



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.126

2022年10月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

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

第 59 回ペプチド討論会の開催にあたって

新型コロナウイルス感染症が完全に収束していない状況下ではありますが、第 59 回ペプチド討論会を 3 年ぶりに対面で開催させていただくことになりました。2022 年 10 月 26 日から 28 日の 3 日間、宮城県仙台市で行います。ペプチド討論会史上初めて東北地方での開催となり、東北大学薬学研究科の土井隆行と山形大学理工学研究科の今野博行が共同世話人を務めさせていただきます。会場となるトークネットホール仙台（仙台市民会館）は仙台市街の西端に位置し、仙台駅から徒歩 25 分程度、最寄りの地下鉄駅（大町西公園駅あるいは勾当台公園駅）から徒歩 10 分でアクセスできます。東側には定禅寺通りのケヤキ並木、西側には広瀬川が眺望できる自然豊かなロケーションとなっています。

コロナ禍の中、行動制限などもあり、過去 2 年間ペプチド討論会はオンラインで実施されました。オンラインでの開催は参加者の移動、費用等の負担を軽減し、世界中どこからでもアクセスでき、研究発表、人的交流を楽しむことができることを証明しました。私たち実行委員も日本ペプチド学会事務局や実行委員会打ち合わせなどその準備のほとんどをオンラインで実施してきました。しかし、今回の討論会是对面を基本とし、皆様の現地へのご参加を得て活発な討論会にしたいと考えています。同じ学会の会員が一年に一度、一堂に会するイベントとして皆様が直接お会いし、情報交換や懇親を深めて欲しいと願っています。

今回の討論会ですが、口頭発表は大ホール（1, 2 階, 1,300 席）、ランチョンセミナーは小ホール（地下, 500 席）、ポスター発表、企業展示は展示場（地下）で行います。また、総合受付をロビー（1 階）、休憩（インターネット）スペースを展示場に設置します。このように館内をフル活用し、大きく移動することなく討論会行事を実施できるようにしています。また、座席数が 1,300 と多めの大きな会場を使用するこ



土井 隆行



今野 博行

とで、参加者になるべく密にならないように配慮いたしました。一方で、非常に残念ではありますが、新型コロナウイルス感染症拡大防止の観点から、懇親会を行わないことといたしました。懇親会も情報交換、人脈形成の場として非常に重要な機会ですので皆様にはご不便をおかけすることになります。本誌面をお借りして深くお詫び申し上げます。以前より、発表申込、参加登録などの手続きはペプチド学会事務局の多大なご協力のもと極力 Web 上でお願いしておりましたが、さらに簡便に行えるように工夫しました。

今回の発表ですが、56 件の口頭発表（含：特別講演 1 演題、受賞講演 4 演題、招待講演 2 演題）、146 件のポスター発表、3 件のランチョンセミナーとなりました。新型コロナウイルス感染症が収束していない状況にも関わらず実に多くのお申し込みをいただき大変喜んでおります。特に口頭発表の申込みが非常に多く、口頭発表にお申し込み頂いた一部の方にポスターでの発表をお願いしました。誠に申し訳なく思っております。今回、初めて東北地方で開催するにあたり、申込者が少ないのではないかと心配しておりましたが、実際は予想以上の申し込みがあり、さらに海外から参加される方もいらっしゃいます。日本ペプチド学会が英語化に注力していることが広く認知され、講演内容の質の高さも相まって日本での発表に対するハードルが下がっているものと推察されます。

今回の討論会では、香港大学の Xuechen Li 先生の特別講演を企画しました（10 月 28 日午前）。Xuechen Li 先生は Ser/Thr ライゲーションを起点と



したユニークなペプチドライゲーション法の開発、タンパク質のラベル化法の開発、並びに生物活性ペプチド天然物の全合成および類縁体合成による創薬化学研究等を精力的に展開されています。また、今回の討論会におきましても、韓国ペプチド・タンパク質学会 (KPPS) から Younghee Shin 先生 (Tech University of Korea) と Sunbum Kwon 先生 (中央大学校) をお招きして招待講演を企画しました。討論会 3 日目には、日本ペプチド学会各賞の受賞記念講演を企画しております。Akabori Memorial Award 2022 は、二木史朗先生 (京都大学) に授与されます。二木先生のご業績については皆様もご存知かと思いますが、受賞講演ではこれまでの研究成果についてお話いただけるものと期待しております。また、今年度の日本ペプチド学会「学会賞」は、松崎勝巳先生 (京都大学) に授与されます。これまでの素晴らしいご研究を讀るとともに日本ペプチド学会への多大なる貢献に対して心より感謝いたします。さらに、日本ペプチド学会「奨励賞」は、朝比奈雄也先生 (株式会社日本触媒) ならびに岩崎崇先生 (鳥取大学) のお二人の先生に授与されます。両先生の益々のご研究の発展を祈念いたします。授賞式はペプチド学会通常総会 (10 月 27 日 13:30-) にて執り行われます。

ペプチド討論会の翌日 (10 月 29 日) には、同会場小ホールで市民フォーラムを開催いたします。本フォーラムは、アミノ酸・ペプチド・タンパク質に関する科学を、より多くの方々にご理解頂くために、ペプチド討論会の開催の時期に行われているものです。しかし過去 2 年はコロナ禍のため開催が中止となっておりました。そのため日本ペプチド学会として 3 年ぶり、東北地方では初めての開催となります。今回の市民フォーラムは、「生命現象を司るペプチド」を主題に開催いたします。本年も産学の第一線でご活躍の 4 名の先生に、「アミノ酸・ペプチド」にまつわるお話を分かりやすく解説して頂く予定です。講師は小川智久先生 (東北大学)、森脇浩樹博士 (浜理薬品工業株式会社)、林良雄先生 (東京薬科大学)、本学会会長の坂口和靖先生 (北海道大学)、にお願いしました。この市民フォーラムへのご参加も是非ともご検討いただけると幸いです。

最後になりましたが、本討論会をトークネットホール仙台 (宮城県仙台市) で開催するにあたり多くの企業・財団等より、協賛、ご寄付、要旨集広告・HP バナー広告掲載、企業展示やランチョンセミナー開催のお申し出を頂き、討論会運営に多大なご支援・ご協力を賜りました。本誌面をお借りして厚くお礼申し上げます。また、討論会準備と運営、プログラム編成等にご協力いただいております実行委員 (照屋健太先生、安立昌篤先生、重野真徳先生、尾崎太郎先生、大澤宏祐先生、田原淳士先生、菅原章公先生、坂田樹理先生、山越博幸先生、以上東北大学)、土井研究室ならびに今野研究室の学生の皆様にお礼申し上げます。また、事務関係、運営関係において多大なご協力をいただいております学会事務局の宮嶋令子様ならびに HP、申込システム等 Web 関係では森川和憲様にご協力いただいております。心から感謝申し上げます。さらに、本討論会の運営の細部については、林良雄先生

(東京薬科大学)、玉村啓和先生 (東京医科歯科大学) にご指導頂きました。深謝いたします。なお、後藤正昭様 (ワールドトラベル) には本討論会の準備、円滑な運営にご協力を頂いており、心から感謝致します。

今回の討論会が、会員の皆様の情報交換や共同研究構築、さらに人的交流の機会となるよう努めて参ります。一方で、至らぬ点が多々あるかと存じますので、ご指摘いただけると幸いです。皆様のご協力を賜わりつつ本討論会の成功を願い、第 59 回ペプチド討論会のご案内とさせていただきます。

どい たかゆき
東北大学 大学院薬学研究科
反応制御化学分野
doi_taka@mail.pharm.tohoku.ac.jp
こんの ひろゆき
山形大学 大学院理工学研究科
化学バイオ工学専攻
konno@yz.yamagata-u.ac.jp

環状ペプチドによる人工細胞成長因子・ 阻害分子の創成

はじめに

細胞成長因子は、細胞の増殖・分化、再生・修復を担う生理活性タンパク質であり、創傷治癒促進医薬などとして使用されています。一方、細胞成長因子やその受容体の過剰発現や変異は、がんの発生や悪性化に寄与しており、細胞成長因子と受容体は、がんの診断や治療において重要な標的ですが。



酒井 克也

1. 肝細胞成長因子 HGF と Met 受容体

HGF (Hepatocyte Growth Factor: 肝細胞成長因子) は初代培養肝細胞に対する増殖促進因子として日本で発見されました。HGF は Met 受容体を介して生理活性を発揮しており、Met 受容体は細胞膜貫通型チロシンキナーゼ受容体です^{1,2}。Met 受容体は肝細胞などの上皮細胞やニューロンに発現しており、細胞の増殖、遊走、生存、管腔形成などを誘導します^{1,2}。Met 受容体の組織特異的 KO マウスの研究や、HGF を病態モデル動物に投与する実験から、HGF による Met 受容体活性化は、肝炎、肝硬変、腎障害、肺線維症、皮膚潰瘍、脳虚血を含む疾患・病態に対して薬効を発揮すると報告されています²。

一方、腎がんや肺がんを含む複数のがん種において Met 受容体遺伝子変異がドライバー変異の候補として報告されています。また、HGF はがん細胞の浸潤、転移や薬剤耐性に関与します^{1,2}。

2. 環状ペプチドのスクリーニング – RaPID

Met 受容体や HGF を標的とするためには、高い親和性・特異性で結合する小分子/中分子の創成がカギになります。そのために、de novo 環状ペプチドのスクリーニング技術、RaPID (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) システム³を用いました。RaPID システムは、東京大学の菅裕明博士らによって確立された技術で、新しい医薬品モダリティとして注目を集める特殊環状ペプチドを高効率に取得する革新的な mRNA ディスプレイ法です。カギになるのは、人工アミノアシル化リボザイム (フレキシザイム) による遺伝暗号のリプログラミングで、これによって、非天然の特殊アミノ酸を翻訳系に組み込むことが可能となりました³。一例として、N 末にクロロアセチル側鎖を持つ非天然アミノ酸を設定し、これが C 末に設定されたシステインと自発的に環状化することで、大環状ペプチドのインビトロ翻訳が可能となります³。

3. Met 受容体を活性化する環状ペプチド

Met 受容体細胞外領域を標的タンパク質として RaPID システムを用いることによって、Met 受容体に解離定数が数 nM と強く結合する環状ペプチドを複数取得しました⁴。これらのペプチドは HGF と Met 受容体の結合を阻害せず⁴、HGF とは異なる結合様式で Met 受容体へ結合します⁵。一般に、成長因子受容体の活性化には受容体どうしの二量体 (ダイマー) 形成が必須です。そこで、Met 受容体結合環状ペプチドを適当な長さのスペーサーで連結することによって、受容体をダイマー化し活性化できると予測し、検証しました⁴ (図 1)。これらペプチドダイマーは数 nM 程度の濃度域で Met 受容体を十分に活性化し、ヒト正

常腎尿管上皮細胞などに対して、増殖、遊走、管腔形成の誘導、遺伝子発現の誘導、いずれの生物活性も発揮しました^{4,6}。その最大活性は HGF タンパク質と同程度であり、ほぼ完全な人工リガンドが創成されたと考えられました^{4,6}。興味深いことに、ペプチド配列によって Met 受容体を活性化できる最適なスペーサー長が異なることから⁴、二量体を形成する際の Met 受容体分子間距離や角度が、細胞内チロシンキナーゼドメインのリン酸化に影響すると推測されます。この方法論を用いて、より活性の高い環状ペプチドダイマーに基づく Met 受容体アゴニストや TrkB 受容体アゴニストが市販されています。

4. HGF を阻害する環状ペプチド

HGF は正常組織や血液中では活性のない一本鎖前駆体として存在しますが、傷害組織やがん組織においてマトリプターゼなどのセリンプロテアーゼによって二本鎖 HGF にプロセッシングされ、Met 受容体を活性化できる活性型に変換されます⁷。したがって、HGF-Met 受容体系を標的とするがんの診断や治療においては、活性型 HGF の特異的検出、特異的阻害が重要です。

私たちは HGF を標的分子として、RaPID システムにより HGF を阻害する特殊環状ペプチド HiP-8 (HGF-inhibitory Peptide-8) を取得しました⁸ (図 2)。HiP-8 は 12 アミノ酸からなり、HGF に解離定数が 1 nM と強く結合し、HGF の Met 受容体への結合を阻害します⁸。HiP-8 は HGF の複数のドメインに結合することで HGF を小さく丸い形に固定し、HGF の機能をアロステリックに阻害することが分かりました⁸ (図 2)。この結果は、環状ペプチドのユニークな結合様式⁹と作用機序を示しています。

また、HiP-8 は前駆体 HGF には結合せず、活性型

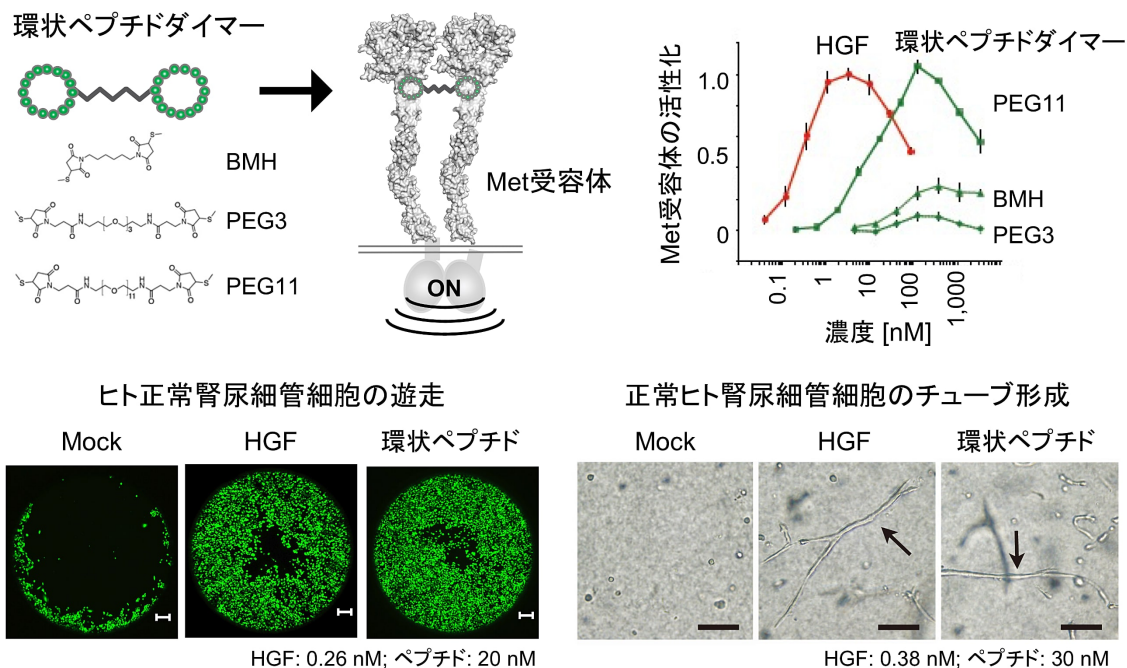


図 1 Met 受容体を活性化する環状ペプチドダイマー (参考文献 4 より改変)

HGF に選択的です。マウス皮下腫瘍モデルにおいて ^{64}Cu 標識した HiP-8 は活性型 HGF を発現する腫瘍へ集積し、かつ腫瘍組織での Met 受容体の活性化を阻害しました⁸。環状ペプチドの高い標的特異性と速やかなクリアランスは、PET (positron emission tomography) によるセラノティクスに適していると考えられます。

5. タンパク質構造内への環状ペプチド移植

ペプチドの安定性やバイオアベイラビリティを向上させる方法の一つは、タンパク質構造内へ機能を保ったままペプチドを移植することですが^{10,11}、ほとんどの場合において移植ペプチドや足場タンパク質がミスフォールディングによって機能を失います。大阪大学の高木淳一博士らは、リジットなヘアピン構造である環状ペプチド⁹は、タンパク質の表面に露出しているループ内に移植できるのではと考え、スクリーニングによって新規に取得した機能性環状ペプチドを、任意

タンパク質の任意ループに簡便に移植できることを示しました^{12,13}。

この技術は、足場タンパク質の機能・特性と、環状ペプチドの機能の融合を可能にします。そこで、前述の Met 受容体結合環状ペプチドを免疫グロブリン Fc の任意ループに機能的に挿入し「二つの Met 受容体バインダーを提示する Fc 分子」を創成しました。この分子は Met 受容体を活性化することが可能で、なおかつ Fc の特徴である長い循環寿命を持ちます⁵ (図 3)。さらに、血液脳関門 (BBB) を通過する抗トランスフェリン受容体抗体の Fc ループに Met 受容体バインダーを提示する分子は、Met 受容体を活性化することが可能で、なおかつ末梢投与後に脳内に移行することが可能です⁵ (図 3)。サイトカインや細胞成長因子は一般に循環半減期が短く、ほとんど BBB を通過しないため、慢性疾患や脳疾患の治療においてその有用性が制限されていますが、この方法で創成した人工成長因子は慢性疾患や脳疾患の治療に有効であると期待されます。

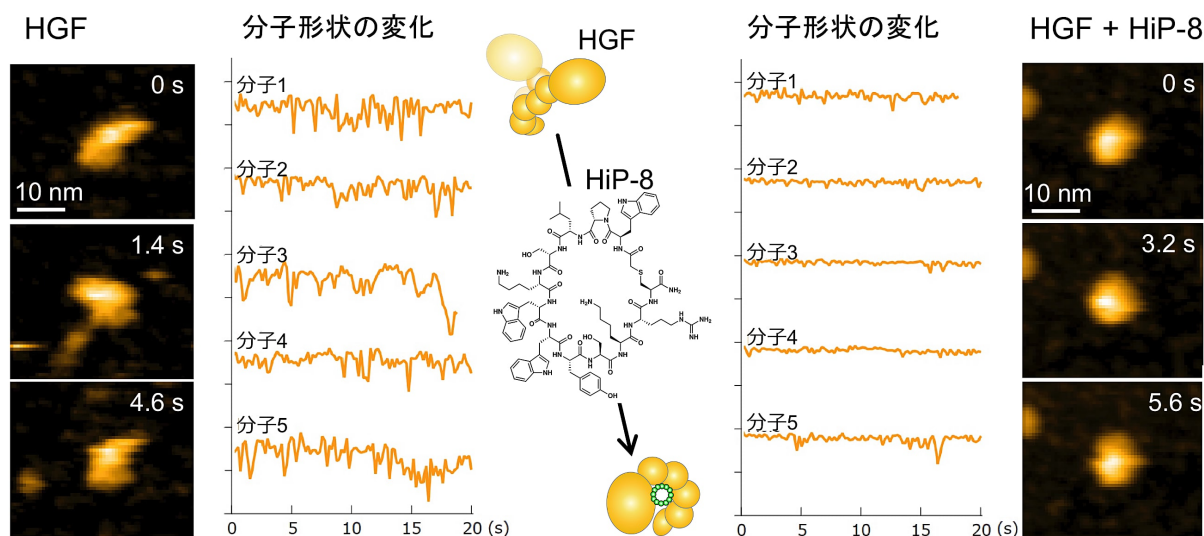


図2 HGFを阻害する環状ペプチドHiP-8の構造とアロステリック阻害機序(高速原子間力顕微鏡観察, 参考文献8より改変)

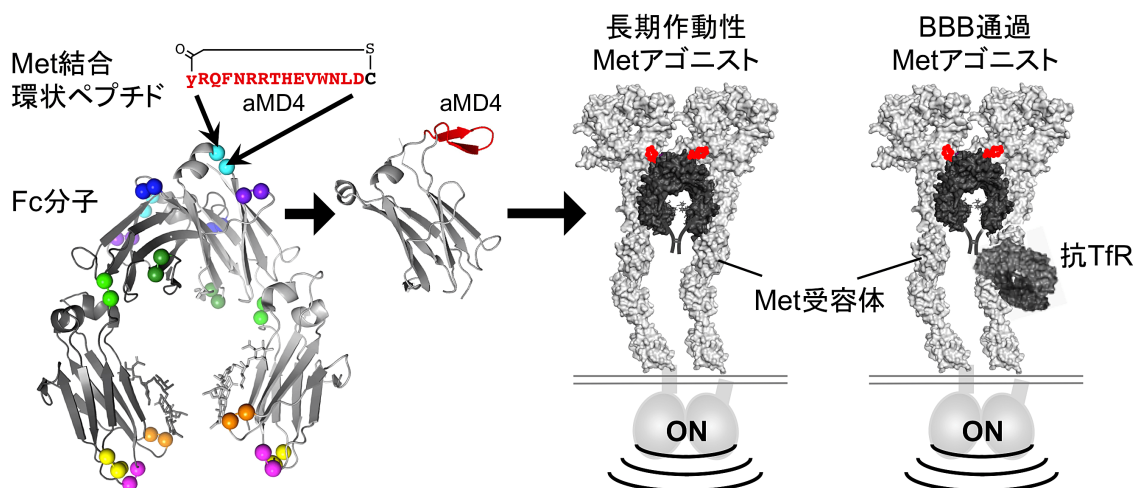


図3 環状ペプチドを内挿したFcに基づく人工受容体アゴニストは長期作動性やBBB通過など本来のリガンドにない性質を獲得する(参考文献5より改変)

6. おわりに

細胞成長因子と受容体を標的とした環状ペプチドの創成を通じて、環状ペプチドの特徴や有効性を経験しました。これからもペプチドの能力を生かした研究を進展させたいと考えています。本研究は、金沢大学がん進展制御研究所・ナノ生命科学研究所 松本邦夫教授、東京大学大学院理学系研究科 菅裕明教授、大阪大学蛋白質研究所 高木淳一教授との共同研究の成果です。本稿執筆の機会を与えて頂きましたペプチド研究所 吉矢拓先生に深く感謝いたします。

参考文献

1. Trusolino, L.; Bertotti, A.; Comoglio, P. M. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, 11, 834–848.
2. Sakai, K.; Aoki, S.; Matsumoto, K. *J Biochem* 2015, 157, 271–284.
3. Passioura, T.; Katho, T.; Goto, Y.; Suga, H., *Ann Rev Biochem* 2014, 83, 727.
4. Ito, K.; Sakai, K.; Suzuki, Y.; Ozawa, N.; Hatta, T.; Natsume, T.; Matsumoto, K.; Suga, H. *Nat Commun* 2015, 6, 6373.
5. Sakai, K.; Sugano-Nakamura, N.; Mihara, E.; Rojas-Chaverra, N. M.; Watanabe, S.; Sato, H.; Imamura, R.; Voon, D. C. C.; Sakai, I.; Yamasaki, C.; Tatenno, C.; Shibata, M.; Suga, H.; Takagi, J.; Matsumoto, K. *Nat Biomed Eng* in press.
6. Miao, W.; Sakai, K.; Ozawa, N.; Nishiuchi, T.; Suzuki, Y.; Ito, K.; Morioka, T.; Umitsu, M.; Takagi, J.; Suga, H.; Matsumoto, K. *Sci Rep* 2018, 8, 16492.
7. Kataoka, H.; Hamasuna, R.; Itoh, H.; Kitamura, N.; Koono, M. *Cancer Res* 2000, 60, 6148–6159.
8. Sakai, K.; Passioura, T.; Sato, H.; Ito, K.; Furuhashi, H.; Umitsu, M.; Takagi, J.; Kato, Y.; Mukai, H.; Warashina, S.; Zouda, M.; Watanabe, Y.; Yano, S.; Shibata, M.; Suga, H.; Matsumoto, K. *Nat Chem Biol* 2019, 15, 598–606.
9. Huang, Y., Margarete, M., Suga, H. *Chem Rev* 2019, 119, 1036–10391.
10. Wang, C. K.; Craik, D. J. *J Biol Chem* 2021, 296, 100425.
11. Zoller, F.; Markert, A.; Barthe, P.; Zhao, W.; Weichert, W.; Askoxylakis, V.; Altmann, A.; Mier, W.; Haberkorn, U. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012, 51, 13136–13139.
12. Mihara, E.; Watanabe, S.; Bashiruddin, N. K.; Nakamura, N.; Matoba, K.; Sano, Y.; Maini, R.; Yin, Y.; Sakai, K.; Arimori, T.; Matsumoto, K.; Suga, H.; Takagi, J. *Nat Commun* 2021, 12, 1543.
13. Komatsu, Y.; Terasaka, N.; Sakai, K.; Mihara, E.; Wakabayashi, R.; Matsumoto, K.; Hilvert,

D.; Suga, H. *iScience* 2021, 24, 103302.

さかい かつや
金沢大学 がん進展制御研究所
k_sakai@staff.kanazawa-u.ac.jp
<https://www.k-matsumoto-kanazawa-u.org/>

機能性ペプチドを利用したスプレー噴霧による葉への核酸送達法の開発

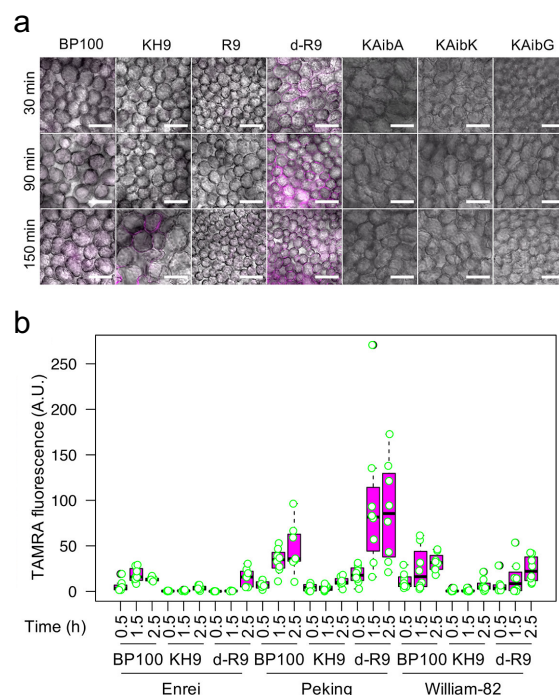
1. はじめに

機能性ペプチドは細胞透過性ペプチド (CPP) や核酸結合性ペプチド、オルガネラ標的ペプチド等、機能を持つ短いペプチドの総称である。我々は、これらの機能性ペプチドを組み合わせた融合ペプチドを担体として、核酸やタンパク質等の生体高分子を植物細胞内に送達する手法の開発を行っている。



小田原 真樹

融合ペプチドを用いた従来の手法では、生体高分子と融合ペプチドの複合体を含む水溶液中に植物体あるいは植物片を浸して処理していたため、適用可能な植物材料の大きさに制限があった。最近、我々は生体高分子-ペプチド複合体溶液を葉に噴霧することにより生体高分子を植物細胞内に導入する手法 (スプレー法) を開発し、これにより大きな植物体の葉への導入



も可能となったため¹, その手法に関して紹介する。

2. スプレー法に適した細胞透過性ペプチドの選択

葉表面への噴霧による生体高分子の細胞内送達に適した CPP を選択するため, 蛍光ラベルした CPP を葉表面に噴霧し, 表皮細胞から内部組織の細胞への透過率をシロイヌナズナとダイズの葉で評価した。その結果, 葉の表面に噴霧された CPP は 30 分後には表皮細胞内へ, 120 分後には柵状組織細胞内へと透過しており, dR9 [d-(RRRRRRRRR)] や BP100 (KKLFKKILKYL) といった植物において実績のある CPP²がシロイヌナズナ (図 1a) ダイズ (図 1b) いずれの植物の葉においても高い透過率を示した。

我々のこれまでの研究から, CPP にカチオン性ペプチドを融合することにより効率的に核酸等の生体高分子を細胞内に送達できることが明らかになっている³。この融合ペプチドを担体として, 蛍光ラベルしたプラスミド DNA をトマトやダイズの葉に噴霧した結果, 用いた複数種の融合ペプチドいずれにおいてもプラスミド DNA が細胞内に取り込まれていることが明らかになった。特にカチオン性ペプチド KH9 [(KH)₉] を融合したペプチド KH9-BP100 を用いた場合に, プラスミド DNA が安定して細胞内に取り込まれていた。

3. スプレー法による植物細胞内へのプラスミド DNA の送達と遺伝子発現

葉の細胞内へのプラスミド DNA の送達を確認するため, 融合ペプチド KH9-BP100 を担体としてレポーター遺伝子 GUS をコードするプラスミド DNA の送達を試みた。KH9-BP100 とプラスミド DNA を混合して複合体を形成し, さらに葉のワックス層を破壊して細胞内への浸透を促進することが報告されている界面活性剤 (Silwet L-77) とエンドサイトーシスを促進することが報告されている 5% ショ糖をこの溶液に添加し, 葉に噴霧した (図 2a)。KH9-BP100 とプラスミド DNA の混合比は, 最も複合体がコンパクトになり, 複合体の表面電荷が正になった N/P 比 (ペプチド側鎖の正電荷アミノ酸数/DNA のリン酸基数) = 2.0 とした。上記溶液をシロイヌナズナの葉に噴霧した結果, 噴霧したいずれの葉からも有意に高い GUS 活性が観察され, スプレー噴霧による細胞内への DNA の送達を示された (図 2b)。KH9-dR9 を担体とした同様の解析では KH9-BP100 ほどの GUS 活性が観察されず, カチオン性である dR9 がプラスミド DNA と相互作用することにより細胞透過能に影響していることが原因として考えられた。

一方, スプレー噴霧による核酸の送達における葉側

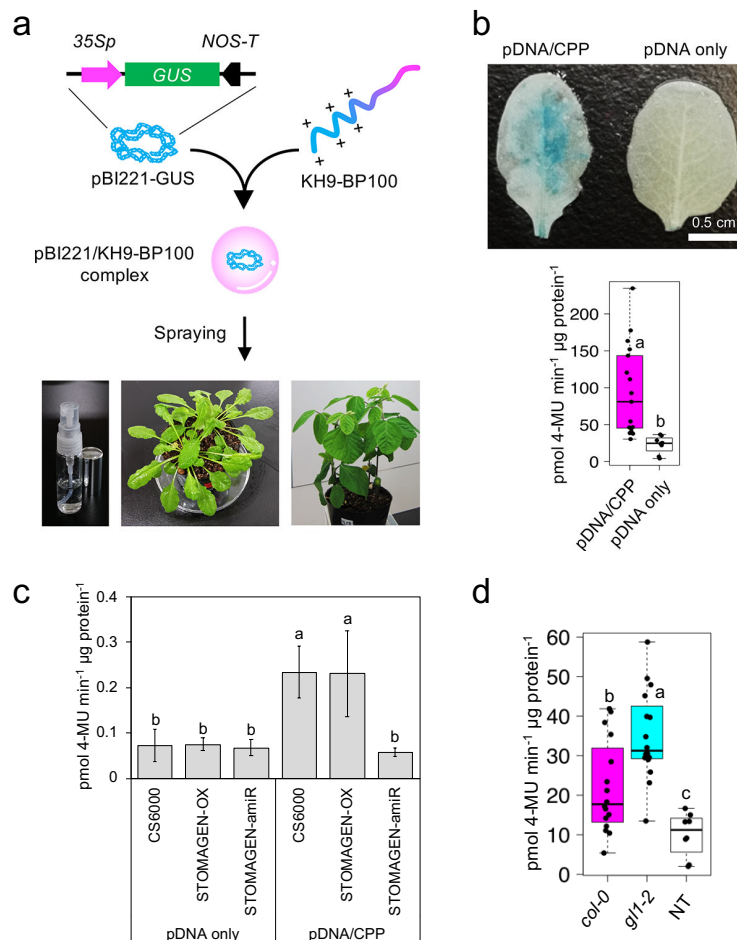


図 2 スプレー法によるシロイヌナズナ葉への DNA の導入。(a) スプレー法による DNA 導入の模式図, (b) 葉に導入した DNA に由来する GUS タンパク質の活性, (c) ストマジェンの増減により気孔の数を増減させた葉に導入した場合の GUS タンパク質の活性, (d) トライコームを欠損する葉 (*gl-2*) に導入した場合の GUS タンパク質の活性。グラフ中の文字 (a-c) が異なる場合は有意差あり

の構造の影響も検証した。気孔は $1\mu\text{m}$ 程度までのナノサイズの粒子が通過できることが知られている⁴。KH9-BP100 を担体としてレポーター（GUS）を載せたプラスミド DNA をスプレーした結果、ストマジエンの過剰発現により気孔数を増加させたシロイヌナズナ形質転換体ではレポーター活性の上昇は観察されなかったものの、ストマジエンの発現抑制により気孔数を減少させた形質転換体ではレポーター活性の低下が観察された（図 2c）。これは、プラスミド DNA-ペプチド複合体の葉内部への取り込みは気孔の数に影響されているものの、最終的には葉内部から各細胞への取り込みが細胞内送達には重要であることが原因と考えられる。葉の表面に存在するトライコームも同様にナノサイズの粒子の取り込みに関与することが知られている⁵。しかしながら、トライコームを欠損する変異体ではレポーター活性の上昇が観察されたことから、トライコームは噴霧されたプラスミド DNA-ペプチド複合体の取り込みを減少させている可能性が示唆された（図 2d）。

4. スプレー法による植物細胞内への RNA の送達と遺伝子サイレンシング

我々は、融合ペプチドを担体として siRNA を細胞内に導入することにより、葉における遺伝子発現を抑制（サイレンシング）する手法を既に確立しており⁶、このスプレー法への適用を検討した。GFP/YFP に相補性を持つ 27 bp の二本鎖 siRNA（siGFPS1）と KH9-BP100 の複合体を N/P 比 2.0 で形成し、これを GFP あるいは YFP を発現する植物体の葉表面に噴霧

し、遺伝子サイレンシングを解析した（図 3a）。噴霧後 3 日のシロイヌナズナ葉における YFP 遺伝子の発現解析を行った結果、タンパク質、mRNA いずれも有意に 50%程度の減少が観察された（図 3b, c）。同様の手法をトマト葉でも検証した結果、GFP の発現がタンパク質レベルで 80%程度、mRNA レベルで 60%程度の減少が観察された。これらの結果、融合ペプチドを担体としたスプレー法による siRNA 導入によって葉の遺伝子サイレンシングが可能であることが示された。

5. スプレー法による葉緑体への核酸の送達

ポリカチオン性ペプチド KH9 に葉緑体移行ペプチド OEP34 を融合したペプチド KH9-OEP34 を用いることにより、葉緑体選択的に核酸を送達することが可能であり⁷、このペプチドを用いたスプレー法による葉緑体への核酸送達を検討した。葉緑体プロモーター下にレポーター遺伝子 GUS を配置したプラスミド DNA と KH9-OEP34 との複合体を作製し、さらに BP100 を付加して細胞透過性の向上を試みた（図 4a）。作製した複合体溶液をシロイヌナズナ葉に噴霧した結果、葉緑体由来と考えられる GUS レポーター活性を検出することができた（図 4b）。また、同様のペプチドを用いて GFP/YFP 相補性を持つ siGFPS1 との複合体を作製し、葉緑体ゲノムから GFP を発現しているシロイヌナズナ組換え体葉に噴霧した結果、タンパク質、mRNA いずれにおいても GFP 発現が抑制された（図 4c, d）。これらの結果から、融合ペプチドを担体としたスプレー法によって、細胞内小器官である葉緑体においても遺伝子送達や遺伝子サイレンシングが可能であることが示された。

6. おわりに

今回開発した手法は、特別な機器を必要とせず、効率のかつ一過的に植物への核酸導入が可能であり、非遺伝子組換え的な農作物の改変などに応用されることが期待されます。最後に、本稿執筆の機会をいただきましたペプチドニュースレター編集委員の先生方に御礼申し上げます。

引用文献

1. Thagun, C.; Horii, Y.; Mori, M.; Fujita, S.; Ohtani, M.; Tsuchiya, K.; Kodama, Y.; Odahara, M.; Numata, K. ACS Nano 2022, 16, 3506–3521.
2. Numata, K.; Horii, Y.; Oikawa, K.; Miyagi, Y.; Demura, T.; Ohtani, M. Sci Rep 2018, 8, 10966.
3. Lakshmanan, M.; Kodama, Y.; Yoshizumi, T.; Sudesh, K.; Numata, K. Biomacromolecules 2013, 14, 10–16.
4. Eichert, T.; Kurtz, A.; Steiner, U.; Goldbach, H. E. Physiol Plant 2008, 134, 151–160.
5. Schreel, J. D. M.; Leroux, O.; Goossens, W.;

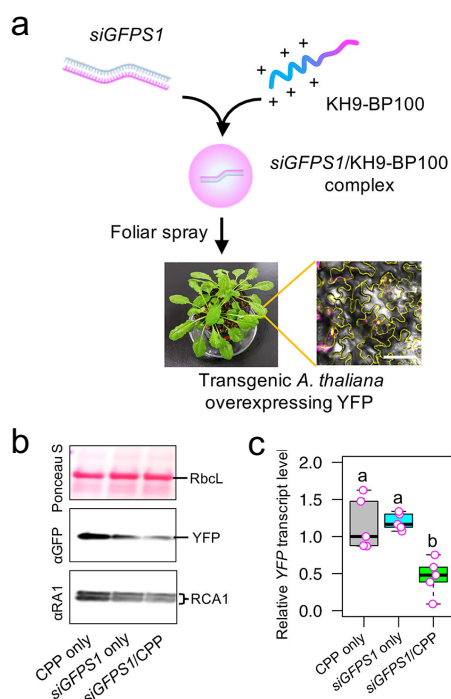


図 3 シロイヌナズナ葉への siRNA の導入。(a) スプレー法による siRNA 導入の模式図、(b) ウェスタンブロット法による siRNA を導入した葉における YFP タンパク質量の解析、(c) 逆転写定量 PCR 法による siRNA を導入した葉における YFP 転写物の解析。グラフ中の文字 (a, b) が異なる場合は有意差あり

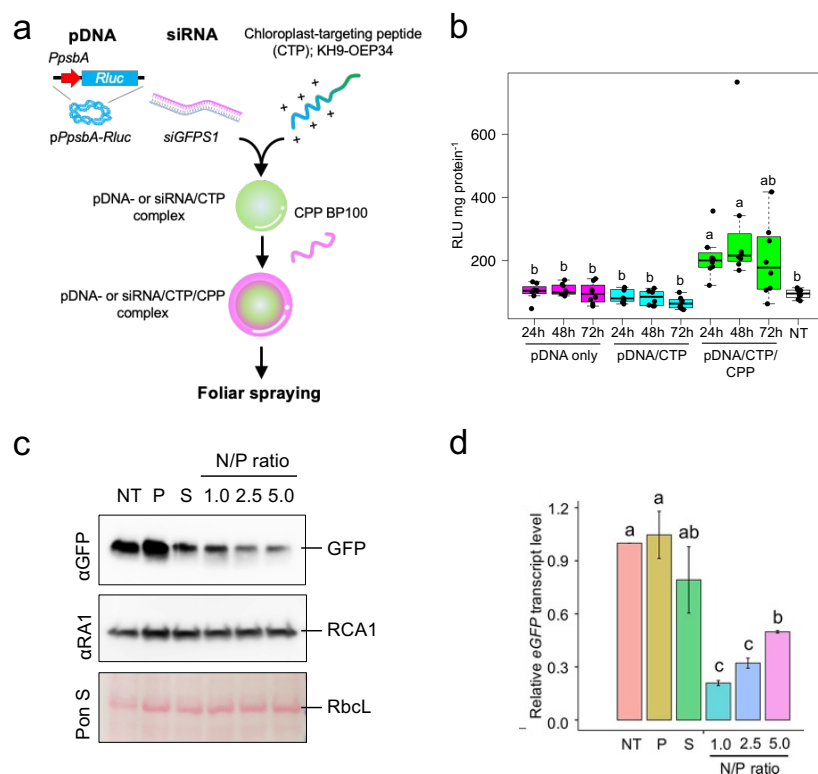


図4 葉緑体への核酸の導入。(a) スプレー法によるシロイヌナズナ葉緑体への核酸の送達の様式図、(b) スプレー法により葉緑体にプラスミドDNAを導入した葉におけるルシフェラーゼ活性、(c) 葉緑体にsiRNAを導入した葉における葉緑体発現GFPのタンパク質量 (ウェスタンブロット法)、(d) 葉緑体にsiRNAを導入した葉における葉緑体発現GFPのmRNA量 (逆転写定量PCR法)。グラフ中の文字 (a-c) が異なる場合は有意差あり

Brodersen, C.; Rubinstein, A.; Steppe, K. Plant J 2020, 103, 769–780.

6. Numata, K.; Ohtani, M.; Yoshizumi, T.; Demura, T.; Kodama, Y. Plant Biotechnol J 2014, 12, 1027–1034.
7. Yoshizumi, T.; Oikawa, K.; Chuah, J.; Kodama, Y.; Numata, K. Biomacromolecules 2018, 19, 1582–1591.

おだはら まさき
理化学研究所 環境資源科学研究センター
バイオ高分子研究チーム
masaki.odahara@riken.jp
<http://enzyme.riken.jp/>

On receiving ‘Excellent Stone Award’ at the 58th Japanese Peptide Symposium

It was my great pleasure to participate in the past 58th Japanese Peptide Symposium, held virtually in October 2021. First and foremost, I would like to thank the organizer committee, Hayashi-sensei and all the symposium staff for organizing such a successful event during the Covid-19 pandemic and giving me the opportunity to present our work in the Young Investigator Oral Presentation session. I would also like to express my deepest gratitude to the judges for recognizing our presentation entitled ‘Discovery and Characterization of a Novel Peptide Prenyltransferase for Facile Preparation of Prenylated Macrocyclic Peptides’ and selecting me as the winner of the ‘Excellent Stone Award’ sponsored by Kokusan Chemical. Furthermore, my utmost appreciation is due to my advisor Goto-sensei, who taught me how to become a better young scientist in numerous aspects unlimited to teaching me how to become a responsible reviewer for the scientific community. Lastly, I



Zhang Yuchen

especially appreciate my advisor Suga-sensei for offering me the chance to work with him, which is my dream seeded in 2014 when we first met each other, and his tremendous support to me.

Taking this opportunity, I would like to briefly introduce our work related to this presentation. Peptides are gaining exceptional interest in drug discovery efforts since they possess various pharmacological characteristics by occupying the size vacancy between two other current classes of therapeutic molecules, small molecule drugs and antibodies¹. It has been proved that peptide-based drug candidates are capable of selective binding to some previously undruggable targets involved in clinically relevant protein-protein interactions (PPI). Generally, peptides are comparable in affinity and selectivity with antibody-based therapeutics, while they retain the synthetic accessibility like small molecule drugs benefit from the well-established solid-phase synthesis chemistry. Although peptide-based drug candidates have these advantageous features, unfortunately, unmodified peptides are generally impermeable to the cell membrane mainly due to their giant polar surface, making intracellular targets inaccessible to them². Thus, one of the overarching goals of peptide-based drug discovery is to devise modification tools that may improve the membrane permeability of peptides.

We are particularly interested in enzymatic prenylation on peptides for two reasons: 1. Prenyl groups enhance the lipophilicity of the peptides and can consequently improve their membrane permeability and bioavailability; 2. En-

zymes installing prenyl groups, so-called prenyl-transferases (PTases), have the potential to modify various nonnatural substrates with overwhelming selectivity and mild reaction conditions. In nature, the biosynthetic pathways of cyanobactins, a class of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) from cyanobacteria, are rich sources for PTases catalyzing diverse modes of prenylation. In addition to previously characterized PTases that modifies Tyr, Ser, Thr, Trp, and peptide N/C-terminus³⁻⁶, an Arg-N-PTase has been reported by Dr. Matsuda from Hokkaido university during this symposium⁷. These enzymes are promising biocatalysts because of their strict chemo-selectivity but yet remarkable substrate tolerance for the global substrate sequence compositions. However, the chemistry of these cyanobactin PTases is largely limited to installing prenyl moieties on electron-rich hetero atoms (Figure 1). Being found so far, only PTases modifying carbon atom is KgpF involved in kawaguchipectin A biosynthesis, which catalyzes Trp-C-dimethylallylation⁸. The enzymatic tool for regioselective peptide C-prenylation remained to be expanded. Thus, we aim to explore novel PTases with unprecedented C-prenylation activity.

To discover potential C-PTases, we performed bioinformatic analysis using currently characterized PTases as queries. In light of phylogenetic and sequence similarity network analyses, we focused on a putative PTase, which was named LimF later, from *Limnothrix* sp. to study it further. We first

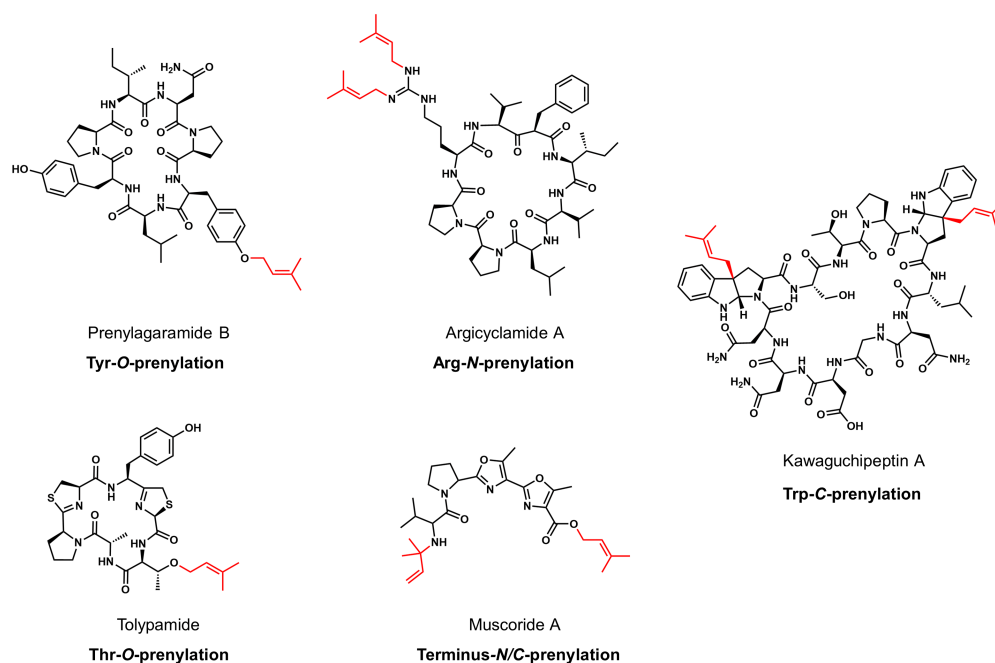


Figure 1 Examples of previously characterized prenylated cyanobactins and the chemistry of corresponding PTases.

heterologously expressed and purified LimF and incubated it with its putative backbone-cyclized peptide substrate. LimF exhibited prenylation activity on the substrate in the presence of geranylpyrophosphate and magnesium ions (Figure 2). The MS/MS analysis of the geranylated product suggested that LimF geranylates a His residue in this peptide. This was a surprise to us since modification on His residue has not been found in the RiPPs family. The NMR analysis of the LimF-geranylated product gave critical correlations between the geranyl moiety and the imidazole ring, which allowed us to identify the geranylation site to be the C2 position of His side chain in the forward direction (*i.e.*, prenylation at primary carbocation). To the best of our knowledge, LimF is the first enzyme that catalyzes posttranslational modification on His-C2 position.

After uncovering the LimF ability of His-C-geranylation with the natural substrate, we wondered if we could establish a general approach to introduce such modification on various artificial

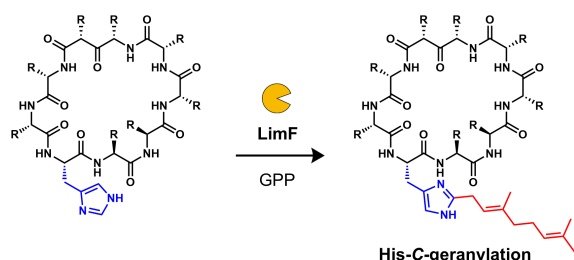


Figure 2 LimF-catalyzed His geranylation with its putative substrate.

peptides. We have previously developed a custom-made cell-free translation technology, called flexible *in vitro* translation (FIT) system, which allowed us to readily generate various thioether-macrocylic peptides by simply varying the encoding DNA sequences. By coupling LimF modification with the FIT system (Figure 3), we could conduct transcription, translation, and posttranslational geranylation in a one-pot manner. We referred this coupled system as the FIT-LimF system, which allowed us to perform the in-depth substrate probing of LimF. The results provided us the guideline to design sequences for efficient LimF modification and proved that LimF is capable of regio-selective His-C-geranylation with diverse substrates regardless of their ring sizes and global sequence compositions.

Collectively, we have discovered the first enzyme to catalyze posttranslational modification on His-C2 position. Further substrate probing with the FIT-LimF system revealed it as a versatile regioselective His geranyltransferase. We are currently working on applying LimF for the production and selection of various bioactive geranylated peptides with enhanced membrane permeability.

Lastly, I would thank my colleagues Dinh-kun, Inoue-san, Ariga-kun, and collaborators Okada-sensei, Satake-sensei, Hamada-sensei, and Sengoku-sensei for their tremendous effort in this project. I'm also grateful to my colleagues Drs. Vinogradov, Tsiamantas, and Wang for the scientific stimulating discussions.

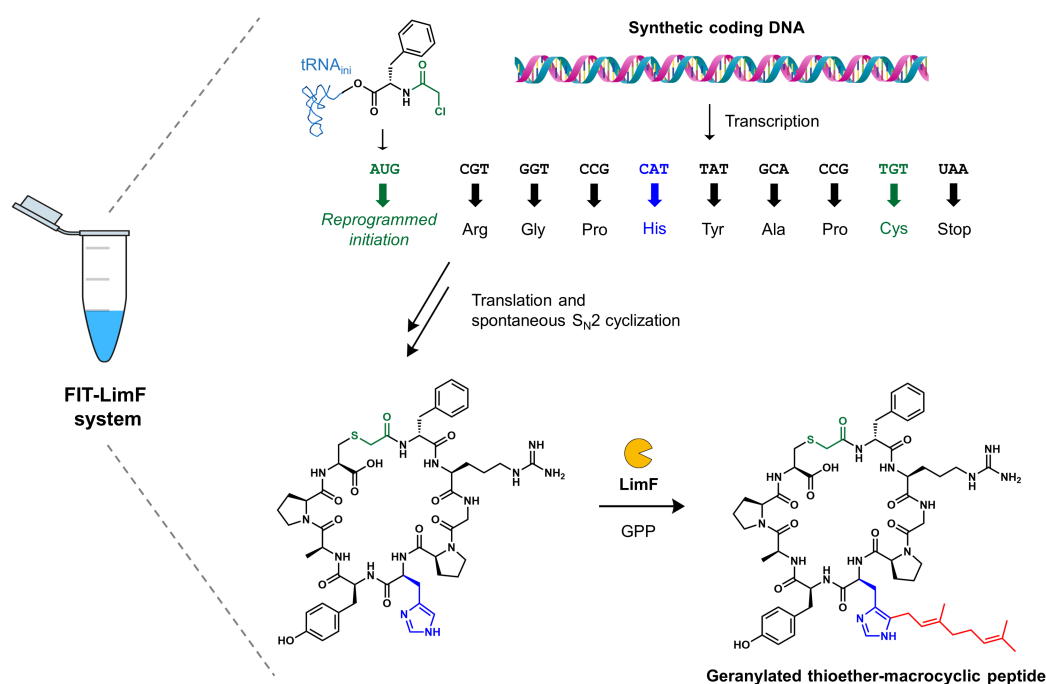


Figure 3 Schematic illustration of facile preparation of geranylated thioether-closed macrocyclic peptides in the FIT-LimF system.

References

1. Vinogradov, A. A.; Yin, Y.; Suga, H. J Am Chem Soc 2019, 141, 4167–4181.
2. Dougherty, P. G.; Sahni, A.; Pei, D. Chem Rev 2019, 119, 10241–10287.
3. Mori, T. J Nat Med 2020, 74, 501–512.
4. Morita, M.; Hao, Y.; Jokela, J. K.; Sardar, D.; Lin, Z.; Sivonen, K.; Nair, S. K.; Schmidt, E. W. J Am Chem Soc 2018, 140, 6044–6048.
5. Purushothaman, M.; Sarkar, S.; Morita, M.; Gugger, M.; Schmidt, E. W.; Morinaka, B. I. Angew Chem Int Ed 2021, 60, 8460–8465.
6. Mattila, A.; Andsten, R.-M.; Jumppanen, M.; Assante, M.; Jokela, J.; Wahlsten, M.; Mikula, K. M.; Sigindere, C.; Kwak, D. H.; Gugger, M. ACS Chem Biol 2019, 14, 2683–2690.
7. Phan, C.-S.; Matsuda, K.; Balloo, N.; Fujita, K.; Wakimoto, T.; Okino, T. J Am Chem Soc 2021, 143, 10083–10087.
8. Parajuli, A.; Kwak, D. H.; Dalponte, L.; Leikoski, N.; Galica, T.; Umeobika, U.; Trembleau, L.; Bent, A.; Sivonen, K.; Wahlsten, M. Angew Chem Int Ed 2016, 55, 3596–3599.

ザン ウチェン
東京大学 理学系研究科
化学専攻 生物有機化学教室
(yczhang@chem.s.u-tokyo.ac.jp)

第 54 回若手ペプチド夏の勉強会開催報告



田口 晃弘



今野 翔



谷口 敦彦

第 54 回若手ペプチド夏の勉強会は、2022 年 8 月 8 日および 9 日の 2 日間、Gather Town と Zoom を使ったオンライン形式で開催され、東京薬科大学の薬品化学教室（林良雄研究室）のスタッフでお世話させていただきました。本勉強会は、東京都八王子市での現地開催を予定していましたが、新型コロナウイルス感染状況を鑑み、昨年と同様に今年もオンライン開催とさせていただきました。現地開催を期待されていた方もおられたと存じますが、本勉強会の開催におきましてご理解、ご協力いただきありがとうございます。

ございました。オンラインでの勉強会でしたが、国外および国内から合計 40 団体、188 名の学生・研究者の方々にご参加いただき、盛況のうちに勉強会を終えることができました。本会は、日本ペプチド学会から運営費の一部をご支援いただきました。また、多くの企業からご協賛いただきました。この場を借りて、厚く御礼を申し上げます。

本勉強会では、3 件の特別講演、5 件の依頼講演をお願いいたしました。特別講演を行っていただいた石川稔先生（東北大学大学院生命科学研究所）「タンパク質分解薬の創製研究」、三島正規先生（東京薬科大学薬学部）「NMR を駆使した生命現象の解明」および、大石真也先生（京都薬科大学）「メチル基にまつわる小さな話」の先生方には、研究成果のご紹介に加えて、研究の苦労話や学生・若手研究者への熱いメッセージなど、通常の学会の講演では拝聴できないようなお話をいただきました。学生の皆さんの今後の研究生活や、進路の参考になるような貴重な経験となったものと思います。また、依頼講演では、吉矢拓先生（株式会社ペプチド研究所）、濱野展人先生（東京薬科大学 薬学部）、大澤宏祐先生（東北大学大学院薬学研究科）、河野健一先生（京都大学大学院薬学研究科）といった新進気鋭の若手の先生方にご講演いただきました。さらに、留学体験記として中村斐有先生（The Hong Kong University of Science and Technology）には、留学中のラボの様子や研究成果、また若くして海外の研究主宰者に就かれた経緯も含めてお話いただきました。学生だけでなく若手教員も刺激を受けたのではないのでしょうか。一方で学部学生、大学院生を中心に、一般講演では 11 件、ポスター発表では 39 件の応募がありました。いずれの発表も学会同様の研究内容がまとめられた非常にレベルの高いものであり、ペプチド科学分野の若手研究者のレベルの高さを感じられるものばかりでありました。

ポスター発表は、Gather Town 内に設置されたポスター会場にて行いました。参加者はアバターを操作して目的のポスターまで移動していただきました。最近の学会でオンライン発表に慣れているようで、参加者、発表者ともに問題なく、どのポスターの前でも活発なディスカッションが行われておりました。その後、希望研究室による研究室紹介を Zoom で行いました。今回は、15 研究室および 3 企業の発表がありました。限られた時間での発表でしたが、スライドや動画を駆使し、所属研究室をわかりやすく、かつ面白く紹介する大変ユニークな発表ばかりでした。夜の自由討論では、普段はなかなか会うことのできない他大学や企業にいる参加者同士で楽しく交流できたことと思います。

例年通り、本勉強会では発表者への優秀賞を設け、参加者の皆様の投票の結果、11 名の学生を表彰させていただきました。今年度の一般講演部門最優秀賞は、青木啓輔さん（京都大学）、一般講演部門優秀賞は、門田晃司さん（東京大学）、林隼矢さん（徳島大学）、ポスター発表部門優秀賞は、橋本天さん（東京薬科大学）、内田創太さん（東京大学）、柏勇希さん（東京大学）、平田桃さん（甲南大学）、笠井貴文さん（東京大学）、山崎祐季さん（北海道大学）、田中晶子さん（静



図1 集合写真

岡大学), 江間文香さん(東京薬科大学)が受賞されました。おめでとうございます。受賞者の方々には、賞状と副賞を贈らせていただきました。なお、その他の発表者も優秀賞に僅差の方ばかりでした。研究室紹介の最優秀発表賞には、東京大学・菅研究室、優秀発表賞には東京薬科大学・林研究室が選出されました。大変素晴らしい発表ばかりで、参加者の皆様も投票を迷われたのではないかと思います。

今年の勉強会はオンライン開催でしたが、多くの皆様にご参加いただきありがとうございました。また、口頭発表、ポスター発表ともに現地開催と変わらない熱い議論を交わして下さった皆様に深く感謝いたします(図1)。ウィズコロナ・アフターコロナでの学術集会では、徐々に現地での開催が増えていくかと思っています。現地で皆様とお会いし、交流を深められることを楽しみにしております。

来年度の第55回若手ペプチド夏の勉強会は、河野健一先生(京都大学)、小林数也先生(京都薬科大学)、吉矢拓先生(株式会社ペプチド研究所)が世話人となり、2023年8月8日(火)~10日(木)、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザにて開催される予定です。今後も、若手ペプチド夏の勉強会がさらに発展し、若手ペプチド研究者の交流の場としていくことができれば幸いです。最後になりましたが、本勉強会へのご厚意に心より感謝申し上げます。次回以降も変わらぬご支援とご協力のほど、何卒よろしく願いいたします。

(たぐち あきひろ)
 東京薬科大学 薬学部
 ataguchi@toyaku.ac.jp
 (このしょう)
 東京薬科大学 薬学部
 skonno@toyaku.ac.jp
 (たにぐち あつひこ)
 東京薬科大学 薬学部
 atani@toyaku.ac.jp

日本ペプチド学会からのお知らせ

《2022 年度行事予定》

2022 年 10 月

Peptide Newsletter Japan No. 126 発行

2022 年 10 月 25 日 (火)

第 111 回理事会・第 40 回評議員会合同会議

2022 年 10 月 26 日 (水) ~ 28 日 (金)

第 59 回ペプチド討論会

場 所: トークネットホール仙台 (仙台市民会館)

世話人: 土井 隆行 (東北大), 今野 博行 (山形大)

2022 年 10 月 27 日 (木)

2022 年度日本ペプチド学会通常総会

2022 年 10 月 29 日 (土)

日本ペプチド学会市民フォーラム 2022

場 所: トークネットホール仙台 (小ホール)

世話人: 土井 隆行 (東北大), 今野 博行 (山形大),
照屋 健太 (東北大)

2023 年 1 月

Peptide Newsletter Japan No. 127 発行

2023 年 1 月 (予定)

第 112 回理事会

編集後記

ペプチドニュースレター 126 号をお届けします。COVID-19 がくすぶる中、ご執筆くださった先生方に感謝申し上げます。今回は酒井先生に環状ペプチドの

親和性を巧みに応用した研究をご紹介いただきました。私は記事を拝見しながら、小さな環状ペプチドが大きな蛋白質を必死に操る姿を妄想して、必死にペプチドを応援しておりました（アブない人になっちゃってますね…）。また、小田原先生には細胞透過性ペプチドの助けで植物に核酸を導入する非常に美しい研究をご紹介いただきました。このような形で、これから細胞透過性ペプチドが次々に社会実装されていくと期待しております。さらに、第 58 回ペプチド討論会にて **Excellent Stone Award** を受賞された Zhang 先生にもご寄稿いただきました。先生方のご研究の更なる発展を祈念しております。

また、今回開催報告をご執筆いただきましたように、谷口先生、田口先生、今野先生のお世話で第 54 回若手ペプチド夏の勉強会はオンラインで実施されました。谷口先生がイギリスから司会進行なさるなど、前回に引き続きオンラインの良さを存分に活かした素晴らしい会だったと思います。改めて幹事の先生方にお礼申し上げます。

さて、今年の第 59 回ペプチド討論会は土井先生と今野先生のお世話のもとで待ちに待ったオンサイトで開催となります。皆さん、熱いディスカッションで会を盛り上げましょう!!

また、本ニュースレターに関しての読者アンケートを行っております。ご協力のほどよろしくお願い申し上げます。

126 号アンケートフォーム URL：

<https://forms.gle/xKTPssRNcyosgqiR8>

(編集委員：吉矢 拓)

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 10 月 11 日

編集委員

林 良雄（担当理事）（東京薬科大学 薬学部）

TEL 042-676-3275

E-mail：yhayashi@toyaku.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

薬師寺 文華（北海道大学 薬学研究院）

TEL 011-706-3229

E-mail：fyakushiji@pharm.hokudai.ac.jp

(本号編集担当：吉矢 拓)