれぞれ独立に制御できるシステムを構築できることも見出し¹⁹、ファージに提示されたペプチドの適切な利用により様々なハイドロゲルシステムが構築できることを見出しました。

3.2 界面重合によるファージメンブレンの構築と分子認識に基づく選択的な分離

ファージは当然ながら水溶性であるため、そのものを水系でマテリアル利用することを考えると、水に不溶化させるプロセスが必須となります。我々は、ファージ自身の分子構造や集合構造を損なうことなく不溶化させてマテリアル展開することを目指し、ナイロンなどの合成に利用される界面重合を利用しました。ファージを主として構成する外殻タンパク質(pVIII, ファージあたり約 2700 分子)には、外部分子と反応できるアミノ基が2つ存在することが知られているため、ファージは多価アミンとして見做すことができます。ファージが溶解した水溶液に酸クロリドが溶解したヘキサンを重層しますと、界面には不溶化したメンブレンが生成し、ファージの界面重合がマテリアル展開に有用であることを明らかにしました²⁰ (図5)。この生成されたメンブレンを偏光顕微鏡や走査型電子顕微鏡により観察した結果、ファージは規則的

に配向しており、また緻密に集合化していることも明らかとなりました。メンブレンの機能を明らかにするため、分子分離特性を評価した結果、その分画分子量は 400 であり、ファージは液晶配向した密な状態のまま固定化されて不溶化できていることがわかりました。さらに、レアアースであるネオジムイオンに結合するペプチド²¹で修飾したファージを用いてメンブレン構築することで、同じ三価のカチオンである鉄イオンと比較してネオジムイオン選択的な分離が可能であることを見出しました。すなわち、ファージの液晶配向とその表層での分子認識を利用することで、新たな膜分離素材として応用できる可能性を見出しました。

4. おわりに

本稿では、ファージに提示されたペプチドを利用して、その分子認識に基づいて新たなソフトマテリアルを創製する研究の一端をご紹介致しました。マテリアルに結合するペプチドのこれまでの利用は固体表面がほとんどでしたが、ハイドロゲルや水溶液といった様々な状態の高分子であっても、ペプチドが分子認識能を発揮し、マテリアル構築できることが明らかになりつつあります。さらに、ファージ自身の液晶配向を利用した自己集合化に基づき、熱伝導性材料としてファージを利用することなど²²、本稿でご紹介した研究以外にも様々な研究を展開しており、ファージ提示ペプチドに基づくマテリアル創製について、基礎的な知見を積み重ねながら、新たな機能性材料の創製に繋げていきたいと考えております。

参考文献

1. Sarikaya, M.; Tamerler, C.; Jen, A.; Schulten, K.; Baneyx, F. *Nat Mater* 2003, 2, 577-585.
2. Günay, K. A.; Klok, H.-A. *Bioconjugate Chem* 2015, 26, 2002-2015.
3. Serizawa, T.; Matsuno, H.; Sawada, T. *J Mater Chem* 2011, 21, 10252-10260.
4. Serizawa, T.; Sawada, T.; Matsuno, H.; Matsumura, T.; Sato, T. *J Am Chem Soc* 2005, 127, 13780-13781.
5. Serizawa, T.; Sawada, T.; Kitayama, T. *Angew Chem, Int Ed* 2007, 46, 723-726.
6. Sawada, T.; Takahashi, T.; Mihara, H. *J Am*

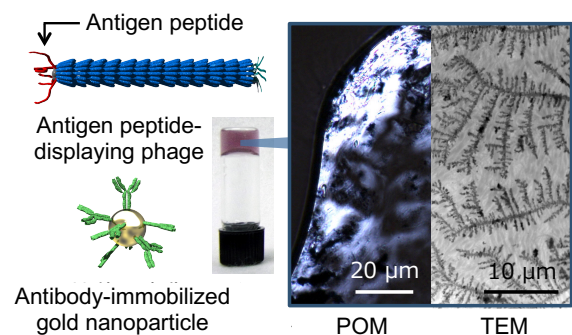


図4 ファージからなるハイドロゲル構築の模式図。偏光顕微鏡 (POM) からファージの液晶配向が、透過型電子顕微鏡 (TEM) から金ナノ粒子の規則的なネットワーク構造が観察される (文献 18 より許可を得て一部改変して転載)。

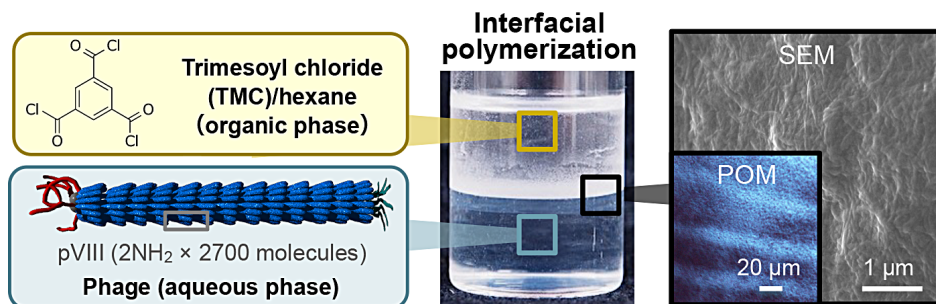


図5 界面重合を利用したファージからなるメンブレン構築の模式図。走査型電子顕微鏡 (SEM) から密な集合構造が、偏光顕微鏡 (POM) からファージの液晶配向が観察される (文献 20 より許可を得て一部改変して転載)。

- Chem Soc 2009, 131, 14434–14441.
7. Sawada, T.; Mihara, H. *Mol BioSyst* 2012, 8, 1264–1274.
 8. Sawada, T.; Mihara, H.; Serizawa, T. *Chem Rec* 2013, 13, 172–186.
 9. Serizawa, T.; Fukuta, H.; Date, T.; Sawada, T. *Chem Commun* 2016, 52, 2241–2244.
 10. Sawada, T.; Takizawa, M.; Serizawa, T. *ACS Biomater Sci Eng* 2019, 5, 5714–5720.
 11. Suzuki, S.; Sawada, T.; Ishizone, T.; Serizawa, T. *Chem Commun* 2018, 54, 12006–12009.
 12. Suzuki, S.; Sawada, T.; Ishizone, T.; Serizawa, T. *Chem Commun* 2016, 52, 5670–5673.
 13. Sawada, T.; Suzuki, S.; Serizawa, T. *Soft Matter* 2020, 16, 10096
 14. Yang, S.; Chung, W.-J.; McFarland, S.; Lee, S.-W. *Chem Rec* 2013, 13, 43–59.
 15. Dogic, Z.; Fraden, S. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 2006, 11, 47–55.
 16. Sawada, T. *Polym J* 2017, 49, 639–647.
 17. Sawada, T.; Serizawa, T. *Bull Chem Soc Jpn* 2018, 91, 455–466.
 18. Sawada, T.; Kang, S.; Watanabe, J.; Mihara, H.; Serizawa, T. *ACS Macro Lett* 2014, 3, 341–345.
 19. Sawada, T.; Yanagimachi, M.; Serizawa, T. *Mater Chem Front* 2017, 1, 146–151.
 20. Sawada, T.; Inomata, H.; Serizawa, T. *J Membr Sci* 2020, 595, 117595.
 21. Sawada, T.; Asada, M.; Serizawa, T. *ChemistrySelect* 2016, 1, 2712–2716.
 22. Sawada, T.; Murata, Y.; Marubayashi, H.; Nojima, S.; Morikawa, J.; Serizawa, T. *Sci Rep* 2018, 8, 5412.

(さわだ としき
東京工業大学 物質理工学院
sawada@mac.titech.ac.jp)

**Young investigator's Oral Presentation
Award "Excellent Stone Award"
at the 57th Japanese Peptide Symposium**

I had the pleasure to attend as a Young Investigator Oral Presenter in the 57th Japanese Peptide Symposium, held last November 9 – 11, 2020. Due to the on-going COVID-19 pandemic, the symposium was held online. Nonetheless, participants proudly showcased their works and actively participated in scientific discourse. Our utmost appreciation goes to the symposium organizers for selecting



Arafles Jan Vincent V.

our presentation entitled, "Extracellular thiol-disulfide exchange reaction produces potent macropinocytosis-inducing peptide analogs" as the recipient of the "Excellent Stone Award" sponsored by Kokusan Chemical Co., Ltd. We are grateful for the recognition that this award gives to our work. I especially thank Prof. Shiroh Futaki for the opportunity to study peptide-based chemical biology and intracellular delivery strategy.

Recent drug discovery efforts are becoming more interested in biologically compatible biopharmaceutical agents (ex. antibodies and enzymes). Although the advances are promising, we believe that giving biopharmaceutical agents access to cells' internal structures should extend the range of their therapeutic uses. Moreover, effective intracellular delivery of exogenous reporter molecules should impact how we understand the cell's complex systems. One of our group's strategies to achieve intracellular delivery is to induce endocytosis pathways and understand the molecular mechanisms performed by peptides that deliver exogenous biomacromolecules into cells.

Peptide-based strategies commonly deliver their cargoes either through direct membrane penetration, coat-protein mediated endocytosis or macropinocytosis. Direct penetration through the cell membrane allows the cargoes to access the cytoplasm and perform their biological functions immediately. A common strategy to achieve this is by conjugating cargoes with cell-penetrating peptides (CPPs), such as Tat and octaarginine (R8)¹. The mechanism of achieving direct membrane penetration could vary depending on the CPP. For example, R8 enters through the loosely packed lipid areas on the cell membrane. However, the cargo's size, hydrophobicity, and the need for high concentrations limit the direct penetration method's applicability.

Cellular endocytic pathways are preferred for the delivery of larger bioactive cargoes. Commonly discussed endocytic uptake mechanisms are clathrin- or caveolin-mediated endocytosis and macropinocytosis. Delivery systems that use endocytosis require specific receptors to induce the biological uptake routes. However, there are a limited number of known receptors available for the needed delivery. Moreover, the sizes of endosomes formed through these pathways are only up to ~120 nm for clathrin-mediated endocytosis and ~80 nm for caveolin-mediated endocytosis, possibly restricting the number of cargoes that can be accommodated in endosomes.

Unlike clathrin/caveolin-mediated endocytosis, macropinocytosis is an actin-mediated form of endocytosis, facilitating bulk uptake of extra-

cellular fluid and materials into large endosomes, called macropinosomes². The diameters of macropinosomes are reported to be up to 5 μm , which is considerably larger than those of endosomes formed by clathrin/caveolin-mediated endocytosis. This pathway is reported to be involved in the cellular entry of specific viruses. Recent studies report the significance of macropinocytosis in the cellular uptake of CPPs, stapled peptides, liposomes, and exosomes, suggesting macropinocytosis as a ubiquitous cellular uptake pathway. Strategies that activate and take advantage of macropinocytosis can be advantageous for large-scale uptake of bioactive macromolecules. For this reason, we aimed to identify macropinocytosis-inducing peptides and show their applications for intracellular delivery.

Our lab previously reported the macropinocytosis induction of the stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) through binding to its receptor CXCR4 (CXCR4)³. Other works suggested that the N-terminal of SDF-1 α contains its receptor-binding and receptor-activating motifs, which were found to be enough to elicit a biological response⁴. Thus, we synthesized SDF1 α -N-terminal peptides with different lengths and checked their ability to induce the cellular uptake of 70 kDa dextran – a marker of macropinocytosis. Among candidates, SN21, a peptide containing the first 21-residues of SDF1 α N-terminal, elicited the highest amount of dextran uptake into

cells. Evaluation of dextran uptake in the presence of macropinocytosis inhibitors and the visualization of membrane ruffling formation confirmed that SN21 induces macropinocytosis. Unfortunately, cargoes (i.e., 70 kDa dextran) taken in by SN21-induced macropinocytosis induction remained trapped within endosomes.

Our solution was to synthesize SN21 with a membrane-lytic peptide LK15 (SN21-LK15). In this strategy, SN21 acts as a physiological inducer of macropinocytosis, allowing the accumulation of exogenous cargoes into endosomes. LK15 then acts as a physicochemical disruptor of endosomal membranes to release the trapped cargoes into the cytosol, where their biological activities are performed (Figure 1). After confirming the ability of SN21-LK15 to enter and rupture endosomes, we used this peptide to deliver various functional biomacromolecules. SN21-LK15 effectively delivered small-interfering RNAs and functional proteins, such as Cre recombinase, artificial transcription activator-fused with a modified transcription activator-like effector protein (TALE-VP64), and antibodies. Due to these abilities, we further examined the mechanism-of-action of SN21 in the hope of developing new macropinocytosis-inducing peptides.

As mentioned, SN21 contains the receptor binding and receptor activation motifs of CXCR4. The possible involvement of CXCR4 was investigated in the macropinocytosis induction of SN21. Sur-

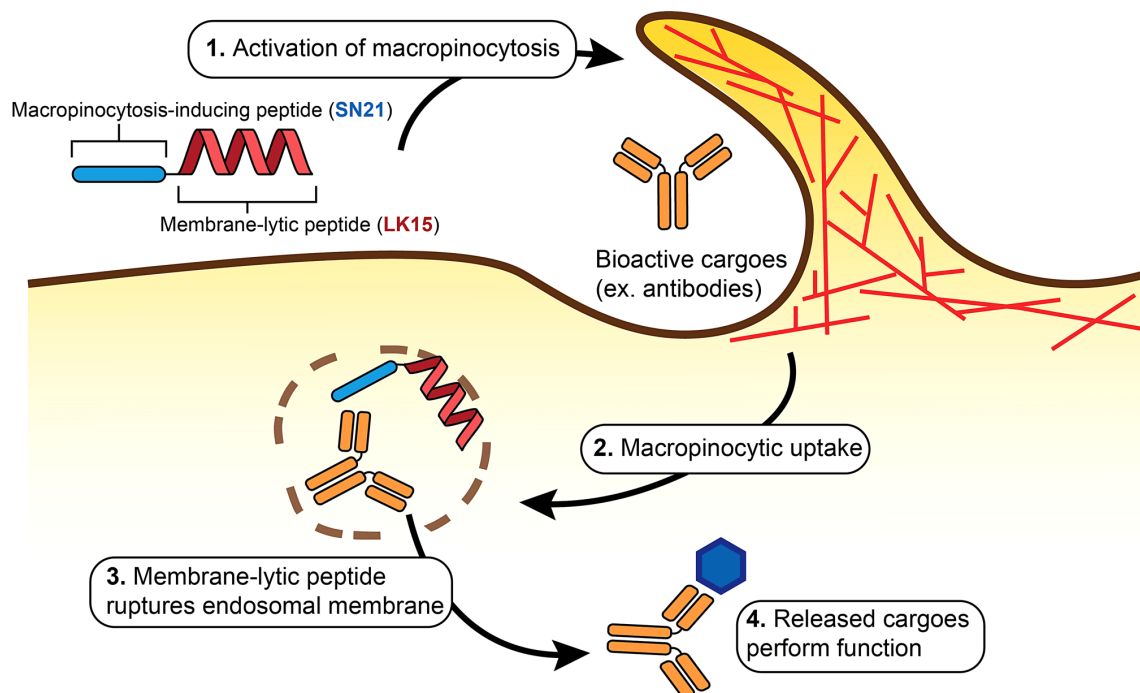


Figure 1 Inducing macropinocytosis for intracellular delivery. The macropinocytosis-inducing peptide SN21 and the membrane-lytic peptide LK15 were conjugated. The delivery of bioactive cargoes starts from the macropinocytosis induced by the SN21 sequence. Then the cargoes are released from the endosomes after the disruption of the membrane by the LK15 sequence.

prisingly, SN21-induced macropinocytosis showed no association with the receptor. Alanine scanning revealed the amino acid residues that are involved in the macropinocytosis-inducing ability of SN21. We found that peptides, which only contained the critical residues, are also macropinocytosis inducers. More importantly, a reactive amino acid residue within SN21 and its shorter analog are vital for these peptides' macropinocytosis induction abilities. We found that the reactive residue facilitates the extracellular exchange reaction that yields the active form of the analog of SN21. Lastly, we suggest a potential cell-surface receptor that is involved in the macropinocytosis induced by SN21 analogs. This information sheds a better understanding of the chemical mechanism that activates the biological activity of SN21 and its analog, which could provide a platform for creating macropinocytosis-inducing peptides with higher activities and broader applications for intracellular delivery. We are currently working on a detailed assessment of the chemical exchange mechanism and the cell-surface receptor activation mechanisms of SN21 analogs.

References

1. Futaki, S.; Nakase, I. *Acc Chem Res* 2017, 50, 2449–2456.
2. Bloomfield, G.; Kay, R. R. *J Cell Sci* 2016, 129, 2697–2705.
3. Tanaka, G.; Nakase, I.; Fukuda, Y.; Masuda, R.; Oishi, S.; Shimura, K.; Kawaguchi, Y.; Takatani-Nakase, T.; Langel, Ü.; Gräslund, A.; Okawa, K.; Matsuoka, M.; Fujii, N.; Hatanaka, Y.; Futaki, S. *Chem Biol* 2012, 19, 1437–1446.
4. Arafiles, J. V. V.; Hirose, H.; Akishiba, M.; Tsuji, S.; Imanishi, M.; Futaki, S. *Bioconjug Chem* 2020, 31, 547–553.

アラフィレス ジャン ヴィンセント
 京都大学 化学研究所 生体機能設計化学
 arafiles.janvincent.76u@kyoto-u.jp

第 57 回ペプチド討論会 若手口頭発表最優秀賞を受賞して

2020 年 11 月 9 日から 11 日にかけてオンラインにて開催された第 57 回ペプチド討論会において、若手口頭発表という貴重な機会を頂きました。更に、若手口頭発表最優秀賞という非常に名誉ある賞を受賞させていただきました。僥越ながら今回の受賞対象となりました「Development



佐々木 愛理

of α -Dystroglycan Binding Peptide Modified Liposomes for Muscle Targeting Delivery System」についてご紹介をさせていただきます。

我々は、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne Muscular Dystrophy: DMD) に対する新規遺伝子治療の開発を目的として研究を行っています。DMD は細胞膜の骨格形成維持に寄与するジストロフィンタンパク質の遺伝子変異により、筋力低下や筋萎縮が進行する遺伝性疾患です¹。ジストロフィンタンパク質の発現回復を企図したアンチセンス核酸 (AON) が DMD 治療薬として誕生しています。しかし、投与後速やかに腎排泄され、筋組織への移行量が極めて少ないことが問題として挙げられます。そのため十分な治療効果を発揮するために、送達効率を向上させるドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System: DDS) 開発が急務の課題として考えられています。未だに有用な DDS が開発されていないことが現状です。このような背景を基に、我々はより効率的な治療を可能とする新たな筋指向性 DDS の開発が問題解決の糸口になるのではないかと考えました。そこで、共同研究者である野水教授らによって報告された A2G80 ペプチド²に着目しました。A2G80 ペプチドはラミニン $\alpha 2$ 鎖由来の断片ペプチドであり、筋細胞に発現している α ジストログリカンに対して親和性を持つペプチドです。この A2G80 ペプチドを、リポソームに修飾した A2G80 リポソームは筋組織に対して指向性を有するキャリアとなり得ることが期待できます。本研究においては、A2G80 リポソームと筋組織との相互作用性、および尾静脈内投与後の筋組織への分布について検証しました (図 1)。

初めに、A2G80 リポソームの作製方法についてご説明いたします。骨格となるリポソームはマイクロ流体技術を用いた装置である Nanoassembler[®] を使用して作製しました。本機器を用いることで、粒子径の調節や単分散傾向を示すリポソームを作製することが可能となります。今回は粒子径が 80 nm 程度となるように脂質組成や脂質溶液とバッファーとの混合割合等の機器条件を最適化し、作製をしました。これによって得られたリポソームに対し、ポストインサクション法³と呼ばれる方法で A2G80 をリポソームに修飾します。A2G80 に対しポリエチレングリコール (Polyethylene glycol: PEG) 脂質を結合させたものを用いることで、リポソームにペプチドを修飾することを可能としています。以上の工程で A2G80 リポソームを調製いたしました。

A2G80 リポソームが筋組織と相互作用をするかどうかを明らかにするために、筋組織切片を用いたスクリーニング実験⁴を行いました。正常マウス (C57BL/6) と DMD モデルマウス (C57BL/10 *mdx*) の脛骨筋の凍結切片を作製し、その切片上に蛍光ラベル化したリポソームを直接添加し反応させることで、筋組織とリポソームの相互作用を蛍光顕微鏡にて観察する実験です。この実験の結果、正常マウスと DMD マウスどちらの筋組織切片においても A2G80 リポソーム添加群において蛍光が認められ、筋組織と相互作用していることが明らかとなりました。一方、A2G80 のスクランブル配列を修飾したリポソーム

ム (Scr リポソーム) および未修飾リポソーム (PEG リポソーム) においては、蛍光は観察できませんでした。また、筋組織以外の臓器 (肝臓・脾臓・腎臓) に対して同様の実験を行った場合は、どのリポソーム添加群においても蛍光は観察できなかったことから、A2G80 によってリポソームに筋組織指向性を付与できることが明らかとなりました。

本リポソームを静脈内投与した場合に、筋組織への分布がどのようになるかを明らかにするため、マウス尾静脈よりリポソームを投与し、その 24 時間後に筋組織を回収し、組織切片を作製して蛍光顕微鏡にて観察しました。その結果、PEG リポソームと比較して A2G80 リポソーム投与群において、DMD モデルマウス筋組織へリポソームの顕著な集積が明らかとなりました。一方、驚くべき事に正常マウスにおいては A2G80 リポソーム投与群においても筋組織への集積は認められませんでした (図 2)。これは、DMD マウスと正常マウスにおける筋組織の状態の違いが関与していると考えています。DMD マウスは一般的にジス

トロフィンタンパク質が欠損していることによる筋細胞骨格の破綻により炎症が常時誘発され、筋組織の脆弱性が高まっている状態であると考えられています^{5,6}。一方で正常マウスではこのようなことは起こりません。この違いが、DMD マウス筋組織においてのみ、顕著な集積を認めた要因の一つであると考えられたことから、本リポソームを用いることで、病変部位特異的な薬物送達が可能となり、治療効果の増強や副作用の軽減につながるものと期待しています。

以上の結果より、A2G80 リポソームは静脈内投与が可能な筋指向性ナノキャリアであり、DMD 治療に対する有用なツールとなることを期待しています。今回の報告は、キャリアの有用性の検証になり、治療効果等の検証には至っておりません。しかしながら、DMD に対する新たな治療法を提言できる可能性を秘めたナノキャリアであると考えています。病変特異的な標的指向性を有する治療核酸内封筋指向性ナノキャリアは、病態が進行している部分から優先的に治療効果を期待でき、DMD 病態の進行を抑えることが可能

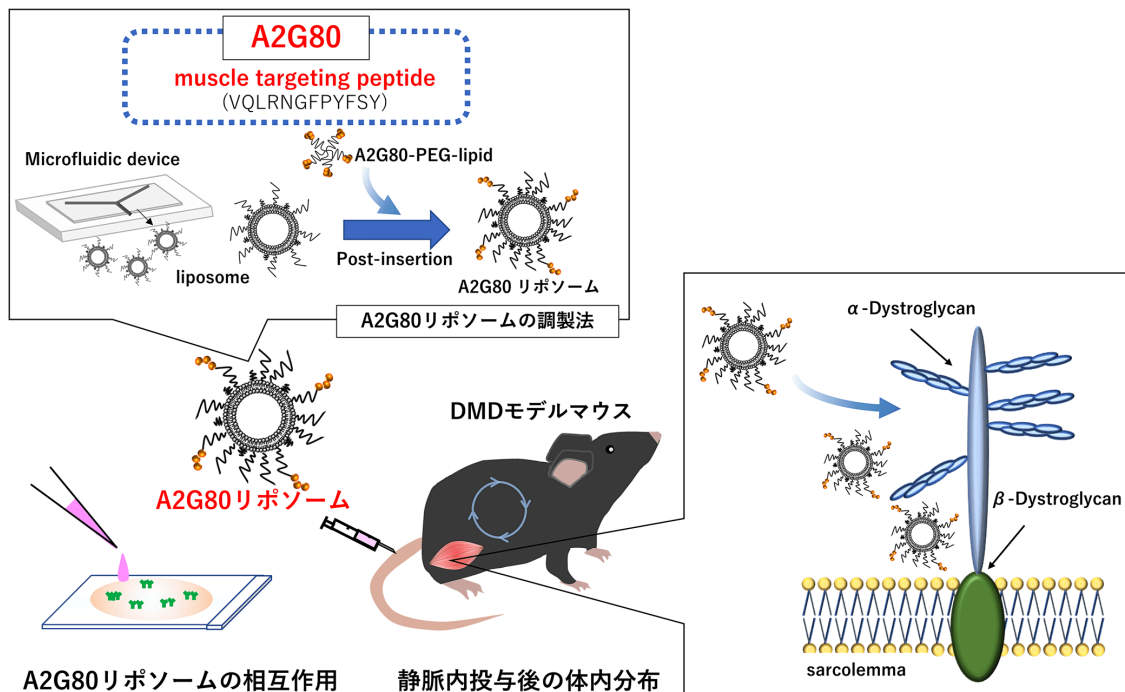


図 1 A2G80 リポソームを用いた本研究の概念図

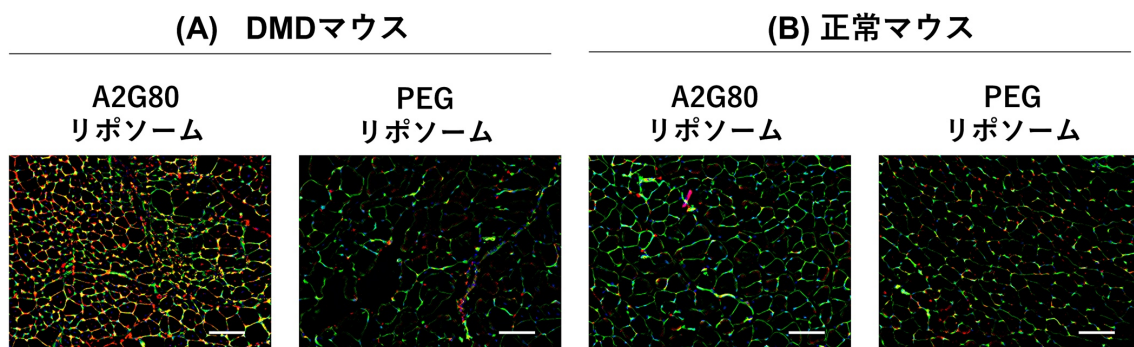


図 2 A2G80 リポソーム尾静脈内投与後の筋組織への分布。DMD モデルマウス、正常マウスへ尾静脈内投与を行った後の筋組織切片の蛍光顕微鏡画像。緑：細胞膜、赤：リポソーム、青：核、スケールバーは 100 μm を示す。

となるかもしれません。今後、この粒子特性を生かした治療核酸内封ナノキャリアの開発に取り組み、効果的な治療法の確立を目指していきたいと考えています。

本研究は、東京薬科大学根岸洋一先生のご指導の下進めて参りました。この場をお借りしてお礼を申し上げます。A2G80 リボソーム開発の共同研究の機会を与えて頂きました東京薬科大学・野水基義先生、ペプチド合成に関しましては病態生化学教室の諸先生方、A2G80-PEG 脂質の合成に関しましては三浦剛先生をはじめ、薬化学教室の諸先生方にもこの場をお借りして深く感謝申し上げます。本受賞を励みに、より一層研究活動に邁進してまいりますので、引き続きご指導、ご鞭撻のほど何卒宜しくお願いいたします。

参考文献

1. Hoffman, E. P.; Brown, R. H.; Kunkel, L. M. *Cell* 1987, 51, 919-928.
2. Suzuki, N.; Hozumi, K.; Urushibata, S.; Yoshimura, T.; Kikkawa, Y.; Gumerson, J. D.; Michele, D. E.; Hoffman, M. P.; Yamada, Y.; Nomizu, M. *Matrix Biol* 2010, 29, 143-151.
3. Moreira, J. N.; Ishida, T.; Gaspar, R.; Allen, T. M. *Pharm Res* 2002, 19, 265-269.
4. Negishi, Y.; Hamano, N.; Sato, H.; Katagiri, F.; Takatori, K.; Endo-Takahashi, Y.; Kikkawa, Y.; Nomizu, M. *Biol Pharm Bull* 2018, 41, 1107-1111.
5. Mojumdar, K.; Liang, F.; Giordano, C.; Lemaire, C.; Danialou, G.; Okazaki, T.; Bordon, J.; Rafei, M.; Galipeau, J.; Divangahi, M.; Petrof, B. J. *EMBO Mol Med* 2014, 6, 1476-1492.
6. Miyatake, S.; Shimizu-Motohashi, Y.; Takeda, S.; Aoki, Y. *Drug Des Devel Ther* 2016, 10, 2745-2758.

ささき えり
東京薬科大学 大学院薬学研究科
薬物送達学教室
y134114@toyaku.ac.jp

Excellent Poster Presentation Award を受賞して

この度、2020年11月9日～11日に開催された第57回ペプチド討論会に参加し、“Effects of Ser/Thr Phosphatase PPM1D on Adipocyte Differentiation and Lipid Droplet Formation”の演題でポスター発表を行い、大変光栄なことに日本ペプチド学会ポスター賞をいただきました。今回、ポスター発表いたしました研究内容を紹介させていただきます。



宇野 早映

白色脂肪細胞は、大きな脂肪滴を有し、エネルギー

の貯蔵と放出やホルモンの分泌などを行う極めて重要な細胞です。エネルギーの貯蔵を担う脂肪滴は、様々なタンパク質により形成が制御され、脂肪滴の肥大化は白色脂肪細胞の肥大化を引き起こし肥満の原因となります。肥満は糖尿病や心血管疾患などの慢性疾患を引き起こすことから、新規の肥満治療法の開発が望まれています。一方、熱産生の機能を有するベージュ脂肪細胞は、寒冷刺激など様々な刺激に応答して白色脂肪組織で誘導されます。このため、その特徴的な性質を生かした新たな肥満治療法の開発が期待されており、肥満に関与する脂肪細胞の分化や脂肪滴形成の分子制御機構解明は極めて重要です。

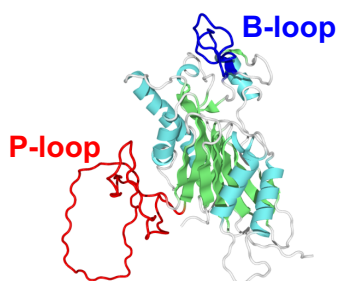
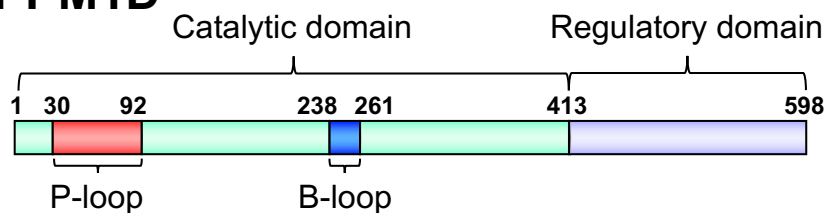
p53 誘導性タンパク質として同定された Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D は、p53 経路のネガティブフィードバックに関与することが示されています(図1)。また最近、私たちの研究室を中心とした研究により、PPM1D が免疫細胞の分化、免疫応答、精子形成など様々な機能に関与することが明らかとなっていました^{1,2}。さらに、PPM1D がグルコース恒常性や脂肪蓄積に関与することが報告され、PPM1D の代謝への関与が示唆されています。私たちは、脂肪細胞分化や脂肪滴形成における PPM1D の新規機能解明を目的として研究を行っています。

本研究ではまず、脂肪細胞分化モデル細胞 3T3-L1 を用いて、白色脂肪細胞分化における PPM1D の関与を検証しました。当研究室で開発した特異的 PPM1D 阻害剤 SL-176 (図2) の添加により 3T3-L1 の分化を誘導した結果、非常に興味深いことに、脂肪滴量とサイズが顕著に減少することが明らかとなりました。また、脂肪細胞マーカー遺伝子や脂肪細胞分化を制御する転写因子の発現量は、SL-176 や PPM1D knockdown による PPM1D 阻害により著しく減少しました。これらの結果より、PPM1D は脂肪細胞分化を制御する転写因子の発現誘導を介して脂肪細胞分化に関与することが示されました³。

つづいて、脂肪滴形成における PPM1D の役割を明らかにするため、脂肪滴を分解から保護するタンパク質である Perilipin1 に対する PPM1D の機能を解析しました。Perilipin1 の Ser 511 位リン酸化部位 WGGRAQYpSQLRKKS を有するリン酸化ペプチドは、PPM1D により脱リン酸化されることが示されました。さらに、この部位の非リン酸化およびリン酸化ミメティック Perilipin1 変異体を 3T3-L1 細胞に過剰発現させたところ、リン酸化ミメティック変異体の過剰発現は、非リン酸化体比べて脂肪滴サイズを顕著に減少させることが示されました。以上より、PPM1D は Perilipin1 の脱リン酸化を介して脂肪滴形成を制御することが示唆されました。

さらに、3T3-L1 細胞を白色脂肪細胞に分化後、PPM1D 阻害剤 SL-176 を添加し、成熟した白色脂肪細胞における PPM1D 阻害の効果を検証しました。非常に興味深いことに、脂肪滴サイズが著しく減少した多房性脂肪滴が形成され、ミトコンドリア量が増加することが明らかとなりました。多房性脂肪滴の形成と高いミトコンドリア含量はベージュ脂肪細胞の特徴と一致することから、PPM1D の阻害により、白色脂肪細胞からベージュ様脂肪細胞が誘導されたことが示唆さ

PPM1D



PPM1D catalytic domain

図1 PPM1D のドメイン構造と触媒ドメインのモデル

SL-176

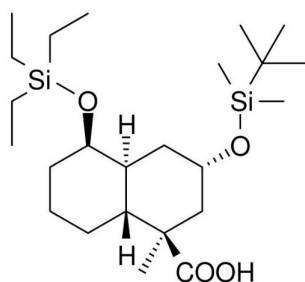


図2 PPM1D 阻害剤 SL-176

K. Pharmacol Ther 2020, 215, 107622.

- Kamada, R.; Kudoh, F.; Yoshimura, F.; Tanino, K.; Sakaguchi, K. J Biochem 2017, 162, 303-308.
- Kamada, R.; Kimura, N.; Yoshimura, F.; Tanino, K.; Sakaguchi, K. PLoS One 2019, 14, e0212682.

うの さえ

北海道大学 大学院総合化学院 生物化学研究室

s-uno@sci.hokudai.ac.jp

<https://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~biochem/>

れました。

以上本研究より、PPM1D が白色脂肪細胞の分化や脂肪滴の形成、ベージュ脂肪細胞の誘導に関与することが示されました。今後、さらにベージュ脂肪細胞の誘導における PPM1D の制御機構を解析し、ベージュ脂肪細胞における PPM1D の機能の解明を目指します。

本研究は、北海道大学 坂口和靖先生、鎌田瑠泉先生のご指導のもと行いました。多くの助言をいただきましたこと心より感謝いたします。

第 57 回ペプチド討論会はオンライン開催で、はじめての形式に緊張しましたが、多くのご助言やディスカッションをしていただき大変勉強になりました。今後もより一層研究に励みたいと思います。最後になりましたが、今回の第 57 回ペプチド討論会をお世話していただいた鳥取大学 松浦先生、河野先生をはじめ、学会を運営していただいた皆様に心から御礼申し上げます。

References

- Kamada, R.; Kudoh, F.; Ito, S.; Tani, I.; Janairo, J. I. B.; Omichinski, J. G.; Sakaguchi,

第 57 回ペプチド討論会ポスター賞を受賞して

2020 年 11 月 9 日から 11 日にわたってオンラインで開催された第 57 回ペプチド討論会において、大変光栄なことに優秀ポスター賞を受賞することができました。学会長の野水基義先生をはじめ、松浦和則先生を代表とする第 57 回ペプチド討論会実行委員の先生方や選考委員会の皆様には、この場を借りて厚く御礼申し上げます。本稿では、優秀ポスター賞の受賞の対象となった「Application of Mn²⁺-specific Biosensor Based on G-quadruplex DNA Aptamer」について紹介させていただきます。



水沼 正昂

我々の研究室では、熱に応答する Elastin Like Polypeptide や光に応答する Azobenzene に代表される刺激応答性分子に着目して研究を展開しています。その中でも特に、私は金属イオンに応答して立体

構造を大きく変化させることが可能な G-quadruplex DNA に着目した研究を行っております。グアニン塩基に富む一本鎖 DNA は、 Na^+ や K^+ などの 1 価金属イオン存在下で Hoogsteen 塩基対に基づく G-quartet 平面構造を形成することが知られています¹ (図 1a)。その際、2 つ以上の G-quartet 平面構造が積層することにより、立体構造を大きく変化させた グアニン四重鎖 (G-quadruplex, G4) 構造を形成することが報告されています (図 1b)。また、G-quadruplex 構造を形成した DNA は、高い熱安定性や核酸分解酵素に対する分解耐性を獲得することから、生体内におけるバイオセンサーや薬剤としての応用が期待できます。そこで当研究室では、独自開発の分子ツールとして母体構造にグアニン塩基を多数含有し、ループ配列をランダム化したイオン刺激応答性 DNA アプタマー (Ion-responsive DNA Aptamer ; IRDAptamer) ライブラリをデザインしました。このライブラリを用いることにより、金属イオン存在下で発がん関連ホスファターゼ PPM1D に特異的に結合する IRDAptamer を同定しております²。我々は、同定した IRDAptamer が金属イオン種に応答して構造を変化させることを見出し、IRDAptamer が金属イオン種を個々に検出可能なバイオセンサーとしても利用可能であることが示唆されました。そこで今回、生体内において様々な酵素の補因子として機能する一方で、過剰摂取により神経変性疾患の一種であるパーキンソン病やアルツハイマー病などの疾患に関与することが報告されている Mn^{2+} に着目しました。 Mn^{2+} の過剰摂取は様々な疾患に関与することが報告されている一方、その詳細な疾患メカニズムは未だ明らかとされておりません。そこで我々は、これら疾患メカニズムの解明や診療・診察のため、IRDAptamer を用いた生体内における高感度 Mn^{2+} 検出センサーの開発へ展開することとしました³。

最初に、2 価金属イオン検出用に再構築した IRDAptamer ライブラリを用いることにより、 Mn^{2+} を標的としたスクリーニングを試験管内選抜法 (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment ; SELEX) により行いました。SELEX の操作を合計 8 ラウンド行うことにより、集束配列として MnG4C1 アプタマーを同定しました。こ

こで、SELEX により Mn^{2+} 認識分子として同定した MnG4C1 について、Amyloid- β や G-quadruplex 構造を特異的に認識することが知られている Thioflavin T (ThT) を用いた蛍光応答性解析を行いました。その結果、最も強固に G-quadruplex 構造を形成することが知られている K^+ の添加のみならず、低濃度の Mn^{2+} の添加に伴い ThT の蛍光強度が増加したことから、MnG4C1 が Mn^{2+} 依存的に G-quadruplex 構造を形成することを確認しました。一方、ThT の蛍光強度を用いて応答性を比較すると、 K^+ と比較して Mn^{2+} に約 3000 倍高感度に応答することが明らかとなりました。また、円二色性 (CD) 解析を行ったところ、MnG4C1 は高濃度の K^+ に応答して既知構造であるプロペラ型の G-quadruplex 構造を形成する一方、低濃度 Mn^{2+} の添加により、274 nm 付近に強い負のピークを示す、今までに報告されていない新規 CD スペクトルが得られました (図 2)。ThT を用いた蛍光応答性解析では MnG4C1 は Mn^{2+} の添加に伴い G-quadruplex 構造を形成すること、ならびに ThT 単独条件下では同様の CD スペクトル変化が見られないことから、MnG4C1 が Mn^{2+} 添加により形成する構造は、今までに報告されていない新規 G-quadruplex 様の構造であることが推測されます。 Mn^{2+} 依存的に形成される MnG4C1 の構造変化は、G-quadruplex 母体構造を有しループ部分の配列のみ異なる G4 control アプタマー、MnG4C1 のグアニン塩基をシトシン塩基に置換した MnG4C1 GtoC アプタマーや、MnG4C1 を完全にランダム化させた MnG4C1 scrm アプタマーでは見られませんでした。これらのことから、274 nm 付近に強い負のピークを示す構造は MnG4C1 の配列依存的に Mn^{2+} に応答して形成する構造であることを確認しました。続いて、生体内に多量に存在する Na^+ や K^+ に加え、 Mn^{2+} と同様に必須微量元素として生体内に存在する Co^{2+} や Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 存在下における CD スペクトル測定を行いました。その結果、 Mn^{2+} の添加で観察された特徴的な CD スペクトル変化は、同濃度のほかの金属イオン存在下では見られないことから、MnG4C1 の 274 nm 付近に強い負のピークを示す特異的な構造は Mn^{2+} 特異的であることが明らかとなりました。

また、 Mn^{2+} の添加に伴う熱安定性の確認を行っ

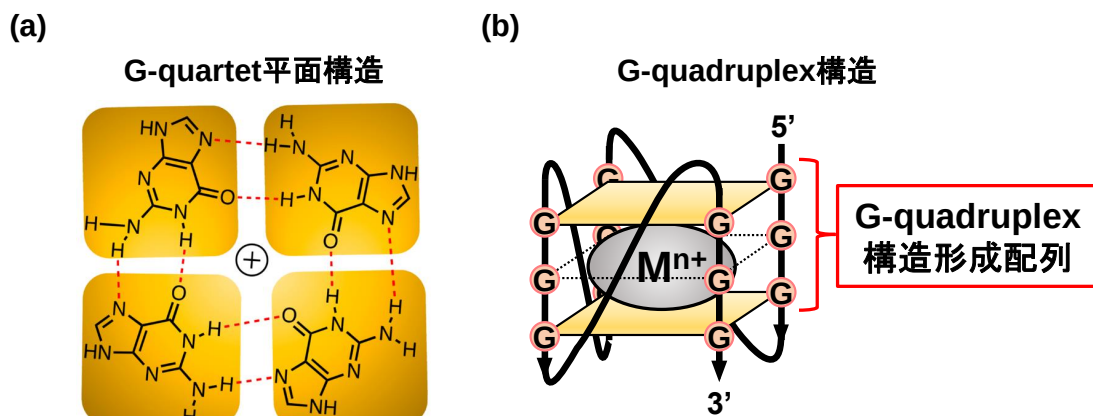


図1 (a) G-quartet 平面構造, (b) 金属イオン存在下における G-quadruplex 構造

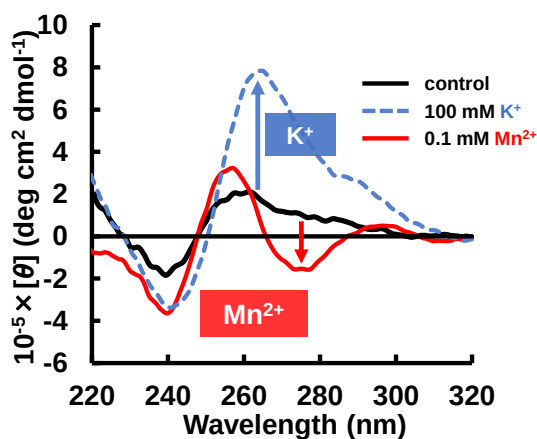


図2 K^+ , Mn^{2+} 存在下における CD スペクトル

たところ、 Mn^{2+} の添加により T_m が増加することを確認しました。続いて、蛍光分子を修飾した MnG4C1 を用いて 10% FBS を含む DMEM 培地中における血清安定性試験を実施しました。その結果、G-quadruplex 構造を形成し得ないアプタマーや、G4 control アプタマーと比較して、MnG4C1 は Mn^{2+} 存在下において優位に残存することを確認しました。これらのことから、MnG4C1 は Mn^{2+} 存在下において特徴的な G-quadruplex 構造を形成することで高い熱安定性、ならびに血清中における分解耐性を獲得することが示唆されました。今後は、MnG4C1 の Mn^{2+} に特異的に応答して構造を変化させる性質を利用し、MnG4C1 の両末端に蛍光分子を修飾することで FRET を利用した高感度 Mn^{2+} 検出系の確立を行うとともに、ペプチドと融合した機能性分子ツールとしての応用研究も展開する予定です。

本研究は新潟大学中馬吉郎先生のご指導の下行った研究であり、多くのご支援をいただきましたことを深く感謝申し上げます。また、中馬先生をはじめ研究に関する様々なご指導、ご指摘をいただきました諸先生方ならびに当研究室の皆様がこの場を借りて深く感謝申し上げます。今回の受賞を励みに、今後とも研究に邁進していく所存ですので、引き続きご指導、ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。最後になりましたが、ペプチドニュースレター 119 号への執筆の機会をくださった大阪府立大学の児島千恵先生に本紙面をお借りして心より御礼申し上げます。

参考文献

- Williamson, J. R.; Raghuraman, M. K.; Cech, T. R. *Cell* 1989, 59, 871–880.
- Kaneko, A.; Watari, M.; Mizunuma, M.; Saito, H.; Furukawa, K.; Chuman, Y. *Catalysts* 2020, 10, 1153.
- Martins, A. C. Jr.; Morcillo, P.; Ijonome, O. M.; Venkataramani, V.; Harrison, F. E.; Lee, E.; Bowman, A. B.; Archer, M. *Int J Environ Res Public Health* 2019, 16, 3546.

みずぬま まさたか
新潟大学 大学院自然科学研究科
数理解物質科学専攻 化学コース
生物化学研究室 (中馬研)
f19a501g@mail.cc.niigata-u.ac.jp

新編集委員



栗山 慶太郎

九州大学基幹教育院の栗山慶太郎と申します。本年より鎌田瑠泉先生に代わって PNJ の編集委員を担当させていただくことになりました。学生時代からお世話になっているペプチド学会にこのような形で貢献できることを大変嬉しく思っております。編集委員として、ペプチド学会・研究の情報を発信できるよう努めたいと存じますので、何卒よろしくお願い申し上げます。

2020 年度行事予定

2021 年 1 月 22 日 (金)
第 106 回理事会 (ウェブ会議)

編集後記

あけましておめでとうございます。昨年は、初物づくし (私の初仕事となる、令和初、子年 (初めの干支) の新年号) のニュースレターをお届けいたしました。年間通して「初めて」を多く体験する 1 年となりました。必要に迫られて実施・参加したオンラインでの仕事・イベントは、意外にいけると思う場面がある一方で、これまでの「当たり前」の良さを改めて知ったようにも思います。昭和生まれも平成生まれも、令和の時代に柔軟に対応していくほかないですね。「オンライン発表 (聴衆の顔が見えないパソコンの画面に向かって話すこと) に慣れる」が私の今年の目標です。令和はまだ始まったばかり。現状を、固定概念の見直しと新しい体験ができる良い機会と捉えて、前向きに歩んでいければと思います。

本年が、日本ペプチド学会および皆様方にとって、良い 1 年になりますように心からお祈りいたします。

119 号アンケートフォーム URL :
<https://forms.gle/cRk8rYEs91fcnMCR9>

(編集委員：児島 千恵)

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒 562-0015 箕面市稲 4-1-2

一般財団法人蛋白質研究奨励会内

発 行 日：2021 年 1 月 28 日

編集委員

玉村 啓和（担当理事）

（東京医科歯科大学 生体材料工学研究所）

TEL 03-5280-8036, FAX 03-5280-8039

E-mail : tamamura.mr@tmd.ac.jp

巢山 慶太郎（九州大学 基幹教育院）

TEL 092-802-5849

E-mail : suyama@artsci.kyushu-u.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：児島 千恵）