



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.123

2022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。

一昨年4月に新型コロナ感染拡大の初期に会長を拝命し、何度かの感染拡大ピークやワクチン接種、学会活動はすべてオンラインなどコロナ禍時代を2年近く過ごしてまいりました。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。唯一のコロナ禍の会長となることを期待したいと思います。

2021年は、緊急事態宣言や無観客の東京オリンピックなど、コロナ一色の年でした。テレワークやオンライン授業、生活もコロナ対応のものが定着しました。日本ペプチド学会においても、新たなスタイルによる学会活動が定着した様に感じられます。

日本ペプチド学会の最も重要な活動である2021年度ペプチド討論会は東京薬科大学の林良雄先生のお世話のもと昨年同様に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るとわかりますように、オンライン開催が定着して大盛会のうちに終わることができました。改めて林先生、スタッフの先生方のご努力に感謝申し上げます。オンライン開催からいろいろなことを学んできています。講演はオンラインの方がしっかり聞くことができ、ポスターもビデオでの説明とポスターごとにZoomの部屋を用意することにより、十分な討論ができたのではないかと思います。懇親会では、参加者の方々と親睦を深めるためにいろいろな工夫がされており、お酒を飲みながらオンライン歓談ができました。しかし、学会で最も楽しみな、会場に集まり、顔を見ながら討論する交流といった面では、オンラインではかなりハードルが高く、対面での学会開催が待ち望まれるところです。

2021年度は日本ペプチド学会賞の選考が行われ、三原久和先生（東京工業大学）が受賞されました。三原先生のこれまでの学術貢献、学会及び社会への貢献が評価されての受賞です。また、日本ペプチド学会奨励賞の選考も行われ、三澤隆史先生（国立医薬品食品衛生研究所）と森本淳平先生（東京大学）のお二人が受賞者に決定いたしました。各賞受賞者は、第58回ペプチド討論会で各々の受賞内容について講演されま



野水 基義

した。

これまで日本ペプチド学会に多大な貢献をされた下東康幸先生（九州大学名誉教授）、藤井信孝先生（京都大学名誉教授）、北田千恵子先生（元武田薬品工業株式会社リサーチマネージャー）の3名が名誉会員となりました。これまでのご貢献に感謝するとともに、本会へのご支援をお願いします。

昨年8月には2年ぶりに若手の会がオンラインで開催されました。門之園哲哉先生（東京工業大学）、小松徹先生（東京大学）、三木卓幸先生（東京工業大学）のお世話で開催され、200人を超える参加者が集まり大盛会でした。時代をリードする若い世話人の先生達らしく新しいオンライン機能をふんだんに使った若手の会を行っていただきました。時代とともに進化する学会形式が体験でき、若手研究者の方々も大変参考になったのではないかと思います。

本年はアフターコロナを見越して、アメリカやヨーロッパペプチド学会をはじめ主要国際シンポジウムが予定されております。日本ペプチド学会のホームページに情報を掲載しています。若手会員がこれらの国際学会に参加される場合にはペプチド学会からTravel Awardを受けることができます。是非これらの支援事業を積極的に活用していただきますようお願いいたします。

最近、日本の研究力の低下が問題となっており、科学技術力の向上が叫ばれています。日本ペプチド学会の研究者の皆様、特に若い研究者の方々が各々の研究目標に邁進し世界に羽ばたける環境や情報の整備に貢献するのが本学会の使命であるとあらためて感じております。会員の皆様の役に立つ学会活動を行っていききたいと思います。最後になりましたが、皆様方の健康と研究の進展を願って、新年のあいさつ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 58 回ペプチド討論会（オンライン）開催報告

第 58 回ペプチド討論会が、2021 年 9 月 20 日から 22 日まで 3 日間に渡り、オンラインで開催されました。昨年の第 57 回に引き続き、新型コロナウイルス感染症の影響で対面での開催を実現できませんでした。ご参加の皆様にはご心配・ご不便をおかけしたかと存じます。しかし、温かいご支援のおかげで、一般・学生・招待・賛助会員含め参加登録者数は 395 名となり（前回より 33% 増）、発表件数も口頭発表 52 演題（内訳：受賞講演 4 演題、招待講演（海外）6 演題、一般口頭発表 22 演題（うち海外 3 演題）、若手口頭発表 20 演題（うち海外 1 演題）、ポスター発表 122 演題（うち海外 3 演題）の計 174 演題（前回より 23% 増）と盛会となりました。オンライン参加の皆様、ご発表いただきました先生方、さらに座長の労をお取りくださった先生方に重ねて御礼申し上げます。

また、企業を初め多くの皆様からご支援を頂戴しました。寄付（10 件）、協賛（1 件）、若手研究者支援（1 件）、要旨集広告掲載（15 件）、バナー広告掲載（12 件）、バーチャル展示会／動画広告（6 件）、オンラインセミナー（5 件）のご支援がありました。多くのご支援を賜りましたことに心より感謝申し上げます。

今回の討論会では、オンライン開催の利点を活かして、6 演題の招待講演は全て海外で活躍される第一線の高名な先生方を招聘いたしました。Lei Liu 先生（Tsinghua University, China）、Gong Chen 先生（Nankai University, China）、Paramjit S. Arora 先生（New York University, USA）、Michael D. Burkart 先生（UCSD, USA）、さらに韓国ペプチドタンパク質学会（KPPS）との交流活動として、Seokhee Kim 先生（Seoul National University）、Jung-Min Kee 先



林 良雄

生（UNIST）に海外よりご講演いただきました。当日はうまく ZOOM が繋がるかとドキドキでしたが、大きなトラブルもなくご講演いただけたことに安堵しました。招待講演をご快諾していただき、興味深い講演を下さった先生方にこの場をお借りして、厚く感謝申し上げます。また、対面ではなかなか日本までお越しに出来ない海外の研究者の方々の一般口頭発表やポスター発表が複数ございました。これもオンライン開催の強みと感じました。また、最終日には、次回 EPS の Chair である Meritxell Teixidó 先生に特別出演いただき、順延されていた EPS の開催をご紹介いただきました。2022 年 8 月 28 日から、バルセロナ近郊の風光明媚な Sitges で開催です。楽しみです。ぜひ皆さん研究成果を持って EPS に参加しましょう。会議のほぼ全てを英語で運営できるに至った現在のペプチド討論会において、例えば対面とハイブリッドの両方式で併催すれば、日本からより積極的に世界へペプチド科学を発信し、世界の隅々から最新のペプチド科学を国内で享受できる可能性があります。ポストコロナ時代の新局面として今後さらなるペプチド討論会の国際化をご検討いただけると有り難い次第であります。

討論会初日の若手口頭発表では、最優秀賞（Excellent Stone Award）として Yuchen Zhang さん（東京大学）が、優秀賞（Good Stone Award）として小林大志朗さん（徳島大学）、田淵雄大さん（電気通信大学）、Wenyu Liu さん（東京大学）、岩田恭宗さん（京都大学）、松田研一さん（北海道大学）の合計 6 演題が選ばれました（図 1）。一方、ポスター発表は、事前投稿のオンデマンド発表資料・質問掲示板の活用と共にリアルタイムでの発表・討議が行われ、9 演題がポスター発表優秀賞に選ばれました。受賞者は、児玉有輝さん（静岡大学）、橋本雅也さん（名古屋大学）、田中晶子さん（静岡大学）、児玉達哉さん（北海道大学）、織田大河さん（三重大学）、新原光貴さん（東京大学）、河原大樹さん（東京工業大学）、河上直也さん（東京大学）、大村紀子さん（東京薬科大

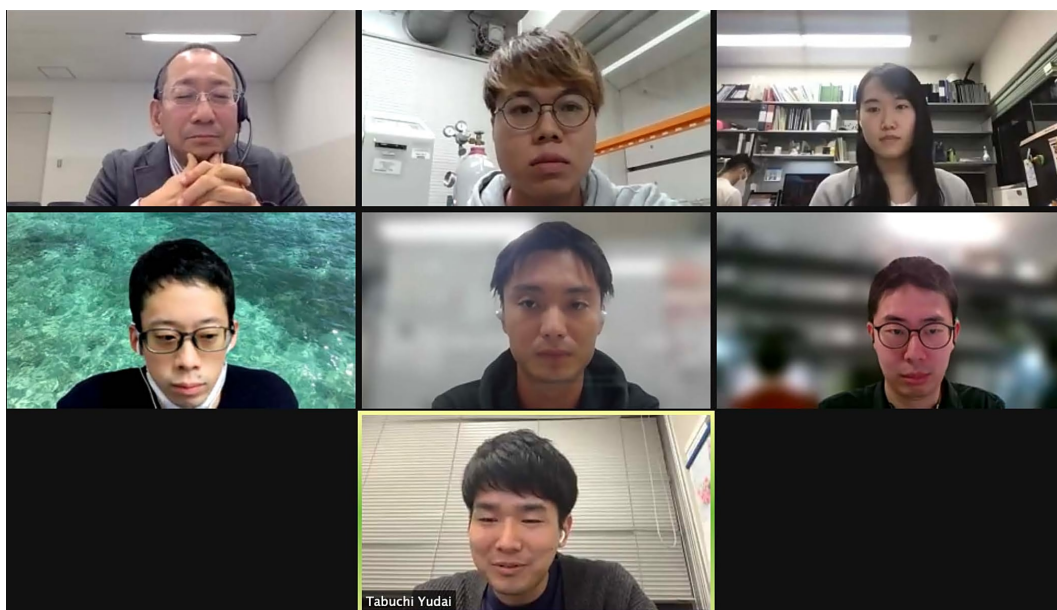


図 1 若手口頭発表賞（Zoom 画面）

学)です(図2)。ご受賞のお祝いを申し上げます。そして、皆様のペプチド科学研究の益々の発展、および日本ペプチド学会でのさらなるご活躍を楽しみにしております。若手口頭発表賞およびポスター発表優秀賞の選考を実施くださいました選考委員の先生方にあらためて御礼申し上げます。

討論会最終日の早朝に新型コロナウイルスの影響で受賞講演が順延されていた Philip E. Dawson 先生 (The Scripps Research Institute) の 2020 年度 Akabori Memorial Award 受賞講演が挙行されました(図3)。ご講演タイトルは「Chemoselectivity in Protein Synthesis」でありました。お話の中で、今日では長鎖ペプチドやタンパク質の化学合成において欠くことのできない、Dawson 先生の創造した Native Chemical Ligation への最初の挑戦を記した実験ノートが紹介されました。ペプチド化学史における感動的瞬間に触れることができたように感じました。余談ですが、受賞メダルは Dawson 先生のお手元にはまだありません。コロナが落ち着いたところでのお渡しになります(笑)。

さらに最終日の午後に、日本ペプチド学会「学会賞」と「奨励賞」の受賞講演が行われました。2021 年度の学会賞は、日本ペプチド学会前会長でおられました三原久和先生(東京工業大学)に贈られました(図4)。ご講演のタイトルは「デノボデザインを基軸とする機能性ペプチドの創製」で、三原先生の長きにわたるペプチド科学への多大なご貢献と機能性ペプチドの戦略的創製の成果を拝聴する貴重な機会となりました。あらためてお祝いと日本ペプチド学会への長年のご貢献に感謝申し上げます。そして先生の益々のご活躍を祈念いたします。2021 年度の奨励賞は、森本淳平先生(東京大学)と三澤隆史先生(国立医薬品食品衛生研究所)がご受賞されました(図5, 6)。おめでとうございます。お二人のご講演タイトルは、それぞれ「ペプチドの立体配座研究と生体分子認識への展開」と「次世代中分子ペプチド医薬品創出に向けた基盤技術の開発」でありました。お二人のご講演を拝聴しながら、諸先輩方の築いたペプチド科学の発展の歴史を、多くの現役の先生方が大切に紡ぎながら、若手研究者に手渡され、そしてペプチド科学の新たな 1



図2 ポスター発表優秀賞受賞者 (Zoom 画面)

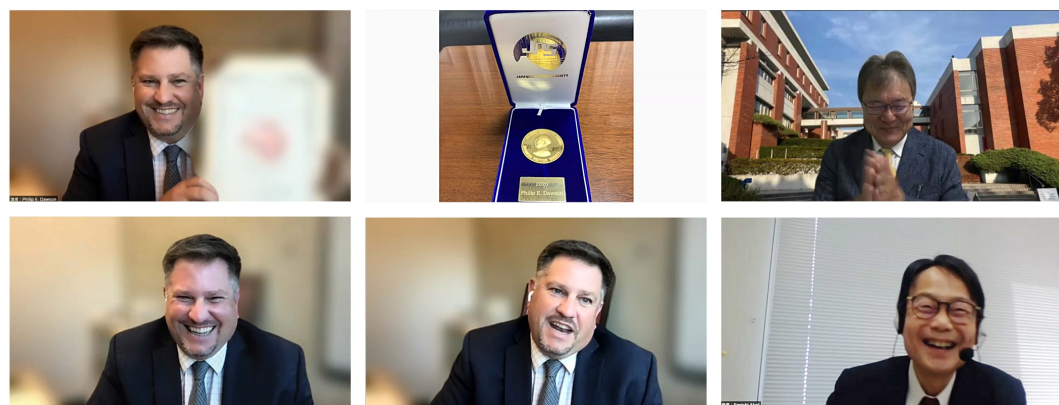


図3 Dawson 先生の 2020 年度 Akabori Memorial Award 受賞式とご講演 (Zoom 画面) (上段右は、日本ペプチド学会野水会長, 下段右は、赤路座長)

ページが描かれ、未来へと大きく羽ばたき続けているということを強く感じました。森本先生と三澤先生のペプチド研究の益々のご発展を祈念するとともに、全ての若手研究者が日本ペプチド学会を礎に共創的な交流を深め、世界へ飛翔されることを期待しています。

ところで、オンライン開催での企業のご参画として、3日間に渡り5社にペプチド科学に関連の深い製品・技術に関するご講演を、企業オンラインセミナーとしてお昼の時間に開催いただきました。各セミナーには平均75名がご参加くださいました。ご開催の企業及び講師の皆様、ならびに各セミナーにご参加くださった皆様に御礼申し上げます。一方、オンライン開催の利点を活かして、今回はバーチャル展示会／動画広告を6社にご開催いただきました。オンデマンドで企業情報を取得できるバーチャル展示会場をご用意すると共に、セッション開始前などには広報動画を放映いたしました。さらにポスターセッションの時間帯では、バーチャル展示会場の訪問者と企業ご担当者様とのインタラクティブな交流の場も持っていただきました。

懇親会（Social Gathering）は、本来の対面での会には到底及びませんが、2日目の夕刻にバーチャル小部屋を16室ご用意し、オンラインで開催いたしました。

た。学生の部屋、中年の部屋、重鎮の部屋、松の間など柔らかいものから、ペプチド合成の間、生理活性ペプチドの間、未来のペプチド科学を考える間など、ペプチド科学に焦点を絞った特別の小部屋もご用意しました。当初はこのような箱だけのご用意で、本当に皆様のご参加が叶うのか心配しておりました。しかし、取り越し苦労で、実際はとても盛況でありました。終了予定時間でやむなく各部屋を締めさせていただきましたが、皆様お話が尽きないようでありました。後日お聞きしますとある先生方におかれましては、オンラインでの有志の2次会も楽しまれたようです。若手ペプチド夏の勉強会をはじめ、まさに皆様の常日頃からの深い親睦の故かと思います。皆様が学会を通じて多くのペプチド仲間をお作りいただくことが、ペプチド科学の発展にとっても大切ですね。今回のオンライン懇親会も少しお役に立てたかなと思っております。

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実行委員会の小出隆規先生（早稲田大学）、三原久和先生（東京工業大学）、野水基義先生（東京薬科大学）、玉村啓和先生（東京医科歯科大学）、堤浩先生（東京工業大学）、増田亮先生（早稲田大学）、辻耕平先生（東京医



図4 三原先生の2020年度日本ペプチド学会「学会賞」受賞講演（Zoom画面）（右は、坂口座長）

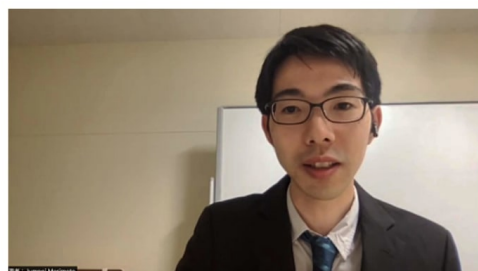


図5 森本先生の2020年度日本ペプチド学会「奨励賞」受賞講演（Zoom画面）（右は、菅座長）

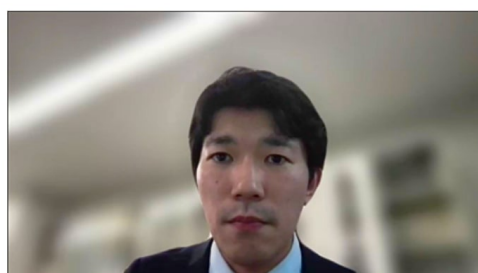


図6 三澤先生の2020年度日本ペプチド学会「奨励賞」受賞講演（Zoom画面）（右は、出水座長）

科歯科大学), 山田雄二先生(東京薬科大学)ならびに, 東京薬科大学・薬学部・薬品化学教室の谷口敦彦先生, 田口晃弘先生, 今野翔先生, 水口友絵秘書, そして薬品化学教室の院生・学部生の皆様に心より御礼申し上げます。さらに種々の事務活動, Web システム運営に多大なご支援をくださっ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にご協力いただきました株式会社プロコムインターナショナル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丁寧にご教示くださいました第 57 回をお世話された松浦和則先生に御礼申し上げます。慣れないオンライン開催のため, 皆様には行き届かないことも多々あったかと存じます。この場をお借りして深謝申し上げます。そして, 日本ペプチド学会への皆様の引き続きのご支援を賜りますよう, どうぞよろしくお願い申し上げます。

次年度以降もペプチド討論会は続いて参ります。次回第 59 回は, 東北大学・土井隆行先生, 山形大学・今野博行先生のお世話で, 2022 年 10 月 26 日(水)~28 日(金)の 3 日間に渡り, トークネットホール仙台(仙台市民会館)にて開催されます。新型コロナウイルス感染症の状況はまだ見通せませんが, 今回は, 東北の地にて対面で皆様にお会いできますことを, そして皆様の研究の益々のご発展を祈念しつつ, 筆を置かせていただきます。

はやし よしお
東京薬科大学 薬学部 薬品化学教室
yhayashi@toyaku.ac.jp
<https://www.hinka-toyaku.com/>

2021 年度日本ペプチド学会賞受賞に際して

この度, 日本ペプチド学会賞を「デノボデザインを基軸とする機能性ペプチドの創製」の研究題目で受賞することができ, 約 40 年間ペプチド科学に携わっているものとして大変光栄です。今後も日本ペプチド学会の発展に貢献できるように努力していきたいと思っています。選考にあたられました委員の先生方および野水会長を含む日本ペプチド学会の関連の先生方に厚く御礼申し上げます。今回の受賞は, 九州大学理学部, 九州工業大学工学部, 長崎大学工学部, 東京工業大学生命理工学研究科および生命理工学院の学生・卒業生・スタッフ全体の成果であり, また研究を支えていただいた恩師の先生方, 先輩, 同僚の方々のご協力とご支援の賜物であり, この場を借りて厚く御礼申し上げます。

筆者は, 1986 年に九州大学理学研究科化学専攻にて博士を取得後, 米国ロックフェラー大学に博士研究員として留学しました。九州大学では, 泉屋信夫先生, 加藤哲夫先生, 青柳東彦先生, 脇道典先生, 李



三原 久和

相男先生, 下東康幸先生等にペプチド化学のいろはをご教示いただきました。ロックフェラー大学においては, Emil Thomas Kaiser 研究室において, オキシム樹脂を用いたタンパク質の化学合成研究を実施し¹, ペプチド・タンパク質のデザイン・機能研究や分子生物学研究の考え方を, Kaiser 先生をはじめ多くの米国人や日本人研究者から学ぶ機会を得ました。1988 年に帰国後, 九州工業大学工学部助手として着任し, 大学教員としての教育研究のキャリアを開始しました。ここでは初めて工学部教員として, 西野憲和先生とともに機能性ペプチドの創製に関する研究をスタートさせました。その後, 1993 年に長崎大学工学部(青柳東彦先生), 1995 年東京工業大学生命理工学部(上野昭彦先生)に助教授として着任し, さらに 2005 年に生命理工学研究科教授に昇任させていただき, デノボデザインを基軸とするさまざまなペプチド科学の研究を展開する機会を与えていただきました。東京工業大学では, 研究以外でも各種研究会活動や学院長, 副学長等の大学の教育研究の運営にも関わらせていただき, ペプチド科学のみならず多くの生命科学に関する経験を積むことができております。本学会賞の「デノボデザインを基軸とする機能性ペプチドの創製」は, 九州大学, 九州工業大学, 長崎大学での研究を母体にした東京工業大学における研究成果に基づいております。

ペプチド・タンパク質は, 特異的な立体構造を形成し, その構造上のアミノ酸の官能基配置に基づく分子認識能や機能を発揮します。この立体構造を自在に設計し操作できれば, 種々の機能性ペプチドを創出できると考えられます。筆者らは, α ヘリックスや β シート等の二次構造やその組み合わせの立体構造ペプチドを種々デザイン・合成し, さらにアミノ酸を置換したライブラリを作製することにより, 高機能のペプチドを探索する研究を展開してきました。このような α ヘリックスや β シート構造をアミノ酸配列から設計し, 合成するペプチドのデノボデザイン研究に 1980 年代の初期の段階から参画し², 新規の機能性ペプチドからなるデザインペプチドシステム(ペプチド工学)を開拓してきました。現在では当たり前の手法となっているペプチドのデザインというコンセプトの導入は, その後のペプチドライブラリの技術とあいまって, 従来のアミノ酸置換によるペプチドの構造活性相関研究の方法を大きく転換させる研究手法となっています。加えて, ペプチドやタンパク質の構造解析技術, 相互作用分析技術や分子生物学手法, 細胞生物学手法を取り入れて, ケミカルバイオロジーや合成生物学, またバイオマテリアル科学の発展に大きく貢献してきていると思います。

1. ペプチドバイオチップの創製とタンパク質や細胞の新規解析システムの構築

DNA チップをはじめとして, プロテインチップ, 抗体チップ等多種のバイオチップの研究が精力的に実施されています。我々は, ペプチドの α ヘリックスや β シート構造に基づく高度な分子認識能力に着目し, それらの蛍光性ペプチドのライブラリをデノボデザイン手法により種々構築し, 基板上に配置することによ

り、他で研究されているプロテインチップとは一線を画すタンパク質を検出するペプチド性バイオチップを世界に先駆けて開発しました（図 1）。このペプチド性バイオチップは、検出対象のタンパク質に対して、ライブラリペプチドがそれぞれ異なる結合性をもつために、種々の蛍光強度変化を示すことを利用し、これらの多様な蛍光応答シグナルをプロテインフィンガープリント（PFP）というカラーバーコードとして表現する新規のバイオチップシステムです³⁻⁶。初めに、酵素とその阻害剤の相互作用様式をモチーフとして、 β ループ構造を有する 126 種類からなる蛍光基結合ペプチドライブラリをデザイン・合成しました。各ペプチドは、種々のタンパク質に対して異なる結合特性を有し、異なる蛍光強度増加を示しました。この 126 種の蛍光強度変化データを 256 調のカラーバーコードパターンに変換し、種々のタンパク質ごとの PFP の作製に成功しました（図 2）。また、112 種の α ヘリックスのデザイン蛍光ペプチドライブラリを疎水性や電荷性を系統的に変化させて構築し、これらの各ペプチドが種々のタンパク質に対して異なる蛍光応答を示すデータを 2 次元 PFP として構築しました（図 2）。構造的に近似する同類タンパク質は同様な PFP を示し、異なるタンパク質は大きく異なるパターンを示しました。これらの PFP データは定量的な数値として計算でき、タンパク質の相同性マップの作成にも成功しま

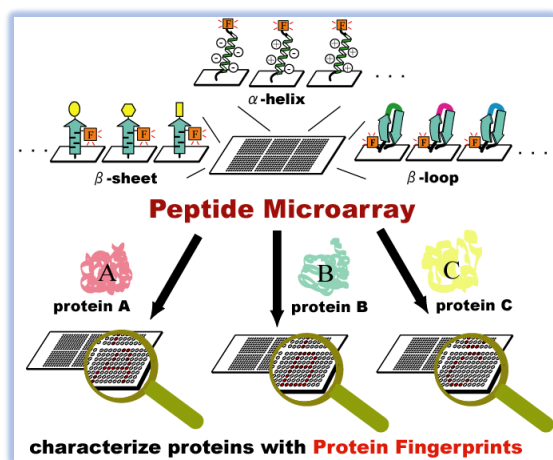


図 1 デザインペプチドライブラリを利用したペプチドチップ

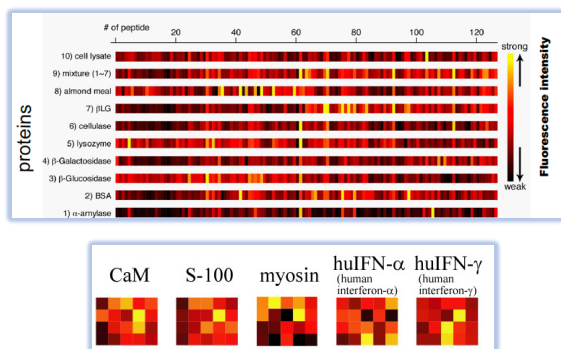


図 2 β ループペプチドを用いた PFP (上) と α ヘリックスペプチドを用いた 2 次元 PFP (下) の例

した。このようなパターン認識性バイオチップは、低分子の化合物チップやペプチドチップ、レクチン等のプロテインチップの解析様式としても他の研究者により独立した研究として使用され、また軒原博士のベンチャー企業（ハイペップ研究所）による実用化へ供与されています。

さらに同様のペプチドチップをガン細胞の識別を行うことのできるバイオチップに展開する研究も行っています。 α ヘリックスペプチドライブラリから見出した新規の細胞挿入ペプチド（CPP）群を利用した独創性の高い細胞解析システムや薬物送達システムの構築に成功しました⁷⁻¹⁰。この目的のために 202 種類の蛍光基結合の α ヘリックスペプチドライブラリをデザイン・合成しました。202 種のペプチドは、各種培養ガン細胞に対して種々のレベルの細胞挿入（CP）活性を示しました。これらの CP 活性は 1 残基のアミノ酸配列の違いでも大きく異なり、また細胞の種類によっても CP 活性が大きく変化しました。これらの CP 活性データをセルフフィンガープリント（CFP）として表現し、ガン細胞選択的な細胞タイピングのバイオチップ技術基盤を確立しました。さらに、本研究で見出したガン細胞選択性の異なる CPP を金ナノ粒子に結合させて、抗ガン剤ドキソルビシンと複合化させることにより、nM レベルでのガン細胞選択的な薬物送達システムの構築を達成しました¹¹。

構造や疎水性、電荷性を系統立ててデザインしたペプチド群を用いることにより、タンパク質やガン細胞を識別する新しい概念のペプチドバイオチップシステムを創出することができました。また、金のナノ薄膜表面上の分子膜の厚さと比例した金の反射光特性を利用したペプチドチップの検出システムも開発しました¹²。

2. 自己集合化ペプチドの創製とアミロイド病関連ペプチドおよび細胞工学用マトリクス展開

立体構造を制御したペプチドは、その自己集合化のコントロールを行うことも可能にします。たとえば適切にデザインされた β シート構造は、ネットワーク化された水素結合により、絹の繊維構造と類似した自己組織化された構造体を構築します。我々は、種々の β シート構造ペプチドのデノボデザインと自己集合化に関する研究を精力的に実施しました¹³⁻¹⁷。筆者らは、まずプリオンタンパク質が引き起こす α ヘリックスから β シートへと構造転移し、アミロイド様ナノ構造に自己集合化するペプチドのデザインに挑戦しました。このために 14 アミノ酸残基（2 回のヘプテッドリピート）のコアからなる 2α ヘリックスの両 N 末端にアダマンタン基やオクタノイル基の疎水性欠陥を導入しました。この疎水化した部位を有する 2α ヘリックスペプチドは、 α - β 構造転移をゆっくりと起こし、アミロイド様ナノファイバー構造を形成しました（図 3）。このペプチド中の E K E K の電荷性アミノ酸をすべての E と K の 16 種のペプチド群として合成し、それぞれを 1 : 1 で混合すると、両親媒性の逆並行 β 構造の E マイナスと K プラスの電荷がすべてマッチするときにアミロイド様構造へと自己集合化することがわかりました。この相補的な電荷認識を利用するこ

とにより、2 種類や 3 種類、4 種類の異なる配列を有するペプチド混合の自己集合化ナノファイバーを作製できました。これらの β シートペプチドの相補的な自己集合化特性を応用して、さまざまな自己組織化ナノ構造を構築し、タンパク質等をそのナノ構造上に配置するペプチド性分子認識材料の構築にも応用しています^{18,19}。

β シート構造の集合体は、アルツハイマー病等の重篤な脳疾患とも関連しています。アルツハイマー病アミロイドペプチドの自己集合化を検出し、阻害するペプチド群の創製に成功しました²⁰⁻²²。アルツハイマー病の原因ペプチドである $A\beta$ ペプチド (42 残基) の集合化コア部位 (14-23 位) を模倣した 10 残基の両親媒性ペプチドを種々デザインしました。これを細胞毒性の高い $A\beta$ のオリゴマーに混合することにより、デザインペプチドが毒性の $A\beta$ ペプチドをアミロイド様ファイバーへと増幅変化させ、毒性のないペプチドファイバー中に取り込み、その毒性を大きく低下

させるシステムの構築に成功しています。このアミロイド増幅ペプチドは、少量の $A\beta$ ペプチドを大量のペプチドナノファイバーとして増幅させるので、 $A\beta$ ペプチドの簡易型検出システムとしても利用可能です。このデザインペプチドによる $A\beta$ ペプチドとの混合自己集合化は、ペプチドどうしの疎水性と電荷の上記モデルペプチドでの相補的概念を応用したものです。

また細胞毒性のない β シート構造性デノボデザインペプチドに着目して、その自己集合化構造を人工の細胞外マトリクスとしてコラーゲン等のタンパク質材料の代替細胞工学材料として利用する研究においても興味深い独創的な成果をあげています²³⁻²⁵。我々の開発した自己集合化ペプチド E1Y9 は、カルシウムイオン存在下に β シート性のナノファイバーを構築し、ハイドロゲルを生成します。E1Y9 ペプチドゲルは、種々の培養細胞を表面に効率よく接着し、さまざまな細胞集合体の形を構築しました (図 4)。さらに E1Y9 の C 末端に RGD 等の種々の細胞活性化ペプチドを導入することにより、細胞接着や細胞成長・分化を促進させるペプチドマテリアルとすることができます。例えば、ラミニンタンパク質由来の IKVAV 配列を導入したペプチドナノファイバーは、ラミニンタンパク質と同等の神経突起伸長活性を示しました。E1Y9 ペプチドゲルは、抗ガン剤を混合してマウスに注射でき、体内でのカルシウムイオンでよりゲル化する抗ガン剤徐放性のケモセラピーバイオマテリアルとして応用できました。この技術により、マウス皮下の大腸がん腫瘍のサイズを大きく減少させることに成功しました。

近年これらの成果は、三木助教によって細胞内狭雑環境での自己集合化ペプチドによるタンパク質集合体の人工構築と機能化研究に展開されています²⁶。Y9 を基盤にデザインした Y15 ペプチドタグを導入した蛍光性タンパク質 (GFP や AzamiGreen 等) は、細胞内で自己集合化しタンパク質の集合体粒子を構築しました。この集合体は、細胞内のタンパク質をリクルートし、膜のないオルガネラ様の細胞内機能を人工的に惹起しました。

我々が展開してきているペプチド自己集合体は、相補性概念のデザインによるものであり、そこに機能性の部位を導入することにより、病因タンパク質の毒性低下や分子認識材料、さらに生理活性バイオマテリアルへの応用を可能にするものです。

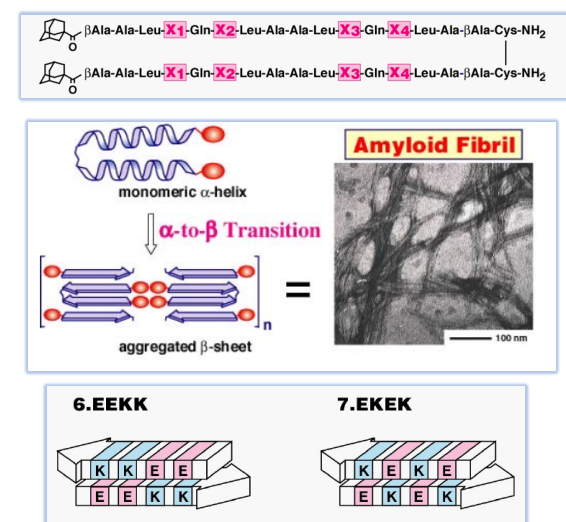


図 3 α - β 転移性 2 α ヘリックスペプチドとアミロイド様ナノファイバーおよび逆並行 β シートの相補的電荷相互作用の例。7.EKEK (X1-4 位) が最初のデザインペプチド (X1-4 の位置で E あるいは K を用いた組み合わせにより 1.EEEE から 16.KKKK までの 16 種のペプチドを構築した)

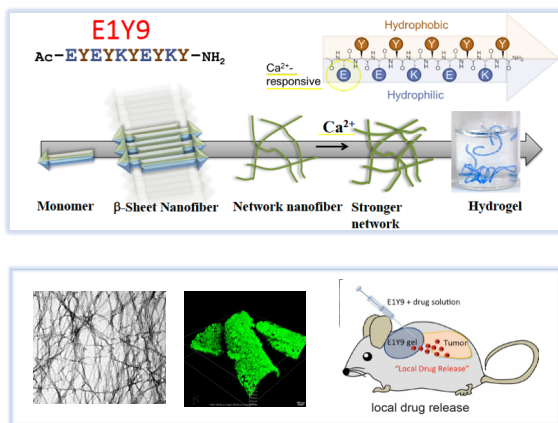


図 4 E1Y9 ペプチドゲルとそのナノファイバー構造・細胞接着画像および in vivo 薬剤徐放

3. 立体構造制御したペプチドライブラリおよび低分子複合化ライブラリの構築

新規の機能性ペプチド創製のためには、多種類のペプチドから構成されるライブラリの構築が有用な手法です。我々は、ペプチドのデノボデザイン研究に基づき、立体構造を設計したペプチドのライブラリを化学合成法あるいはファージ提示法を駆使して構築し、新規の機能性ペプチド群を創出しました²⁷⁻²⁹。また単糖等低分子化合物を複合化したペプチドのライブラリを創製する化学修飾ペプチドファージ提示法を開発しました³⁰⁻³² (図 5)。ペプチドのファージ提示法でよく利用される線状ファージ M13 類似の fd ファージで、その pIII タンパク質の Cys 残基をすべて置換した non-Cys-pIII ファージをスイス EPFL 教

授の Heinis 先生からご提供いただいて利用しています。このファージ提示法を用いて、単糖結合の β ループや α ヘリックスペプチドライブラリ、さらに staple 架橋基あるいは蛍光基を導入した α ヘリックスペプチドライブラリを構築し、ガン関連のレクチンタンパク質ガレクチン類や hDM2 タンパク質等を選択的に結合するペプチドのスクリーニングを行っています。この技術を展開して、堤准教授は、各種薬物を結合した構造制御ペプチドライブラリ (Drug Peptide Conjugate : DPcC) 研究を進めています。本法は従来のファージ提示法では不可能であった、糖や薬剤、架橋基、蛍光基を複合化した機能性デザインペプチドライブラリを容易に取得できるものであり、標的タンパク質選択的結合ペプチドの創薬基盤研究においても画期的なものだと思います。

おわりに

以上のように、筆者の機能性ペプチドの創製に関する研究は、35 年に及ぶペプチドやタンパク質のデノボデザイン研究に基づいた立体構造を制御したペプチドの構築により展開されていると自負しております。これらの機能性ペプチド研究は、ペプチドバイオチップ、アミロイドペプチドの制御、人工細胞外ペプチドマトリクスや新規ファージ提示ペプチドライブラリ構築法等の有用なペプチド工学システムの創出に結びついています。これからも合成技術や分子生物学手法を含むオリジナルな研究手法によってデザインペプチド利用の先端研究を進めていきたいと思っております。

最後に、1982 年の第 20 回ペプチド化学討論会から毎年討論会に参加し、2021 年の第 58 回ペプチド討論会まで、日本ペプチド学会において多くの研究成果発表をさせていただきました。また学会において、評議員 (1994~) および理事 (2002~) の職を、また第 15 期 (2018~2019 年度) に会長を、16 期 (2020~2021 年度) に副会長を務め、学会運営においてもたくさんのごことを勉強させていただきました。さらに国際ペプチドシンポジウムをはじめとした、欧米アジアでの多くの国際会議にも参加する機会を与えていただきました。学生や助手の頃には想像もしていなかった経験をさせていただき、走り抜けてきた 40 年間、育ててい

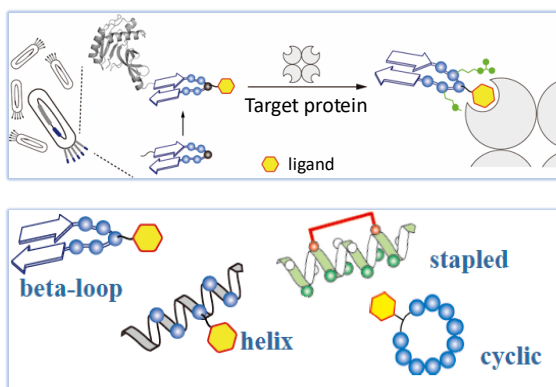


図 5 低分子化合物修飾を可能にしたデザインペプチドのファージ提示ライブラリの構築

ただいた学会に大変感謝しております。学会メンバーの方々におかれましては、日本ペプチド学会が有する伝統と国際的ネットワークを大いに利用して、ペプチド科学の革新に向けてご研究をますます発展されることをお祈りいたします。

本原稿の執筆過程 (2021 年 11 月) 中に、青柳東彦先生のご逝去の報に接しました。青柳先生のペプチド科学と学会への貢献に感謝して、ご冥福をお祈りいたします。

参考文献 (代表的なものを記載しました)

- Mihara, H.; Kaiser, E. T. Science 1988, 242, 925-927.
- Mihara, H.; Kanmera, T.; Yoshida, M.; Lee, S.; Aoyagi, H.; Kato, T.; Izumiya, N. Bull Chem Soc Jpn 1987, 60, 697-706.
- Takahashi, M.; Nokihara, K.; Mihara, H. Chem Biol 2003, 10, 53-60.
- Usui, K.; Ojima, T.; Takahashi, M.; Nokihara, K.; Mihara, H. Biopolymers 2004, 76, 129-139.
- Usui, K.; Tomizaki, K.-Y.; H. Mihara, H. Mol BioSyst 2006, 2, 417-420.
- Tomizaki, K.-Y.; Usui, K.; Mihara, H. Chem-BioChem 2005, 6, 782-799.
- Usui, K.; Kakiyama, T.; Tomizaki, K.-Y.; Mie, M.; Kobatake, E.; Mihara, H. Bioorg Med Chem Lett 2011, 21, 6281-6284.
- Usui, K.; Kikuchi, T.; Mie, M.; Kobatake, E.; Mihara, H. Bioorg Med Chem 2013, 21, 2560-2567.
- Usui, K.; Kikuchi, T.; Tomizaki, K.-Y.; Kakiyama, T.; Mihara, H. Chem Commun 2013, 49, 6394-6396.
- Usui, K.; Tomizaki, K.-Y.; H. Mihara, H. in Peptide Microarrays-Method and Protocols, Methods in Molecular Biology 2016, 1352, 199-210, Springer.
- Park, H. J.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Biomaterials 2014, 35, 3480-3487.
- Syahir, A.; Usui, K.; Tomizaki, K.-Y.; Kaji-kawa, K.; Mihara, H. Microarrays 2015, 4, 228-244.
- Mihara, H.; Takahashi, Y. Curr Opin Struct Biol 1997, 7, 501-508.
- Takahashi, Y.; Ueno, A.; Mihara, H. Chem Eur J 1998, 4, 2475-2484.
- Sakamoto, S.; Obataya, I.; Ueno, A.; Mihara, H. Chem Commun 1999, 1111-1112.
- Matsumura, S.; Uemura, S.; Mihara, H. Chem Eur J 2004, 10, 2789-2794.
- Takahashi, Y.; Ueno, A.; Mihara, H. Chem-BioChem 2002, 3, 637-642.
- Sawada, T.; Takahashi, T.; Mihara, H. J Am Chem Soc 2009, 131, 14434-14441.
- Sawada, T.; Mihara, H.; Serizawa, T. Chem

- Record 2013, 13, 172–186.
20. Takahashi, T.; Ohta, K.; Mihara, H. Chem-BioChem 2007, 8, 985–988.
 21. Suzuki, M.; Takahashi, T.; Sato, J.; Mie, M.; Kobatake, E.; Mihara, H. ChemBioChem 2010, 11, 1525–1530.
 22. Takahashi, T.; Mihara, H. Acc Chem Res 2008, 41, 1309–1318.
 23. Fukunaga, K.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Pept Sci 2013, 100, 731–737.
 24. Fukunaga, K.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Pept Sci 2016, 106, 476–483.
 25. Fukunaga, K.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Bull Chem Soc Jpn 2019, 92, 391–399.
 26. Miki, T.; Nakai, T.; Hashimoto, M.; Kajiwar, K.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Nat Commun 2021, 12, 3412.
 27. Jumawid, M. T.; Takahashi, T.; Yamazaki, T.; Ashigai, H.; Mihara, H. Prot Sci 2009, 18, 384–398.
 28. Sawada, T.; Ishiguro, K.; Takahashi, T.; Mihara, H. Mol BioSyst 2011, 7, 2558–2562.
 29. Maeda, Y.; Sawada, T.; Takahashi, T.; Yuasa, H.; Mihara, H. Bioconj Chem 2020, 31, 2533–2540.
 30. Arai, K.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Bioorg Med Chem Lett 2013, 23, 4940–4943.
 31. Chang, I. V.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Mol BioSyst. 2017, 13, 2222–2225.
 32. Anananuchatkul, T.; Chang, I. V.; Miki, T.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. ACS Omega 2020, 5, 5666–5674.

みはら ひさかず
東京工業大学 生命理工学院
hmihara@bio.titech.ac.jp
<http://www.mihara.bio.titech.ac.jp>

令和三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「ペプチドの立体配座研究と生体分子認識への展開」について概説させていただきます。



森本 淳平

1. はじめに

中分子創薬の要として期待されるペプチドには、細胞膜透過性が低いという課題があり、それゆえ、高い細胞膜透過性を示す人工中分子の開発が求められています。数ある人工中分子の中で、ペプチドは、細胞膜透過性の高い分子として注目されてきました。1992年に、N置換グリシンのオリゴマー（オリゴNSG）がペプチドとして提唱され¹（図1左）、後に、オリゴNSGが高い膜透過性を示すことが実証されました²。しかしながら、初期に開発されたG-protein coupled receptors (GPCR) リガンド³以外には、タンパク質に高い結合親和性を示すペプチドは報告されておらず、ペプチドはタンパク質への結合親和性が不十分であることが示唆されています。これは、ペプチドの主鎖二面角の回転自由度が大きく、特定の立体配座を安定に形成できないことが1つの大きな要因であると考えられています。

このようなオリゴNSGの立体配座不安定性の課題を克服する方法の1つとして、2013年にKodadekらによって、オリゴN置換アラニン（オリゴNSA）が提唱されました⁴（図1右）。オリゴNSAは、擬似的1,3-アリル歪みの効果によって、主鎖二面角の回転が高度に抑制されています。そのため、特定の立体配座を安定に形成する剛直なペプチドであることが期待されます。しかしながら、その合成が困難であるために、NSA残基が連続したオリゴマーを合成することは困難でした。そのため、この分子が期待される通り剛直であるのか、また、タンパク質に高い結合親和性を示すか、という点については、研究が進んでおらず、明らかではありませんでした。このような中、2015年ごろから、私たちは、中分子創薬の1つのモダリティとしてこの分子に興味を惹かれ、その研究を開始しました。

2. オリゴN置換アラニンの合成

オリゴNSAの構造解析やタンパク質へのリガンド探索を促進するため、我々はまず、オリゴNSAの簡便かつ信頼性の高い固相合成法の確立に着手しました。2013年のKodadekらの報告では、NSA残基を含むペプチドの固相合成法が示されていますが、NSA残基の連続導入は3残基にとどまっておらず、また、合成されたペプチドの純度や収率は明らかではありませんでした⁴。そのため我々は、簡便にかつ信頼性高くオリゴNSAを合成できる固相合成法の確立に取り組みました。

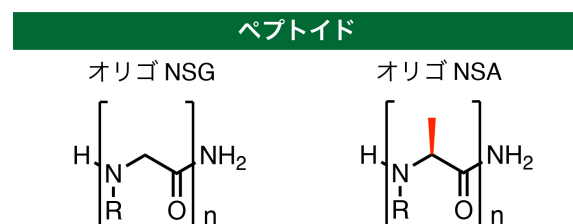


図1 ペプチドの構造式

我々は、2015年にKodadekらにより提案された合成スキームから出発して⁵、オリゴ NSA の固相合成法を確立しました。まず、嵩高い NSA 残基に対する Fmoc アラニンの縮合反応は、1-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) を用いることで、定量的に進行させられることを見出しました。その他、いくつかのテクニカルな問題を解決して確立した固相合成法（図2）により、5-mer までのオリゴ NSA をよい収率で単離することができるようになりました⁶。

3. オリゴ N 置換アラニンの構造解析

次に我々は、この分子が剛直であることを実証するために、構造解析に着手しました。まず、X 線結晶構造解析を試みたところ、N ベンジルアラニンのペンタマーから単結晶が得られ、オリゴ NSA が、主鎖全体

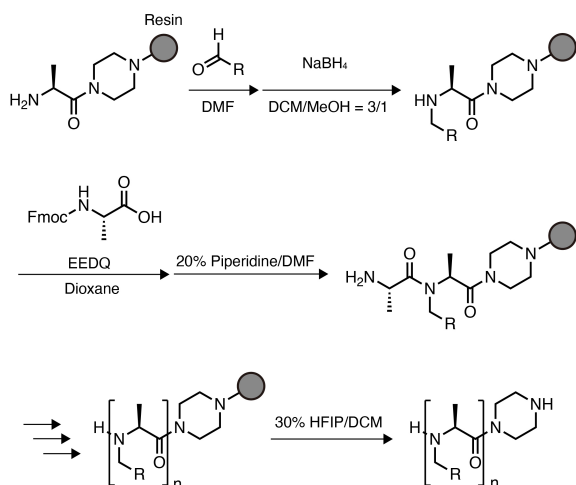


図2 オリゴ NSA の固相合成スキーム

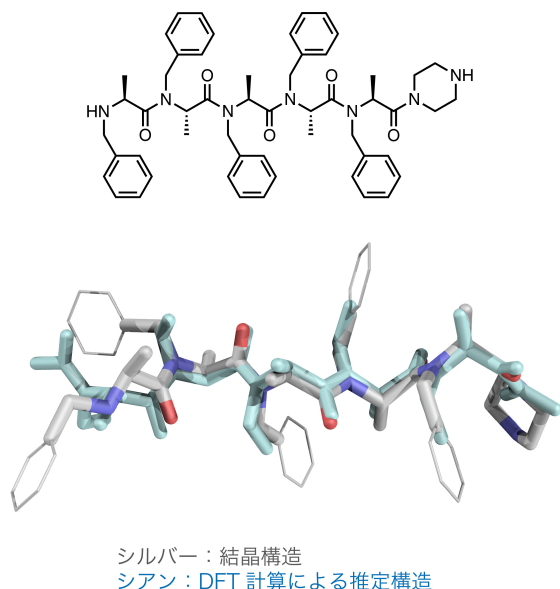


図3 N ベンジルアラニンペンタマーの構造式（上）、および、結晶構造と DFT 計算による推定構造の重ね合わせ（下）。Adapted with permission from reference 6. Copyright 2019 American Chemical Society.

として直線状に伸びたかたちをしていることがわかりました（図3）。この分子の結晶構造中での主鎖の立体配座は、density functional theory (DFT) 計算から推定されたものとよく一致しており、オリゴ NSA が計算で予測可能なかたちを形成する分子であることが示唆されました。さらに、我々は、この伸びた構造が、水溶液中でも安定に形成されるのかを調べるために、NMR による実験的な溶液中での構造解析、および、分子動力学シミュレーションに基づく構造解析を行いました。その結果、オリゴ NSA は水溶液中でも伸びた構造を安定に形成することが示唆されました。こうしたことから、オリゴ NSA は、期待されていた通り、剛直なペプチドであることが明らかとなりました⁶。

4. オリゴ N 置換アラニンのタンパク質リガンドとしての有用性

オリゴ NSA が、水中で特定の立体配座を安定に形成するペプチドであると明らかになってきたため、我々はこの新規ペプチドがタンパク質リガンドとして有用であるかを検証することとしました。オリゴ NSA の主鎖は、剛直であるため、3 次元空間の特定の位置に官能基を提示する足場と見なすことができます。そこで我々は、オリゴ NSA を足場として、タンパク質リガンドの合理的設計ができるのではないかと考え、その研究に着手しました。モデル標的タンパク質として、がん細胞で過剰発現することが知られる MDM2 を標的としたリガンド設計を行いました。MDM2 は、p53 をユビキチン化しタンパク質分解に誘導することで、アポトーシスを抑制することが知られています。MDM2 と p53 の相互作用界面に着目すると、p53 の Phe, Trp, Leu の3つの残基が MDM2 への結合に支配的な寄与をしています⁷。そこで我々は、オリゴ NSA を足場として、これら3つの側鎖の官能基を p53 と同様の距離・配向関係で提示する分子を設計し、MDM2 に結合するかどうかを検証することとしました（図4）。

設計したオリゴ NSA **1** の MDM2 への結合を、等温滴定型示差熱量計 (ITC) で測定したところ、 $K_d = 1.1 \mu\text{M}$ で結合することが確認されました。さらに、蛍光標識した p53 由来のペプチドをプローブとして、競合型蛍光偏光 (FP) 測定を行ったところ、

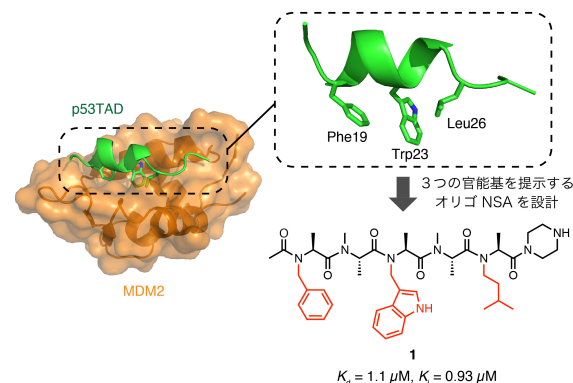


図4 MDM2 に結合するオリゴ NSA **1** の設計

オリゴ NSA **1** が p53 と競合的に MDM2 と結合することが明らかとなり、その阻害活性 K_i は $0.93 \mu\text{M}$ と算出され、ITC で測定した K_d 値とよく一致する結果となりました。さらに、オリゴ NSA の剛直性がタンパク質への結合に重要であることを検証するために、オリゴ NSA **1** の一部もしくは全ての残基をグリシン残基に置換した分子を合成し、これらについても競合型 FP 測定により、MDM2 への結合能を評価しました。その結果、主鎖のアラニン残基の割合が減少するほど、MDM2 への結合は弱くなり、オリゴ NSA の主鎖骨格の剛直性が、MDM2 への結合に重要であることが示唆されました⁶。

これらの結果から、オリゴ NSA が、タンパク質リガンドとして有用なペプチドであることが示されました。

5. オリゴ NSA を用いた細胞内タンパク質阻害剤創出への挑戦

本記事のはじめに述べたように、ペプチドは、当初、膜透過性の高い人工中分子として開発されました。そのため、我々は、オリゴ NSA が細胞内タンパク質間相互作用 (PPI) の阻害剤として働くであろうと期待しました。MDM2 リガンドとして設計したオリゴ NSA **1** を、MDM2 を過剰発現する SJSA-1 細胞に作用させたところ、期待に反して、細胞内の MDM2-p53 相互作用の阻害は確認されませんでした。細胞膜透過性を考慮して、C 末端のピペラジン構造を除去した誘導体 **2** について同様に評価しましたが、やはり、MDM2-p53 相互作用の阻害は確認されませんでした。

我々は、最初に設計した MDM2 リガンドの結合親和性や膜透過性が不十分であったのだと考え、これらを向上させるための構造最適化に取り組みました。まず、MDM2 との結合に関与する 1, 3, 5 残基目の官能基を最適化することで MDM2 との結合親和性を向上させ、続いて、MDM2 との結合に関与しない 2, 4

残基目の官能基を最適化することで膜透過性を向上させました。その結果、図 5 に示すオリゴ NSA **3** が、高い結合親和性と膜透過性を示す誘導体として見出されました。

こうして構造最適化したオリゴ NSA **3** を SJSA-1 細胞に作用させたところ、細胞内で MDM2-p53 の相互作用が阻害され、48 時間後には、細胞がアポトーシスへと誘導されました。以上の結果から、オリゴ NSA は、細胞内 PPI を阻害するモダリティとして有用であることが示されました⁸。

6. おわりに

本稿で示したとおり、オリゴ NSA は、剛直な主鎖骨格を有するペプチドであり、細胞内 PPI を阻害する分子として有望です。最近になって大環状化されたオリゴ NSG もタンパク質リガンドとして優れた性質を示すことが示され始めました^{9,10}。今後、こうしたペプチドを組み合わせて用いていくことで、様々な細胞内 PPI を標的とした阻害剤が創出されていくと期待されます。

本研究を進めるにあたっては、多数の素晴らしい共同研究者の皆様にお世話になりました。心より感謝申し上げます。また、研究室を主宰する山東信介教授との深いディスカッションは、本研究を進める上でなくてはならないものでした。この場を借りて改めて感謝申し上げます。最後に、研究に熱心に取り組んでくれた学生の皆様に深く感謝いたします。彼/彼女らの情熱と抜きん出た研究能力なくしては、ここまでの研究を成し遂げることはできませんでした。今後、日本ペプチド学会の方々とより一層切磋琢磨しながら、ペプチド関連の優れた研究を世界に発信していけるよう精進していく所存です。今後とも何卒よろしくお願い申し上げます。

参考文献

- Simon, R. J.; Kania, R. S.; Zuckermann, R. N.; Huebner, V. D.; Jewell, D. A.; Banville, S.; Ng, S.; Wang, L.; Rosenberg, S.; Marlowe, C. K.; Spellmeyer, D. C.; Tan, R.; Frankel, A. D.; Santi, D. V.; Cohen, F. E.; Bartlett, P. A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89, 9367-9371.
- Yu, P.; Liu, B.; Kodadek, T. *Nat Biotechnol* 2005, 23, 746-751.
- Zuckermann, R. N.; Martin, E. J.; Spellmeyer, D. C.; Stauber, G. B.; Shoemaker, K. R.; Kerr, J. M.; Figliozzi, G. M.; Goff, D. A.; Siani, M. A.; Simon, R. J.; Banville, S. C.; Brown, E. G.; Wang, L.; Richter, L. S.; Moos, W. H. *J Med Chem* 1994, 37, 2678-2685.
- Gao, Y.; Kodadek, T. *Chem Biol* 2013, 20, 360-369.
- Pels, K.; Kodadek, T. *ACS Comb Sci* 2015, 17, 152-155.
- Morimoto, J.; Fukuda, Y.; Kuroda, D.; Watan-

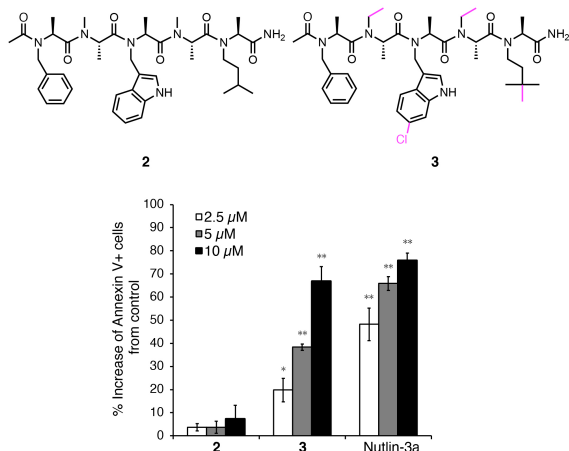


図 5 オリゴ NSA **2**, **3** の化学構造 (上) と Annexin V を用いた細胞アポトーシス誘導の評価結果 (下)。Nutlin-3a は既知の MDM2-p53 相互作用阻害剤であり、ポジティブコントロールとして用いた。Adapted from reference 8 with permission from the Royal Society of Chemistry.

- abe, T.; Yoshida, F.; Asada, M.; Nakamura, T.; Senoo, A.; Nagatoishi, S.; Tsumoto, K.; Sando, S. *J Am Chem Soc* 2019, 141, 14612–14623.
7. Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. *P. Science* 1996, 274, 948–953.
 8. Fukuda, Y.; Yokomine, M.; Kuroda, D.; Tsumoto, K.; Morimoto, J.; Sando, S. *Chem Sci* 2021, 12, 13292–13300.
 9. Oh, M.; Lee, J. H.; Moon, H.; Hyun, Y. J.; Lim, H. S. *Angew Chem Int Ed* 2016, 55, 602–606.
 10. Schneider, J. A.; Craven, T. W.; Kasper, A. C.; Yun, C.; Haugbro, M.; Briggs, E. M.; Svetlov, V.; Nudler, E.; Knaut, H.; Bonneau, R.; Garabedian, M. J.; Kirshenbaum, K.; Logan, S. K. *Nat Commun* 2018, 9, 4396.

もりもと じゅんぺい
 東京大学 大学院工学系研究科
 化学生命工学専攻
 jmorimoto@chembio.t.u-tokyo.ac.jp

令和三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栄誉ある賞を頂き、誠に光栄に存じます。学会長の野水基義先生をはじめ、副会長の三原久和先生および理事、監事、評議員、また選考委員の先生方に本紙を借りて心より感謝申し上げます。前号においてヘリカルテンプレートの開発とその応用に関する内容が掲載されており、連続で寄稿できること光栄に存じます。本稿では、受賞研究である「次世代型中分子ペプチド医薬品創出に向けた基盤技術の開発」について概説させていただきます。



三澤 隆史

はじめに

筆者は東京大学大学院薬学系研究科の橋本祐一先生の指導のもと、変異型タンパク質の構造を修正する小分子リガンドの開発に取り組み学位を取得しました。橋本先生の研究室では、新規生理活性物質の創出に向けた創薬マルチテンプレート手法が提案されております。本手法では、一つの基本骨格をテンプレートとして構造修飾を行うことで、様々な生理活性へと活性を付与できる方法です。本研究は現在行うヘリカルペプチドをテンプレートとした生理活性ペプチドの開発研究に繋がったと考えています。学位取得後、米国ウィスコンシン大学マディソン校化学科に博士研究員として留学を経験しました。留学先では、 β -アミノ酸を利用したフォルダマー研究を行っている Samuel H. Gellman 先生¹の下で、ペプチド研究をご教授いた

きました。留学先では、現在の上司である出水庸介先生とも同ラボに在籍しており、一年という短い留学ではありましたが私の研究人生において大きな変化をもたらした期間となりました。

その後、東京大学分子細胞生物学研究所の橋本先生の下で1年間助教を務め、国立医薬品食品衛生研究所にて研究を行う機会をいただきました。本研究所においてこれまでに、ヘリカル構造制御に基づく生理活性ペプチドの開発研究として、抗菌ペプチドや細胞膜透過性ペプチド、および多様な生理活性を付与可能なヘリカルテンプレートペプチドの開発研究を行いました。

1. 抗菌ペプチド (Antimicrobial peptides: AMPs)

抗菌ペプチドは、宿主細胞の防御因子として機能し、自然免疫および獲得免疫応答の両方に寄与しています¹。近年、抗菌ペプチドの幅広い抗菌スペクトルが着目され、多剤耐性菌を含む微生物感染症に対する新たな治療薬として期待されています。代表的な抗菌ペプチドとしてディフェンシンやマガイニン2などが知られており、それぞれ β シートや α ヘリックスなどの規則正しい二次構造を形成しています²。また、カチオン性アミノ酸と疎水性アミノ酸が適切に分布させることにより両親媒性特性を示し、細菌の細胞膜に直接作用することで抗菌活性を示します³。そのため、従来の抗生物質とは異なり薬剤耐性菌の生じる可能性が低いと考えられています⁴。抗菌ペプチドの広範囲な抗菌スペクトルを活かし、抗菌活性を高めることができれば、多剤耐性菌を含めた微生物感染症に対する有効な治療法につながると考えました。

当研究室ではこれまでに、ヘリカル構造に基づく新規 AMPs の開発研究を行ってきました⁵⁻⁸。その中で、抗菌活性に重要であると考えられている両親媒性ペプチドとして、疎水性アミノ酸である Leu およびカチオン性アミノ酸である Lys を空間的に分けて配置したペプチド **Stripe** をデザインしました。合成したペプチドについてその抗菌活性を評価したところ、**Stripe** ペプチドはグラム陽性菌・グラム陰性菌に対し高い抗菌活性を示すことを明らかにしました。次に、抗菌ペプチドは細菌膜を標的とすることから、ヒトの細胞膜にも作用することで細胞毒性の可能性が懸念されます⁹。そこで、**Stripe** ペプチドを用いてヒト赤血球に対する溶血性試験を行いました。その結果、**Stripe** ペプチドは溶血性を示さないことが明らかになり、優れた抗菌ペプチドとして機能することを見出しました。一方で、当研究室ではこれまでに、短鎖ペプチドに対し α, α -ジ置換アミノ酸 (α, α -disubstituted amino acids: dAAs) を導入することで、ヘリカル構造を安定化可能であること、生理機能の向上および分解酵素耐性に寄与することを見出しています。これらの知見を活かし、**Stripe** ペプチドに対し、dAAs や側鎖架橋構造を導入したペプチドを合成することでより抗菌活性を向上させた抗菌ペプチドの開発を目指しました。まず、**Stripe** ペプチドの Ala 残基を Gly や dAAs、側鎖架橋構造を導入したペプチド **1-5** を合成した。その後、各種菌に対する抗菌活性評価を

行った結果, Gly を導入したペプチドは抗菌活性が減弱すること, dAAs や側鎖架橋構造を導入したペプチドは **Stripe** ペプチドよりも高い抗菌活性を示すことが明らかになりました。一方, ヒト赤血球に対する溶血性を評価したところ, 側鎖架橋構造の導入により溶血性を高めることが明らかになり, 高すぎる疎水性は溶血性につながることを示しました。以上の結果, **stripe** ペプチドに代表的な dAAs である aib (2-aminoisobutyric acid) を導入した **2** は溶血性を示すことなく多剤耐性菌に対して抗菌活性を示すことを明らかにしました^{5,7} (図 1)。

2. ヘリカルテンプレート配列の開発

当研究室では, Aib とロイシンからなる短鎖ペプチド H-(L-Leu-L-Leu-Aib)_n-NH₂ (**6**) が安定なヘリカル構造を形成することを報告しています¹⁰。そこで, この安定なヘリカル構造を活かし, ヘリカル構造上に後から適切な官能基を付与することができれば, 効率的に生理活性ペプチドを見出すことができると考えました。側鎖にアジド基を有するアジドリシン (Azl; Azidelysine) を導入した H-(L-Azl-L-Azl-Aib)₃-NH₂

(**7**) は水溶液中で安定なヘリカル構造を形成することを明らかにしました。そこで, ペプチド **7** に対し, クリック反応を行うことで多様な官能基の導入に成功しました¹¹。また, 同様の手法により, 抗菌ペプチドの効率的な構造活性相関解析研究にも応用可能であることを示し, 一つのテンプレートから多様な性質を示すペプチドへ展開可能であることが明らかになりました。上記研究の詳細につきましては第 122 号ペプチドニュースレター (5~9 ページ) をご参照ください。

3. ヘリカルプロモーター配列の開発の細胞膜透過性ペプチドへの応用

細胞膜透過性ペプチド (CPPs) は核酸やタンパク質などの水溶性カーゴ分子細胞内に導入するデリバリーツールとして注目を集めています。これまでに, CPP に多く含まれるカチオン性アミノ酸は細胞表面の酸性官能基と相互作用することで細胞膜透過性を発揮することが明らかになっています¹²。CPPs の側鎖の重要性が明らかになる一方で, CPPs の細胞膜透過性における二次構造の影響については不明な点が残されています。そこで, 当研究室では膜透過性ペプチドの二次構造と細胞膜透過性との相関に着目し, ヘリカ

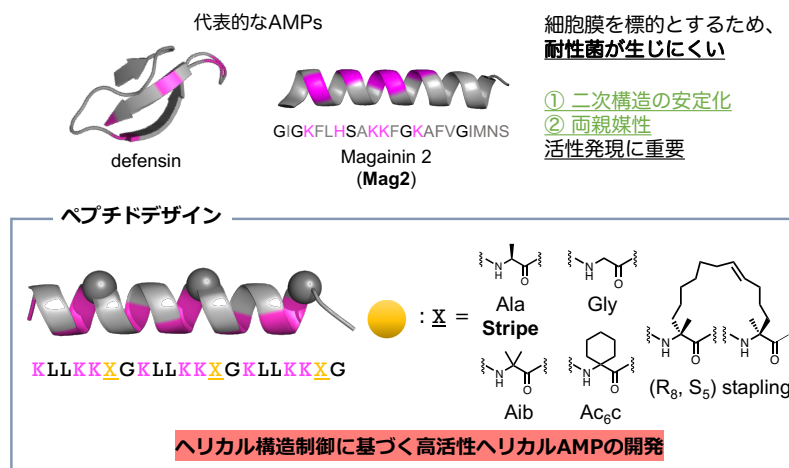


図 1 合理的な設計に基づく新規抗菌ペプチドの開発

Peptide	Sequence	MIC (μM) ^{a)}				Hemolysis (μM) ^{b)}
		Gram (+)	Gram (-)			
		<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	MDRP	
Stripe	KLLKKAGKLLKKAGKLLKKAG	12.5	3.125	3.125	3.125	>100
1	KLLKKGKLLKKGKLLKKGG	>50	12.5	>50	>50	>100
2	KLLKKXGKLLKKXGKLLKKXG	3.125	1.56	1.56	1.56	>100
3	KLLKKZGKLLKKZGKLLKKZG	6.25	3.125	6.25	12.5	1.56
4	KLLKKAGKLLKK ^{R₆} GKLLKK ^{S₅} G	25	6.25	50	25	0.78
5	KLLKK ^{R₆} GKLLKK ^{S₅} GKLLKKAG	25	6.25	12.5	25	1.56

a) 37°C incubation for 16 hr. MIC: Minimum inhibitory concentration.

S.a.: *Staphylococcus aureus* NBRC13276

E.c.: *Escherichia coli* DH5α, P.a.: *Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275

MDRP: Multi-drug resistant *P. aeruginosa* (ATCC BAA-2111)

b) 37°C incubation for 30 min. Measuring absorption of leaked hemoglobin at 535 nm.

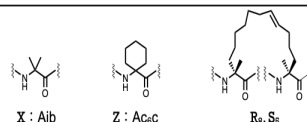


表 1 抗菌活性および溶血性評価

ル構造の形成が細胞膜透過性に有利に働くことを見出しました¹³。

本研究では安定なヘリカル構造を形成するペプチド **6** を利用し代表的な細胞膜透過性ペプチドであるオリゴアルギニンに連結することで、ヘリカル構造の安定化ならびに高い細胞膜透過性を示すと考えました(図 2)。代表的な CPP であるノナルギニン (R9) に対し、ヘリカルプロモータ配列を連結した **Block3** ペプチドを合成し、その二次構造およびキャリア分子としての機能を評価しました。その結果、合成した **Block3** は水溶液中で安定なヘリカル構造を形成すること、細胞内に siRNA を効率的に導入可能であることを見出しました¹⁴。上記研究の詳細につきましては第 122 号ペプチドニュースレター (5~9 ページ) をご参照ください。

本研究では、安定なヘリカルプロモータ配列を連結することで、目的ペプチド配列中に修飾を加えることなくヘリカル構造を誘導可能になります。ヘリカルプロモータ配列を利用することで、新たな生理活性ペプチドの開発につながることを期待しています。

4. ペプチド医薬品の品質評価に資する研究

近年、中分子ペプチド医薬品が新たな創薬モダリティとして注目を集めています。高い特異性や広い標的分子、化学合成可能であることから、今後ペプチドを基盤とした多くの医薬品候補の創出が期待されています。一方で、中分子ペプチド医薬品の製造・品質・安全性に関する具体的な要件・評価法が定められていないことが課題となっています。私はペプチド医薬品の新たな品質評価系の構築を目的として、NMR フィンガープリント法に取り組んでいます。

おわりに

以上、これまでに行ってきたペプチドテンプレートの開発とその生理活性ペプチドへの応用研究を概説しました。現在、タンパク質間相互作用阻害剤やドラッグデリバリー、抗菌ペプチドなど多様な生理活性ペプチドの開発に資する研究を行っております。規則的な二次構造を形成する分子はフォルダマーと呼ばれ材料や生理活性分子の開発に広く利用されています。今後もペプチドの二次構造制御に向けたビルディングブロックの合成や構造解析およびその生理活性ペプチドの開発を目指したいと考えております。最後になりましたが、当該研究は、国立医薬品食品衛生研究所有機化学部で行われたものであり、研究に多大なご協力を賜りました出水庸介部長(国立衛研 有機化学部)、諫田康成部長(国立衛研 薬理部)、大岡伸通先生(国立衛研 遺伝子医薬部)、田中正一教授(長崎大学)、大庭誠教授(京都府立医大)に厚く御礼申し上げます。また、日々の研究室生活において議論を重ねた研究室メンバーに心から感謝申し上げます。今回の奨励賞を励みに、より一層ペプチド医薬品の開発に向けた基盤技術開発に邁進する所存です。今後ともご指導ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

参考文献

1. Hancock, R.E.W.; Sahl H.-G. Nat Biotechnol 2006, 24, 1551-1557.
2. Vilas Boas L.C.P.; Campos M.L.; Berlanda R.L.A.; de Carvalho Neves N.; Franco O.L. Cell Mol Life Sci 2019, 76, 3525-3542.
3. Matsuzaki, K. YAKUGAKU ZASSI 1997, 117, 253-264.
4. Ageitos, J. M.; Sanchez-Perez, A.; Calo-Meta, P.; Villa, T. G. Biochem Pharmacol 2017, 133,

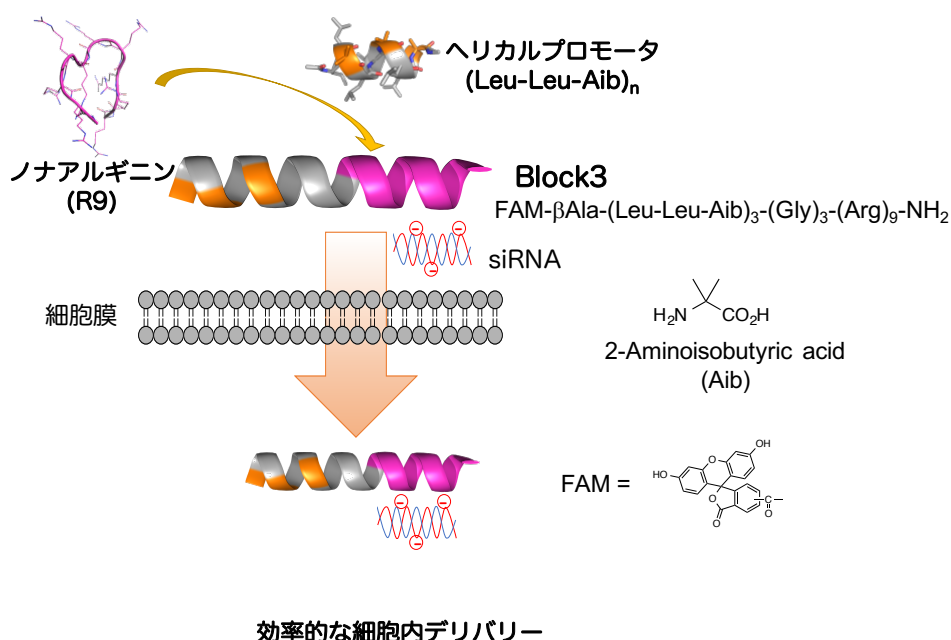


図 2 ヘリカルプロモータ配列の連結によるヘリカル構造の安定

- 117-138.
- Misawa, T.; Goto, C.; Shibata, N.; Hirano, M.; Kikuchi, Y.; Naito, M.; Demizu, Y. *MedChemComm* 2019, 10, 896-900.
 - Goto, C.; Hirano, M.; Hayashi, K.; Kikuchi, Y.; Hara-Kudo, U.; Misawa, T.; Demizu, Y. *ChemMedChem* 2019, 20, 1911-1916.
 - Hirano, M.; Saito, C.; Goto, C.; Yokoo, H.; Kawano, R.; Misawa, T.; Demizu, Y. *ChemPlusChem* 2020, 85, 2731-2736.
 - Hirano, M.; Saito, C.; Yokoo, H.; Goto, C.; Kawano, R.; Misawa, T.; Demizu, Y. *Molecules* 2021, 26, 444.
 - Matsuzaki, K. *Biochim Biophys Acta* 2009, 178, 1687-1692.
 - Demizu, Y.; Doi, M.; Kurihara, M.; Maruyama, T.; Suemune, H.; Tanaka, M. *Chem – Eur J* 2012, 18, 2430-2439.
 - Misawa, T.; Kanda, Y.; Demizu, Y. *Bioconj Chem* 2017, 28, 3029-3035.
 - Suzuki, T.; Futaki, S.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J Biol Chem* 2002, 277, 2437-2443.
 - Yamashita, H.; Misawa, T.; Oba, M.; Tanaka, M.; Naito, M.; Kurihara, M.; Demizu, Y. *Bioorg Med Chem* 2017, 25, 1846-1851.
 - Misawa, T.; Ohoka, N.; Oba, M.; Yamashita, H.; Tanaka, M.; Naito, M.; Demizu, Y. *Chem Commun* 2019, 55, 7792-7795.

みさわ たかし
 国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部
 misawa@nihs.go.jp
<https://www.nihs.go.jp/doc/index.html>

Excellent Poster Presentation Award を受賞して

はじめに

この度、2021 年 10 月 20 日～22 日にオンラインで開催された第 58 回ペプチド討論会に参加し、“Synthesis and Structural Characterization of β -turn Mimics Containing (Z)-Chloroalkene Dipeptide Isosteres”という演題でポスター発表を行い、大変光栄なことに Excellent Poster Presentation Award という非常に名誉ある賞を頂戴しました。本学会会長の野水基義先生をはじめとして、オーガナイザーの林良雄先生を中心とする本討論会の実行委員の方々、ポスター発表の際の熱いディスカッションにお付き合い下さった全ての方々に、本紙面を借りて心より御礼を申し上げます。今回



児玉 有輝

受賞対象となりました研究内容について、僭越ながらご紹介させていただきます。

研究概要

生体内のペプチド／タンパク質中に存在する最も一般的なターンモチーフ： β ターン構造は、タンパク質の高次構造の形成・安定化に重要であり、分子認識や生物活性発現にも深く関与することから、 β ターン構造を模倣したペプチドミメティック (β ターンミミック) の創製研究が 1980 年代から盛んに進められてきました。二重結合性を有するペプチド結合の C-N 結合を C=C 結合へと置換したアルケン型ペプチド結合等価体¹を用いた分子変換技術もその一つです。なかでも (E)-メチルアルケン骨格や (Z)-トリフルオロメチルアルケン骨格を導入したペプチドミメティックは、 β ターン構造を形成することが Wipf らによって報告されており² (図 1A)、1,3-アリル歪みに起因する立体効果により、 β ターン構造が安定化されと考えられてきました (図 1B)。

所属研究室では、 β ターンミミックを用いた創薬研究の一環として、自由度の高い Gly-Gly 配列に (E)-メチルアルケン骨格および (Z)-クロロアルケン骨格を導入した RGG ペプチドミメティックを合成し、円偏光二色性スペクトル解析によって構造を解析しました³。カルボニル酸素原子に対応するメチル基と塩素原子は同様な嵩高さ⁴であることから、2 種のペプチドミメティックは同様にターン構造を形成することが考えられますが、(E)-メチルアルケン型ペプチドミメティックがランダム構造、(Z)-クロロアルケン型ペプチドミメティックは β ターン構造を形成することが明らかになりました。このような顕著な違いが現れた要因として、筆者らはこれまで説明されてきた立体効果だけではなく、クロロアルケン型ペプチド結合等価体がもたらす立体電子効果が β ターン構造安定化の重要な鍵を握っていると考えました。しかしながら、これまでにアルケン型ペプチド結合等価体を導入した β ターンミミックの立体電子効果に関する報告例はありません。そこで本研究では、クロロアルケン型ペプチドミメティックの β ターン構造のミミック効果を明らかにするとともに、 β ターン構造の安定化に寄与する立体電子効果について解析することとしました (図 1C)。

はじめに L-Ala-D-Ala 配列を有するクロロアルケンジペプチドイソスター (CADI) の合成に着手しました。(S)-tert-ブチルスルフィニアミド **1** を出発原料として、5 工程でアジリジン環を有する α,β -不飽和エステル **2** へと誘導し、有機銅試薬を用いた 1,3-不斉転写によるジアステレオ選択的アリル位アルキル化反応によって所望の L-Ala-D-Ala 型 CADI **3** を合成しました (図 2A)。その後、ワンポットで N-スルホニル基を N-Boc 基へと変換したのち、C 末端側エチルエステルを水酸化リチウム水溶液にて加水分解し、メチルアミンと縮合することで、所望のクロロアルケン型ペプチドミメティック **4** (Boc-L-Ala- Ψ^{Cl} -D-Ala-NHMe) へと誘導しました。得られたペプチドミメティック **4** の溶液中における立体配座を精査するために、重クロロホルムおよび重 DMSO 中に溶解させ、核オーバー

ハウザー効果 (NOE) 分光法を用いた解析を行いました (図 2B)。いずれの溶媒においても L-Ala のカーバメート水素と L-Ala のメチル基, L-Ala の不斉炭素上

の水素とクロロアルケン骨格のビニル水素, D-Ala の不斉炭素上の水素と C 末端メチルアミンに由来するアミド水素の 3 点に NOE の相関が観測され, これら

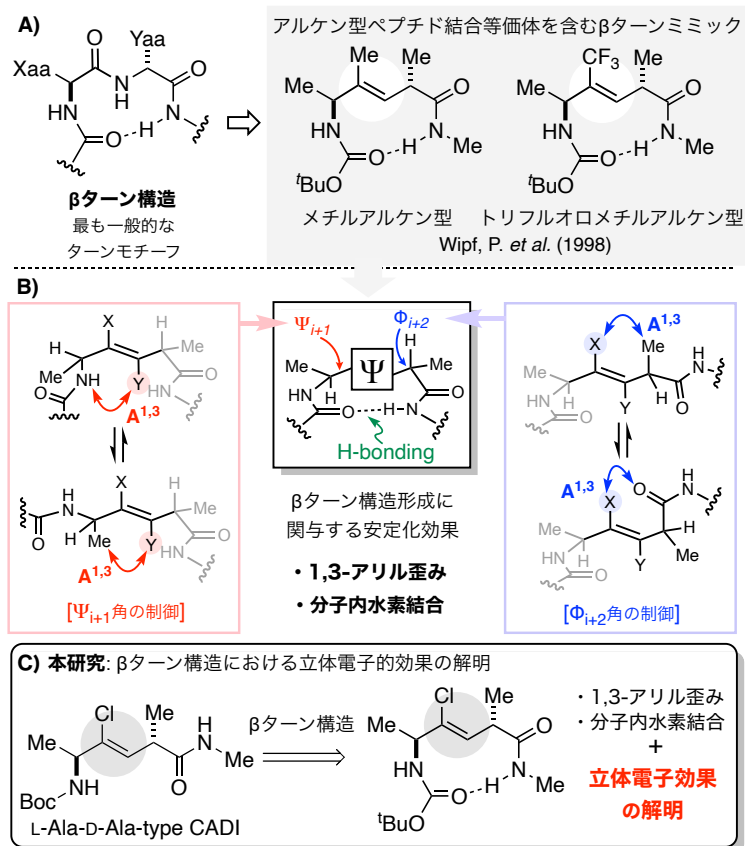
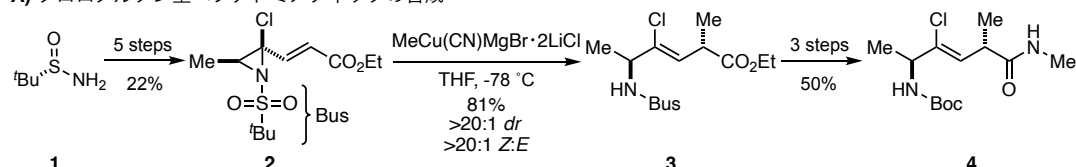
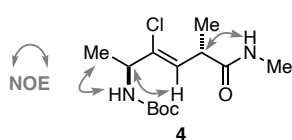


図 1 アルケン型ペプチド結合等価体含むβターンミミック (A) とβターン構造形成に寄与する立体効果 (B) および本研究コンセプト (C)

A) クロロアルケン型ペプチドミメティックの合成



B) 各プロトン間のNOE解析



C) $^1\text{H-NMR}$ およびFT-IRを用いた水素結合形成の精査

entry	$\delta_{\text{DMSO}-d_6}-\delta_{\text{CDCl}_3}$ (p.p.m)		$ \Delta\delta/\Delta T $ (ppb/K)		N-H stretching (cm^{-1})	
	L-Ala-NH	Amine-NH	L-Ala-NH	Amine-NH	L-Ala-NH	Amine-NH
4	2.56	1.07	6.91	4.97	3448	3358
	Smaller chemical shift		Smaller chemical shift		Red-shifted	

D) 自然結合軌道解析を用いた立体電子効果の精査

compound	Interaction energy (kcal/mol)	
	$\sigma_{(\text{C-H})} \rightarrow \sigma_{(\text{C-X})}^*$	$n_{\text{P}(\text{X})} \rightarrow \sigma_{(\text{C-H})}^*$
Boc-L-Ala- $\psi[(\text{Z})\text{CCl}=\text{CH}]$ -D-Ala-NMe (4) ^b	7.49	0.44
Ac-L-Ala- $\psi[(\text{Z})\text{CCl}=\text{CH}]$ -D-Ala-NMe (5) ^c	7.69	0.40
Ac-L-Ala- $\psi[(\text{E})\text{CMe}=\text{CH}]$ -D-Ala-NMe (6) ^c	4.55	-
Ac-L-Ala- $\psi[(\text{Z})\text{CF}=\text{CH}]$ -D-Ala-NMe (7) ^c	6.65	0.09

^a X = carbonyl oxygen equivalent (Cl, Me, F). ^b Based on X-ray crystal structure. ^c Computed in the optimized geometry.

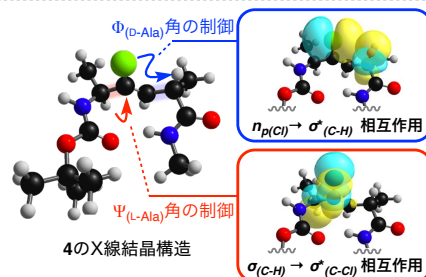


図 2 クロロアルケン型ペプチドミメティックの合成 (A) および $^1\text{H-NMR}$ と FT-IR を用いた分光学的解析 (B-C), 自然結合軌道解析を用いた相互作用解析 (D)

はいずれも、 β ターン構造に見られる特徴的な NOE 相関と一致しました。

続いて β ターン構造において重要な分子内水素結合の形成を精査するために、分光学的手法を用いて解析しました (図 2C)。はじめに、 ^1H NMR におけるアミド水素の化学シフトの違いから、水素結合の形成を評価可能な実験系を用いて解析を行いました。重クロロホルム中および重 DMSO 中で測定したペプチドミメティック **4** の ^1H NMR の化学シフトの値を解析した結果、アミン由来のアミド水素が、L-Ala アミド水素と比較して約 1.5 ppm 小さい値を示しました。加えて、温度可変 NMR 解析から算出した $|\Delta\sigma/\Delta T|$ の値も同様に、アミン由来のアミド水素が、L-Ala アミド水素と比較して約 2.0 ppb/K 小さい値を示しました。これらの結果から、分子内水素結合形成による N-H 基の保護効果が確認されました。また、フーリエ変換型赤外分光 (FT-IR) を用いた解析においても、アミン由来の N-H 伸縮が、L-Ala の N-H 伸縮より約 90 cm^{-1} 高周波数側にシフトしていたことから、アミン由来の N-H が水素結合形成に関与することが示唆されました。これら ^1H - ^1H NOESY および ^1H NMR, FT-IR を用いた解析の結果から、L-Ala-D-Ala 型 CADI を含むペプチドミメティック **4** は、溶液中において、 β ターン構造を形成することが明らかとなりました。

^1H NMR を用いた解析に着手した当初は、基質同士の分子間水素結合形成によるピークシフトへの影響をケアするために、低濃度のサンプルを調製し、測定を行なっていましたが、再現性が得られないことが多々ありました。参考文献の実験項通りにサンプルを調製し、測定を行なっても再現性が得られず、NMR チャートを眺めていましたが、そこでやっと重溶媒中に含まれる H_2O の影響であることに気づきました。特に夏場は湿度が高く、重 DMSO などの溶媒中には特に多くの H_2O が溶け込んでしまいます。そこで、モレキュラーシーブなどの乾燥剤を用いて、脱水することで、再現性のある測定結果を得ることができました。この脱水操作は、 ^1H NMR のチャートにして 0.5 ppm にも満たない違いになりますが、再現性を得るためには非常に重要な実験操作の一つであることが明らかになりました。

続いて、X 線結晶構造解析を行なった結果、ペプチドミメティック **4** は結晶中においても β ターン構造を形成することが明らかになりました。得られた結晶構造を元に、量子化学計算を用いて水素原子の位置を最適化し、自然結合軌道解析 (Natural Bond Orbital Analysis) によって β ターン構造形成に寄与する相互作用を解析しました (図 2D)。その結果、 $\sigma_{(\text{C-H})} \rightarrow \sigma^*_{(\text{C-Cl})}$ 相互作用が 7.49 kcal/mol, $n_{p(\text{Cl})} \rightarrow \sigma^*_{(\text{C-H})}$ 相互作用が 0.44 kcal/mol と算出され、それぞれ $\Psi_{(\text{L-Ala})}$ 角および $\Phi_{(\text{D-Ala})}$ 角の制御に寄与することで、 β ターン構造を安定化していることを見出しました。また、メチルアルケン型ペプチドミメティック **6** (Ac-L-Ala- Ψ^{Me} -D-Ala-NHMe) やフルオロアルケン型ペプチドミメティック **7** (Ac-L-Ala- Ψ^{F} -D-Ala-NHMe) について同様に NBO 解析を行いました。その結果、 $\sigma_{(\text{C-H})} \rightarrow \sigma^*_{(\text{C-X})}$ 相互作用

において、クロロアルケン型ペプチドミメティック **4** がメチルアルケン型ペプチドミメティック **6** よりも約 3 kcal/mol 大きな値を示し、同じハロゲン原子を有するフルオロアルケン型ペプチドミメティック **7** と比較しても約 1 kcal/mol 大きな値を示すことが明らかとなりました。加えて、 $n_{p(\text{X})} \rightarrow \sigma^*_{(\text{C-H})}$ 相互作用においても、クロロアルケン型ペプチドミメティック **4** がフルオロアルケン型ペプチドミメティック **7** と比較して約 0.3 kcal/mol 大きな値を示すことが明らかとなりました。研究内容に関する質疑応答において、「フルオロアルケンと比較するとどうなの?」とご質問をいただく機会が多くありますが、フッ素原子のファンデルワールス半径⁵ (1.47 Å) と塩素原子のファンデルワールス半径 (1.75 Å) の違いから、フッ素原子ではハロゲン原子に由来する立体電子効果が塩素原子に比べ小さくなり、この立体電子効果の違いがペプチドの構造や機能に影響すると考察しています。本研究によって得られた知見は、アルケン型ペプチド結合等価体を含む β ターンミミックの立体電子効果の詳細を明らかにした初めての研究例です。今後は、タンパク質レベルでの応用を目指し、引き続き後進と研究を進めていく予定です。

おわりに

本研究は、静岡大学・鳴海哲夫先生の (アツい熱い厚い) ご指導のもと、取り組んで参りました。この場を借りて深く感謝申し上げます。学会に参加すると決まって「鳴海先生って...どう?」と聞かれますが、「見た目通りですよ」と、最近ますます謙虚さが溢れ出ている先生の見た目で判断していただくことしかできず、あまりいい回答は見つかっていません (これは発表の質疑応答よりも難しい質問です)。鳴海先生の研究への探究心、情熱、愛に関しては、ただただ頭が下がりますが、私も負けじとそんな先生を研究成果であっと言わせたい一心で日々研究に邁進しております。そんな鳴海先生のご好意で、学部 4 年生の頃にペプチド学会の門を叩いてから、若手の会も含めて、気づけばほぼ毎年ペプチド学会にはお世話になっています。修士 1 年の頃に参加した、長崎開催の若手の会で、某大学の博士 3 年の方が仰っていた「修士なんて (研究に関しては) ニワカだ～」という言葉に触発されたことに加え、同年の第 54 回ペプチド討論会にて東京医科歯科大学・玉村啓和先生に「ドクター行ったらええがな～」と後押しをしていただいたことが進学を決意した一つのきっかけでした。「鳴海先生って...」の質問のあとには、必ず「博士進学はどうですか?」と聞かれますが、だいたいは適当にはぐらかします。自分の意志でアクセルを踏めないのであれば、後々進学しても道は拓かれないと思うからです。少なくとも著者は、修士では味わえないような大変貴重な経験をさせていただきました (という後進に対する密かなメッセージをこめておきます)。著者の貴重な経験に携わっていただいた先生方や大学問わず仲良くしてくださる卒業生、学生皆様に改めて感謝するとともに、昨今の情勢が好転し、再び皆様と直接お会いできることを心待ちにしております。今後とも、パワフルな後

進共々、ご指導ご鞭撻のほど、よろしくお願いいたします。

参考文献

1. Wipf, P.; Xiao, J. *Chimia* 2009, 63, 764–775.
2. Wipf, P.; Henninger, T. C.; Geib, S. J. *J Org Chem* 1998, 63, 6088–6089.
3. Okita, H.; Kato, Y.; Masuzawa, T.; Arai, K.; Takeo, S.; Sato, K.; Mase, N.; Oyoshi, T.; Narumi, T. *RSC Adv* 2020, 10, 29373–29377.
4. Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D. *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*; American Chemical Society: Washington, DC, 1995.
5. Bondi, A. *J Phys Chem* 1964, 68, 441–451.

こだま ゆうき
静岡大学 創造科学技術大学院
自然科学系教育部 光・ナノ物質機能専攻
鳴海研究室
kodama.yuki.17@shizuoka.ac.jp
<https://www.shizuoka.ac.jp/tenarumi/>

第 58 回ペプチド討論会 ポスター発表優秀賞を受賞して

私は、この度、2021 年 10 月 20 日から 22 日にわたりオンラインで開催された第 58 回ペプチド討論会において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発表優秀賞を受賞しました。この場をお借りして、第 58 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、心より御礼申し上げます。本稿では、私のポスター発表の内容（演題：Synthesis of biotin labeled probes of PF1171B, a cyclic peptide with inhibitory activity against apolipoprotein B production）について、私が所属している三重大学や研究室のお話も交えて、紹介させていただきます。

三重県津市にある三重大学は、伊勢湾に面した広大なキャンパスを有し、人文学部、教育学部、医学部、工学部、生物資源学部の 5 つの学部とそれぞれの研究科に加え、2009 年に新設された地域イノベーション学研究科で構成されています。私が所属する生物資源学研究科は 1987 年に誕生しましたが、1921 年に設立された三重高等農林学校を前身としており、100 周年を迎える伝統があります。生物資源学研究科では、「山の頂から海の底まで」を広範に研究対象としており、動植物の生命現象の解明や地球環境の調査など、人類が生活する上で欠かせない生物資源の生産や利用、それを育む環境に関する研究を行っています。



織田 大河

私の研究室では、環状ペプチドの三次元構造と活性に着目した創薬研究を展開しています。環状ペプチドの中には、環状構造によって立体配座が固定されることで、複雑な三次元構造を形成して、標的親和性が高いものがあります。また、環境に応じて柔軟に三次元構造を変化させることで、優れた細胞膜透過性を示すものもあります。私は、そのような創薬シードとなり得る、環状ペプチド PF1171B（図 1）の研究を行っています。PF1171B は、子囊菌 *Hamigera* 属から生産され、アントラニル酸 (Ant)、L-Pro、D-MePhe が連続した特異な構造を有しています。PF1171B は、ヒト肝癌由来細胞株 Hep G2 においてアポリポタンパク質 B (apoB) の産生を抑制することが報告されています¹。apoB は各末梢組織へ脂質を供給する LDL (low density lipoprotein) の主要な構成タンパク質であることから、apoB の産生抑制は悪玉と呼ばれる LDL コレステロール値の低減に繋がる可能性があります。私の研究室では、PF1171B のユニークな構造と活性に興味をもち、PF1171B の全合成を行い²、さらに PF1171B の類縁体を合成して、その構造活性相関を調べました。しかし、PF1171B の標的分子が不明であるため、その活性発現機構も不明です。本研究では、PF1171B の標的分子同定のために、アフィニティタグとしてビオチンを導入した分子プローブを合成し、標的分子のプルダウン実験を行いました。

私の研究室でこれまでに行われた構造活性相関研究から、Ant の側鎖改変は活性を大きく低下させることが判明していたため、Ant 以外のアミノ酸側鎖にアジド基を導入した 4 種類のアジド標識プローブを設計しました。これらのアジド標識プローブと、ビオチンなどのアフィニティタグを有するアルキルユニットをクリック反応で連結することにより、多様なアフィニティプローブを迅速に合成する計画です。側鎖にアジド基を持つアミノ酸を含むペプチド鎖を固相法で伸長した後、液相でマクロラクタム化を行うことで、アジド標識プローブを合成しました。合成したアジド標識プローブの存在下で Hep G2 細胞を培養し、細胞液上清の apoB 量を ELISA 法によって定量しました。その結果、L-Pro を L-MeLys(N₃) に改変したプローブ 1 と L-Leu を L-Lys(N₃) に改変したプローブ 2 が、apoB 産生量を強く抑制しました（図 2A）。そこで、1, 2 に対してスパーサーがアルキル鎖のビオチン-アルキルユニット 3、あるいは PEG 鎖のビオチン-アルキルユニット 4 をクリック反応で連結させ、ビオチン標識プローブ 5–8 を合成しました。合成したビオチン標識プローブの apoB 産生抑制活性を評価したところ、6–8 が比較的強い活性を示しました（図 2A）。

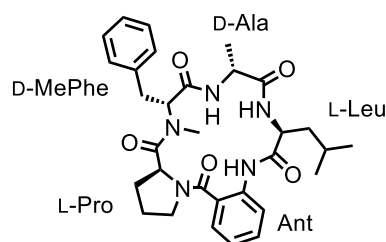


図 1 PF1171B の化学構造

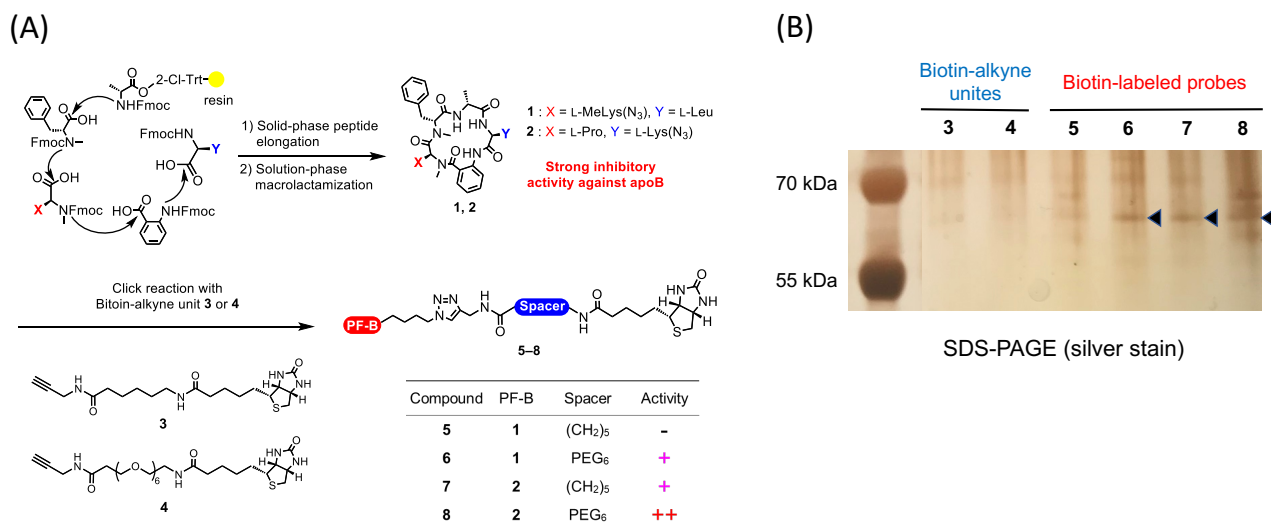


図2 (A) アジド標識プローブ **1**, **2** とビオチン標識プローブ **5-8** の合成と各プローブの apoB 産生抑制活性, (B) ビオチン標識プローブ **5-8** を用いた標的分子のプルダウン実験の結果 (矢頭は約 65 kDa の結合タンパク質由来のバンドを示す)。

合成したビオチン標識プローブを用いて、標的分子のプルダウン実験を行いました。**5-8** のそれぞれをアビジンレジンに担持させた後、Hep G2 細胞の溶解物中でインキュベートしました。非特異的タンパク質を洗浄して除いた後、PF1171B 溶液を用いて結合しているタンパク質を溶出させました。溶出タンパク質を SDS-PAGE で展開し、銀染色により検出しました。その結果、活性を示した **6-8** のプローブを用いた場合に、約 65 kDa の結合タンパク質を示すバンドが見られました (図 2B)。このバンドは、ネガティブコントロールとして用いたビオチン-アルキルユニット **3**, **4** および活性が弱いプローブ **5** の場合にはほとんど見られないことから、このタンパク質は PF1171B と特異的に結合していることが示唆されました。現在、このバンドに含まれるタンパク質をゲル内消化し、得られたペプチド断片の配列を MALDI-TOF/TOF-MS により解析しており、データ照合によってタンパク質同定を行う予定です。PF1171B の標的分子同定によって、その活性発現機構の解明へと繋がるのが期待されます。

本研究は、三重大学大学院生物資源学研究科の増田裕一先生、稲垣稜先生のご指導のもと行っており、多くのご支援・ご助言をいただきましたことを心より感謝いたします。第 58 回ペプチド討論会は、私にとって初めてのオンラインポスター発表の場であり緊張していましたが、多くの方々とディスカッションすることが出来、大変勉強になりました。今回の受賞を励みにして、今後も研究活動に励んでいく所存です。最後になりましたが、ペプチドニュースレター 123 号への執筆の機会を与えてくださった大阪府立大学の児島千恵先生にこの場をお借りして深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Umagome, K.; Nagase, K.; Harimaya, K.; Nakayama, F.; Yaguchi, T.; Sato, E.; Hoshiko, S.; Kamito, N.; Soneda, T.; Hachisu, M. Japan patent, 1999, 11021297.

2. Honda, M.; Inagaki, M.; Masuda, Y. Tetrahedron Lett 2021, 81, 153340.

おだ たいが
三重大学 大学院生物資源学研究科
生物圏生命科学専攻 創薬化学研究室
521M304@m.mie-u.ac.jp
<https://www.cc.mie-u.ac.jp/~masuda/>

学会より

本学会理事 (元会長) の赤路健一先生が京都薬科大学の次期学長に決定しました。なお、任期は 2022 年 4 月 1 日から 2026 年 3 月 31 日までの 4 年間です。



訃報

日本ペプチド学会名誉会員の大野素徳先生 (88 才) (九州大学名誉教授, 元崇城大学教授) におかれましては、令和 3 年 12 月 22 日にご逝去されました。ここに謹んでお悔やみを申し上げますとともに日本ペプチド学会会員の皆さまにお知らせいたします。

大野素徳先生は、当時ペプチド固相合成法の難点であったトリプトファンの不安定性を解決するインドールのホルミル誘導体をはじめとしてペプチド化学の発展に寄与されたのみならず、その研究領域はタンパク質、酵素、遺伝子まで多岐におよび、実験と理論の両面から構造と機能に関する研究を展開されました。特にヘビ毒腺ホスホリパーゼ A2 アイソザイムに関する

研究においては、わずかなアミノ酸置換にもかかわらず多様な生理機能を獲得していることに着眼し、緻密な遺伝子解析によって毒腺アイソザイム系が加速進化していることを見出されました。これを嚆矢として、毒腺アイソザイム系における普遍的なダーウィン進化を立証し、世界的に大きな注目を浴びました。さらにハブ毒腺ホスホリパーゼ A2 アイソザイムの生息島間変異から島の成り立ちを議論するなど、先生の研究は独創的な発想と卓越した洞察力に裏打ちされたものでした。

大野先生は、崇城大学をご退職後も奄美ハブ生物科学研究会を立ち上げられ、会長・顧問として最近に至るまでハブ研究に精力的に携わっておられました。この大野先生の研究に対する高邁な好奇心は、先生の愛されたラグビーの5つのコアバリューを基盤としたものと推察し、若い研究者への熱いメッセージでありました。

大野先生は多くの後進の育成に尽力され、薫陶を受けた多くの門下生がアカデミアおよび企業で活躍されております。

大野先生の情熱にあふれたご研究と誠実なお人柄に敬意を表し、心から深くご冥福をお祈り申し上げます。

日本ペプチド学会
会長 野水 基義

2021 年度行事予定

2022 年 1 月

Peptide Newsletter Japan No. 123 発行

2022 年 1 月 28 日 (金)

第 109 回理事会

編集後記

あけましておめでとうございます。本年もどうぞよろしく願い申し上げます。ついこの間、令和になったばかりのように思っていましたが、いつの間にか令和 4 年となりました。時間の早さを感じずにはいられません。オンライン業務にもだいぶ慣れてきましたが、この頃はオンラインと対面の二重業務になり、より忙しくなったような気がします。先日、久しぶりに対面形式の学会に参加しました。久しぶりの出張手続き、久しぶりの新幹線、久しぶりの面々。。新鮮でした。コロナの影響はまだ続きそうですが、本学会のイベントも対面で開催できるようになることを願うばかりです。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、心からお祈りいたします。

123 号アンケートフォーム URL :

<https://forms.gle/rvfD7zcuvtsg2axQA>

(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：2022 年 1 月 25 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 (武庫川女子大学 薬学部)
TEL 0798-45-9961
E-mail : yyano@mukogawa-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)