



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.127

2023年1月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

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

新年のご挨拶

日本ペプチド学会の皆様、新年明けましておめでとうございます。

まず、2022年を振り返ってみたいと思います。新型コロナウイルス感染症のパンデミックが始まって早3年が経とうとしております。この新型コロナウイルスパンデミックの間、遠隔での学会や会議ばかりでした。遠隔には遠隔の良さがあるという発見もありましたが、やはり顔を合わせての会話や討論の重要性を改めて感じた期間でもありました。特に、若い研究者や学生にとっては海外ばかりでなく国内の研究者との接触の機会がほとんどなく、このことはネットワークの形成や新たな異なる考え方を吸収できる機会を持つことが難しかったらうと思大変心配していたところです。しかし、まだまだ感染者が多い中ではありますが、欧米をはじめとして日本でも徐々に様々な活動が再開されています。ペプチド学会関係でも、対面形式での学会が昨年6月に27th American Peptide Symposium / 11th International Peptide Symposium がカナダ・ウィスラーにて、8月末に36th European Peptide Symposium / 12th International Peptide Symposium がスペイン・シッチェスにて開催されました。

日本ペプチド学会の最も重要な活動である2022年度第59回ペプチド討論会も、東北大学の土井隆行先生と山形大学の今野博行先生のお世話により、3年ぶりに対面形式で10月26日～28日の日程でトークネットホール仙台（宮城県仙台市）にて開催されました。中国および韓国からの招待講演の先生方も含め、コロナパンデミック以前にもまして素晴らしい発表と活発な議論がなされ大成功の大会となりました。ポスター発表中やコーヒープレイク中にも会場内のあちこちで、久しぶりに会う人や初めて会う人との活気に溢れた会話が見受けられました。やはり、対面での討論会は非常に重要であると痛切に感じた次第です。改めて、まだまだ難しい状況の中、種々の対策をしていただいた上で素晴らしい討論会を開催していただきました土井先生、今野先生、また開催に携わっていただきました全ての方々に深く感謝申し上げます。



坂口 和靖

また、2022年度第54回若手ペプチド夏の勉強会では、東京薬科大学の田口晃弘先生、今野翔先生、谷口敦彦先生のお世話で8月8日～9日、東京都八王子市での開催を計画・準備していただいていたのですが、多く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まだ難しく、残念ながら今年度もオンラインでの開催となりましたが、国内から多くの若手研究者が集い大盛会となったとのことでした。

2022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、三原久和先生（東京工業大学）に選考過程の取りまとめを行っていただきました。この場をお借りして、三原先生に改めてお礼申し上げます。2022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、京都大学の二木史郎先生が「Peptides that affect membrane structure and permeability」の研究において受賞されました。総会にて授賞セレモニーが執り行われ、第59回ペプチド討論会にて、受賞内容について講演され、二木先生のこれまでの研究の深い理念をお聞きすることができました。

日本ペプチド学会学会賞ならびに奨励賞につきましても選考委員会による選考が行われました。学会賞は京都大学の松崎勝巳先生が、奨励賞は鳥取大学の岩崎崇先生と株式会社日本触媒の朝比奈雄也先生のお二人が受賞されました。総会にて受賞者の授賞セレモニー、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。松崎先生の「P・E・P・T・I・D・E」は若い人たちへの強いメッセージでありました。

第59回ペプチド討論会の JPS ポスター賞には、永原紳吾氏（東京農工大学）、南條毅氏（京都大学）、川口祥正氏（京都大学）、本間悠人氏（東北大学）、渡宗英氏（鳥取大学）、飯尾智裕氏（静岡大学）、高橋侑也氏（名古屋大学）、長澤遥斗氏（東北大学）、門田晃司氏（東京大学）が受賞されました。また、2022年度の JPS トラベルアワードは、36th EPS / 12th IPS に、坂口周弥氏（北海道大学）、岡本英之氏（東京薬科大学）の2名が受賞されました。将来のペプチド科学を担う若い皆様のますますの活躍を期待しております。

本年2023年度ペプチド討論会は、記念すべき第60回となります。長浜バイオ大学の向井秀仁先生と和歌山県立医科大学の相馬洋平先生のお世話により、11月8日～10日に滋賀県大津市で開催されます。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。記念回でもあり、より国際的な素晴らしい討論会となるよう学会としても向井先生、相馬先生のご支援をしていきたいと存じます。多くの皆様に琵琶湖でお会いできることを楽しみにしております。また、2023年度第55回若手ペプチド夏の勉強会は、河野健一先生（京都大学）が世話人代表として準備をしていただいております。夏の勉強会での経験とそこで作られる友人は、何にもまして得難い将来の財産となります。積極的な参加と活動、討論を期待します。

2023年の日本ペプチド学会においては、新型コロナウイルスの感染の状況に対応しつつも、さらに活気ある活動、会員の皆様の役に立つ活動を行っていき、国際的かつ分野の広がりを見据えながら学会活動を皆様と共に進めていきたいと存じます。

最後になりましたが、2023年が皆様方にとって、ますますの健康と研究の大なる飛躍の年となりますようお祈りいたします。

（ さかぐち かずやす
第17期日本ペプチド学会会長
北海道大学 大学院理学研究院 化学部門 ）

第59回ペプチド討論会の開催報告

第59回ペプチド討論会が2022年10月26日から28日までの3日間にわたり開催されました。対面での開催は3年ぶりになります。参加登録者数は404名となり、発表件数は受賞講演4演題、招待講演（海外）3演題、一般口頭発表25演題、若手口頭発表24演題（うち海外2演題）、およびポスター発表146演題（うち海外1演題）の計202演題となりました。多くの方に発表申し込みをいただき誠にありがとうございました。口頭発表については多数の申し込みをいただきましたため、一研究室一演題とさせていただきます。

皆様が対面での学会を待ち望んでいた思いが伝わってきました。また、企業・財団から多くのご支援を頂戴しました。寄付7件、協賛1件、要旨集広告15件、ウェブサイトバナー広告8件、ランチョンセミナー3件、および機器展示24件でした。お陰をもちまして討論会を滞りなく準備、開催することができましたこと非常に嬉しく思います。実行委員を代表して厚く御礼申し上げます。今回は、新型コロナウイルスの感染拡大を防止するため、懇親会の開催は見合わせました。ご参加くださった皆様が一堂に会する交流の場を提供できなかったことを申し訳なく思います。



土井 隆行



今野 博行

本討論会では1日目に韓国ペプチドタンパク質学会（KPPS）との交流活動として、新進気鋭の Sunbum Kwon 先生（Chung-Ang Univ）と Young-Hee Shin 先生（Tech Univ Korea）に講演していただきました。また、若手口頭発表とポスター発表を行いました。2日目には一般口頭発表、総会、ポスター発表を行いました。また、3日目には Xuechen Li 先生（Univ Hong Kong）に招待講演をお願いし、独自に開発した Ser/Thr ライゲーション法を活用していくもののタンパク質合成を実現している素晴らしい研究成果についてご紹介いただきました。海外からの招聘について当初は ERFS（入国者フォローアップシステム）を介したビザの手続きが必要で、お忙しい中、先生方は心よく手続きを行なって来日くださったこと誠にありがたく思っております。さらに3日目には Akabori Memorial Award 2022 を受賞された二本史朗先生（京大化研）に受賞講演をしていただきました。また、2022年日本ペプチド学会奨励賞の受賞者である岩崎崇先生（鳥取大）と朝比奈雄也先生（日本触媒）、および学会賞の受賞者である松崎勝巳先生（京大）に受賞講演をしていただき、閉会となりました。終始熱のこもった質疑応答が行われ、参加者の皆様には最新の研究成果を目の当たりにしてアイデア・活力が湧いてきたのではないかと思っております。

若手口頭発表の中から、最優秀賞（Excellent Stone Award）が栗山理志さん（京大）に、優秀賞（Good Stone Award）が中谷勇登さん（大阪府大）、柴垣光希さん（北大）、小野高広さん（東大）、藤田慧さん（北大）に、Mimotopes Award が林隼矢さん（徳島大）に授与されました。また、ポスター発表の中から9演題がポスター発表優秀賞に選ばれました。受賞者は、永原紳吾さん（東京農工大）、南條毅さん（京都大）、川口祥正さん（京都大）、本間悠人さん（東北大）、渡宗英さん（鳥取大）、飯尾智裕さん（静岡大）さん、高橋侑也さん（名大）、長澤暉斗さん（東北大）、門田晃司さん（東大）です。

来年度第60回は、長浜バイオ大学・向井秀仁先生、和歌山県立医科大学・相馬洋平先生のお世話で2023年11月8日（水）～10日（金）の3日間にわたり、滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール、ピアザ淡海にて開催されます。次回、皆様にお目にかかれることを心待ちにしております。末筆ながら、皆様のご健勝と研究の益々のご発展を祈念いたします。

（ どい たかゆき
東北大学 薬学研究科
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
konno@yz.yamagata-u.ac.jp ）

2022年度日本ペプチド学会賞受賞に際して

この度は、私の「脂質によるペプチド・タンパク質の構造・機能制御機構の解明」の研究に対し、名誉ある日本ペプチド学会賞を受賞することができ、大変光栄に存じます。まずは選考の労をお取りいただきました委員各位に御礼申し上げます。本受賞に当たりましては、多くの先生、共同研究者の方々にお世話になりました。ここに深謝致します。

私は1982年に京都大学薬学部薬学科を卒業し、1984年に京都大学大学院薬学研究科修士課程を終了しました。この間、薬品物理化学講座にて、故中垣正幸先生、半田哲郎先生に師事し、化学熱力学や分光学を学びました。また、学生時代より杉浦幸雄先生、故寺田弘先生の薫陶を受けました。大学院終了後は、製薬企業に3年半勤務し、製剤の現場を経験しました。縁あって、1987年に中垣先生の後任の故宮嶋孝一郎先生の助手に採用されました。このとき新しいプロジェクトとしてペプチドと膜の相互作用研究をスタートさせました。同じ学部の故藤多哲朗先生からは、イオンチャネルを形成するpeptibol数種を、藤井信孝先生からは当時発見されたばかりの抗菌性ペプチドmagaininsなどを提供していただきました。藤井先生には、その後も長きにわたり研究をサポートしていただきました。幸い短期間でこれらのペプチドと脂質膜との相互作用についてデータが出始め、研究成果を初めて1990年の第28回ペプチド化学討論会(当時の名称)で発表することができたのが、日本ペプチド学会(当時は学会発足前でしたが)での活動のスタートとなりました。学会では岡田芳男先生にいつも暖かく見守って頂きました。討論会には同世代のアクティブな先生が多数おられ、まさに切磋琢磨しながら、刺激を受けてきました。1992年には筆頭著者の論文5報をまとめ、京都大学博士(薬学)の学位を取得することができました。

幸運にも学位取得直後に文部省在外研究員制度によって、10ヶ月の間、スイス・バーゼル大学バイオセンターに留学する機会を得ました。Joachim Seelig教授に師事し、固体NMRや等温滴定カロリメトリーなどを用いて、生物物理の基礎を学びました。

帰国後は、抗菌性ペプチドに加えて、アルツハイマー病の原因とされるアミロイドβペプチド(Aβ)と脂質膜との相互作用の研究をスタートさせました。1997年には助教授を拝命し、1999年には新設の生命科学研究所へ異動し、糖生化学がご専門の小堤保則先生に師事しました。1995年に当時東大におられた柳澤勝彦先生が、Aβが糖脂質であるGM1と結合することを報告されていたので、小堤先生に糖脂質のことを教えていただきながら、柳澤先生とともにAβ-GM1相互作用研究を進めていきました。もう一つのプロジェクトとして、膜貫通ヘリックス間の相互作用研究を開始したのもこの頃です。2003年には、



松崎 勝巳

薬学研究科へ教授として戻り、新たに膜タンパク質研究も立ち上げました。これらの新テーマには、矢野義明博士や河野健一博士が中心的な役割を果たしてくれました。これら4つのテーマ(抗菌性ペプチド、Aβ、膜貫通ヘリックス、膜タンパク質)が当研究室のメインテーマとなっています。

多くの共同研究者の努力のお陰で、本受賞に加え、1996年に日本ペプチド学会奨励賞、1997年に日本薬学会奨励賞、2011年にベルツ賞1等賞(柳澤勝彦先生、加藤晃一先生と共同受賞)、2021年に日本薬学会賞を受賞することができました。また、Gordon Research Conferenceをはじめとする多くの国際会議で招待講演をさせて頂くという栄誉にも恵まれました。以下に、主な研究成果を述べます¹。

1. 抗菌性ペプチド

抗菌性ペプチドは先天性免疫機構の一部としてヒトを含むあらゆる動植物で産生され、これまでに3000種以上が発見されており、医薬への応用が期待されています²。これらはアミノ酸15~50残基程度からなり、その二次構造も様々ですが、LysやArgを多く含むカチオン性であると同時に、疎水性アミノ酸も含んでおり両親媒性を有しています。ヒト細胞に比べ、細菌の表面はより負に帯電しているため、抗菌性ペプチドは細菌に選択的に作用することができます³。多くのペプチドは、細菌細胞膜の透過性を亢進させ殺菌効果を示します。我々は、脊椎動物から初めて単離された抗菌性ペプチドであるアフリカツメガエル由来のmagainin 2が図1に示すような新規メカニズムで膜透過性を亢進させることを世界に先駆けて解明し⁴、このメカニズムはThe Shai-Matsuzaki-Huang Modelと呼ばれています。その後の研究により、magainin 2のみならず、PGLa⁵、mastoparan X⁶、tachyplesin I⁷も同じメカニズムで膜透過性を亢進させることが明らかになりました。興味深いことに、同じ由来のmagainin 2とPGLaのヘリックスは1:1で平行型ヘテロダイマーを形成し、高い相乗効果を発揮します^{5,8-10}。また、buforin 2はポア寿命が短いため、ほとんど膜透過性を亢進させることなく細菌内に侵入し、核酸に結合して抗菌力を発揮することも見出しました¹¹。

抗菌性ペプチドがほとんど負電荷を持たないヒト細胞膜に結合する際には疎水性相互作用が主な駆動力になります。そこで、magainin 2の両親媒性ヘリックスの疎水面にProを複数導入して疎水面を破壊し、同時に正電荷を増大させて静電相互作用を増強することによって、治療係数を向上させることができます¹²。また、グラム陰性菌の外膜を通りにくい抗生物質ampicillinに膜透過性のある抗菌性ペプチドをSS結合でconjugateすることにより、抗菌性が大きく向上することも見出しました¹³。

がん細胞表面は正常細胞より負に帯電しているため、抗菌性ペプチドはがん細胞選択性を示します¹⁴。また、がん組織は正常組織に比べpHが低下しているため、塩基性アミノ酸としてLysの代わりにpKa=6.3である2,3-diaminopropionic acidを用い

ることで、弱酸性で抗がん活性が高くなるペプチドを創製することができました¹⁵。

2. アミロイドβペプチド

老年性認知症の大部分を占めるアルツハイマー病は、主に 40 ~ 42 残基からなるアミロイドβペプチド (Aβ) が異常凝集し脳に沈着することによって、神経損傷を起こすことで発症すると考えられています。我々は柳澤先生らの報告に基づき、Aβ と GM1 の相互作用を研究し、図 2 に示すような新規メカニズムを解明しました¹⁶。Aβ は自己凝集し、オリゴマーを経て最終的にアミロイド線維を形成しますが、そのメカニズムは、水中と膜中では全く異なります。水中凝集ではオリゴマーが神経毒性を示すのに対し、膜中凝集ではアミロイド線維が毒性を示します¹⁷。また、線維の構造も異なり、水中凝集では in-resister parallel β-sheet であるのに対し、膜中凝集では in-resister parallel と 2 残基ずれの antiparallel β-sheet の混合構造となります¹⁸。2 残基ずれの antiparallel β-sheet 構造は 4 つの salt bridge と 19, 20 番目の Phe による π-π 相互作用により安定化されます^{18,19}。また、この毒性型線維によるアポトーシスのメカニズムも明らかにしました²⁰。

3. 膜貫通ヘリックス

膜タンパク質の膜貫通部の多くはヘリックスを形成しています。従って、膜貫通ヘリックス間の相互作用は、膜タンパク質の構造形成や膜タンパク質同士の会合形成に重要な役割を果たします。膜貫通ヘリク

ス間相互作用の熱力学量を計測し、周りの脂質組成がどのような影響を与えるかを調べるため、モデル膜貫通ヘリックス (ALAAALA)₃ をデザイン・合成しました。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して、このヘリックスの逆平行型 2 量体形成の自由エネルギーを種々の温度で計測しました (図 3)。その結果、2 量体形成のエンタルピーは (-23.7 kJ mol⁻¹)、ヘリックスのマクロ双極子間の相互作用の計算値 (-23 kJ mol⁻¹) と一致しました。膜が厚いほど 2 量体形成が促進されましたが、これはヘリックス末端の部分電荷がより低極性の環境になるためと説明されます²¹。また、一分子計測技術を用いて、1 つの脂質ベシクルに組み込んだ 2 本の平行なヘリックスの会合を計測しました。(ALAAALA)₃ では、平行なマクロ双極子間の反発により 2 量体形成は起こりませんが、中央に会合モチーフである GXXXG を入れることにより、2 量体形成が観測されました。興味深いことに、コレステロール添加により、2 量体形成は阻害されました²² (図 3)。一方、会合モチーフを延長して AALALAA AGLALGA AAGALAA とすると、逆にコレステロール存在下でのみ 2 量体形成が起こりました²³。このように、膜貫通ヘリックスの会合には、アミノ酸配列と脂質組成の双方が影響することが分かりました。

4. 膜タンパク質

生きている細胞中で膜タンパク質同士の会合を評価するコイルドコイル標識法も確立しました。目的タンパク質の N 末端に E3 タグ (KIAALKE)₃ を遺伝子上で融合して細胞に発現させ、蛍光標識した K4 プロー

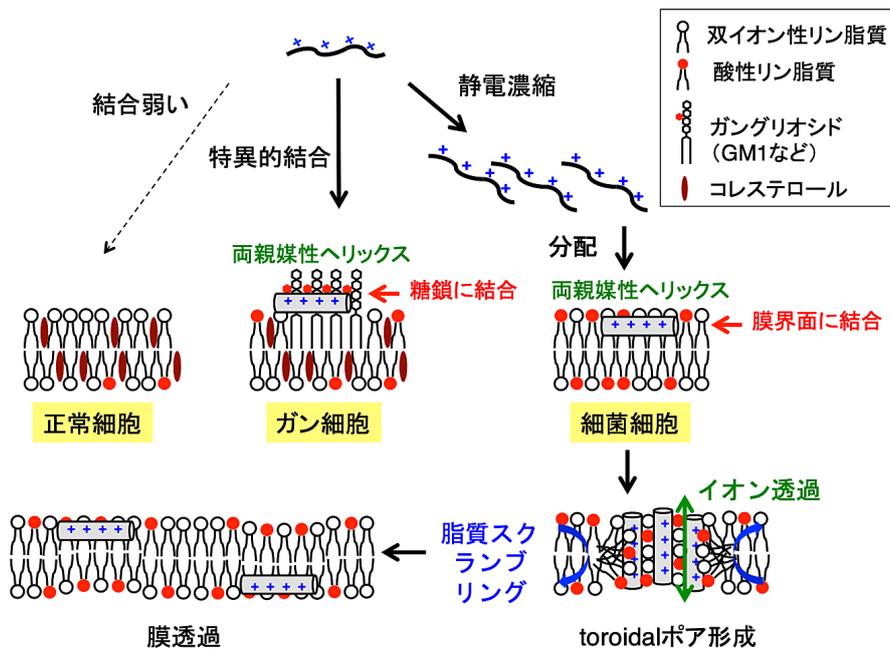


図 1 抗菌性ペプチドと膜との相互作用。カチオン性の抗菌性ペプチドは、負電荷に富む細菌細胞膜上で静電濃縮された後、膜に分配し、界面付近で両親媒性構造を形成する。これに伴う物理的ストレスにより、脂質を巻き込んだ toroidal ポアを形成し、イオン透過と脂質スクランブリングを惹起する。ポア崩壊時に一部のペプチドは内在化する (右)。一方、負電荷の少ないヒト正常細胞への結合は弱い (左)。がん細胞表面は GM1 などの発現により負電荷を有しているため、抗菌性ペプチドは糖鎖部分に特異的に結合する (中)。

ブ (KIAALKE)₄ を添加することによって、細胞表面の目的タンパク質を蛍光標識する方法です²⁴ (図 4)。E3-K4 間の K_d 値は数 nM で、標識は 1 分以内に完結します。この方法を in-cell FRET と組み合わせることにより、膜タンパク質が何量体を作っているかを正確に評価できます²⁵。クラス A の G タンパク質共役型受容体が単量体で存在していること²⁶、従来 4 量体を形成するとされていた A 型インフルエンザ M2 タンパク質は、pH 中性 → 酸性の変化に伴い 2 量体 → 4 量体と変化すること²⁷、2 量体のスタンダードとされているグリコフォリン A が細胞膜中では単量体で

存在し、コレステロール除去により 2 量体化することなどを見出しました²⁸。

おわりに

以上のように、ペプチド・タンパク質の構造や機能は脂質種により大きな影響を受けることを明らかにすることができました。

日本ペプチド学会での活動としましては、現在を含め理事を 4 期務めさせていただいておりますが、2018 年に二木史朗先生と 10th IPS のお世話をさせていた

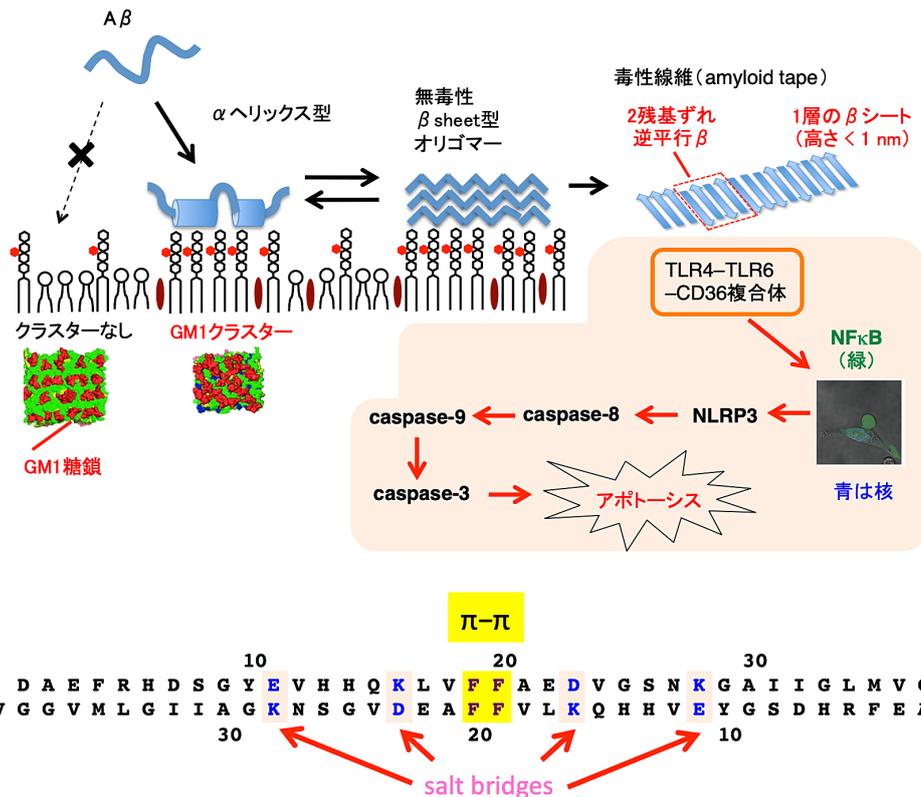


図 2 (上) 神経細胞膜上での Aβ の凝集・毒性発現機構。GM1 がクラスターを形成していないときには、Aβ は膜に結合しない。一方、GM1 がコレステロール依存的にクラスターを形成すると Aβ は膜に結合し、はじめは α ヘリックスに富む構造をとるが、結合量の増大に伴い、Aβ 約 15 分子からなるオリゴマーを形成する。しかし、この時点では細胞毒性はない。さらに結合量が増大すると、1 層の β シートからなるテープ状のアミロイド線維が形成され、これが TLR4-TLR6-CD36 複合体に認識され、アポトーシスを引き起こす。(下) 2 残基ずれの antiparallel β-sheet 構造。4 つの salt bridge と π-π 相互作用で安定化される。

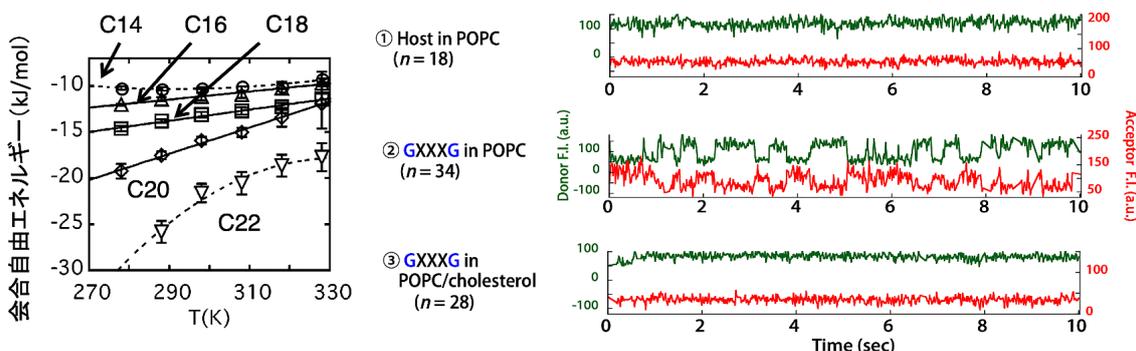


図 3 モデル膜貫通ヘリックスの会合。種々の厚さの膜中での逆平行型 2 量体形成の自由エネルギー (左) と一分子計測による平行型 2 量体形成に及ぼす会合モチーフとコレステロールの影響 (右)。

だいた程度で、あまり貢献できておりません。唯一学会への貢献としましては、PNJ100号の故木村皓俊先生の稿にもありますように、発表の英語化です。日本ペプチド学会は早くから green book の出版や発表スライド・ポスターの英語化をしてきましたが、発表そのものは日本語でした。若い頃より国際会議に参加していました私は、何とかペプチド討論会での発表を英語化できないかと思っていました。木村先生も常々同じことを仰っておられましたので、2002年の神戸でのペプチド討論会の懇親会（神戸港のクルーズ船内）で、思い切ってその旨を木村先生にお伝えしました。そのやり方について相談させて頂いた結果、学会発表の申込時に発表言語（英語 or 日本語）を選べるようにするのがよいのではという結論に達しました。早速、翌年の世話人である植木彬先生のもとに伺い、この提案をさせて頂き、ご快諾いただきました。最初は私の発表するセッションのみが英語でしたが、3年もするとほとんどの発表が英語となり、現在の形ができあがりました。今では英語発表をする国内学会も多くなりましたが、日本ペプチド学会は先駆的な取り組みができた訳です。本年より、木曾良明先生の後を受け、EPSの公式ジャーナルである Journal of Peptide Science の Editor を務めさせて頂いており、EPSをはじめ世界中のペプチド研究者とコミュニケーションをとる機会が増えました。こうしたネットワークも活かしつつ、今後も微力ながら日本ペプチド学会の発展に寄与できればと思っておりますので、よろしくお願いいたします。

主要文献

- Matsuzaki, K. Chem Pharm Bull 2022, 70, 1–9.
- Matsuzaki, K. Antimicrobial Peptides: Basics for Clinical Application; Springer, 2019.
- Matsuzaki, K. Biochim Biophys Acta 2009, 1788, 1687–1692.
- Matsuzaki, K. et al. Biochemistry 1996, 35, 11361–11368.
- Matsuzaki, K. et al. Biochemistry 1998, 37, 15144–15153.
- Matsuzaki, K. et al. Biochemistry 1996, 35, 8450–8456.
- Imura, Y. et al. Biochim Biophys Acta 2007, 1768, 1160–1169.
- Hara, T. et al. Biochemistry 2001, 40, 12395–12399.
- Nishida, M. et al. Biochemistry 2007, 46, 14284–14290.
- Haney, E.F. et al. Biochim Biophys Acta 2009, 1788, 1639–1655.
- Kobayashi, S. et al. Biochemistry 2004, 43, 15610–15616.
- Azuma, E. et al. ACS Infect Dis 2020, 6, 2271–2277.
- Yamauchi, R.; Kawano, K. et al. ACS Infect Dis 2022, 8, 2339–2347.
- Miyazaki, Y. et al. Biochemistry 2012, 51, 10229–10235.
- Tanishiki, N. et al. ChemBioChem 2019, 20, 2109–2117.
- Matsuzaki, K. Biochim Biophys Acta 2020, 1862, 183233.
- Itoh, N. et al. ChemBioChem 2018, 19, 430–433.
- Okada, Y. et al. ACS Chem Neurosci 2019, 10, 563–572.
- Genji, M. et al. Chem Pharm Bull 2017, 65, 668–673.
- Takada, E. et al. ACS Chem Neurosci 2020, 11, 796–805.
- Yano, Y.; Matsuzaki, K. Biochemistry 2006, 45, 3370–3378.
- Yano, Y. et al. Angew Chem Int Ed 2017, 56, 1756–1759.
- Yano, Y. et al. ChemBioChem 2022, 23, e202200160.
- Yano, Y. et al. ACS Chem Biol 2008, 3, 341–345.
- Kawano, K. et al. Anal Chem 2013, 85, 3454–3461.
- Kawano, K. et al. J Pept Sci 2017, 23, 650–658.
- Kawano, K. et al. J Mol Biol 2014, 426, 2679–2691.

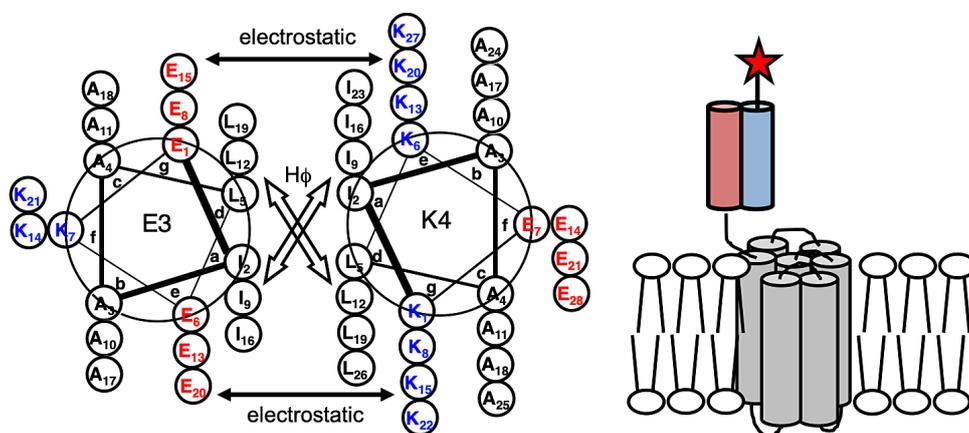


図4 コイルドコイル標識法の原理

28. Yano, Y. et al. Biopolymers (Pept Sci) 2016, 106, 484–490.

まつざき かつみ
 京都大学 大学院薬学研究科
 薬品機能解析学分野
 mkatsumi@pharm.kyoto-u.ac.jp
<https://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/yakkai/>

令和四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まして、誠に光栄に存じます。学会長の坂口和靖先生をはじめ、副会長の三原久和先生および理事、監事、評議員ならびに選考委員の先生方に深く感謝を申し上げます。本稿では受賞研究である「ポリヒスチジンペプチドの発見と応用研究」につきまして概説させていただきます。



岩崎 崇

1. はじめに

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

2. ポリヒスチジンペプチドの発見

一方で話は変わりますが、腫瘍組織では無秩序な血管・組織形成が行われるため、その内部が低酸素状態 (Hypoxia) にあることが知られています。ゆえに、腫瘍組織の内部では嫌気呼吸が亢進し、酸性代謝産物

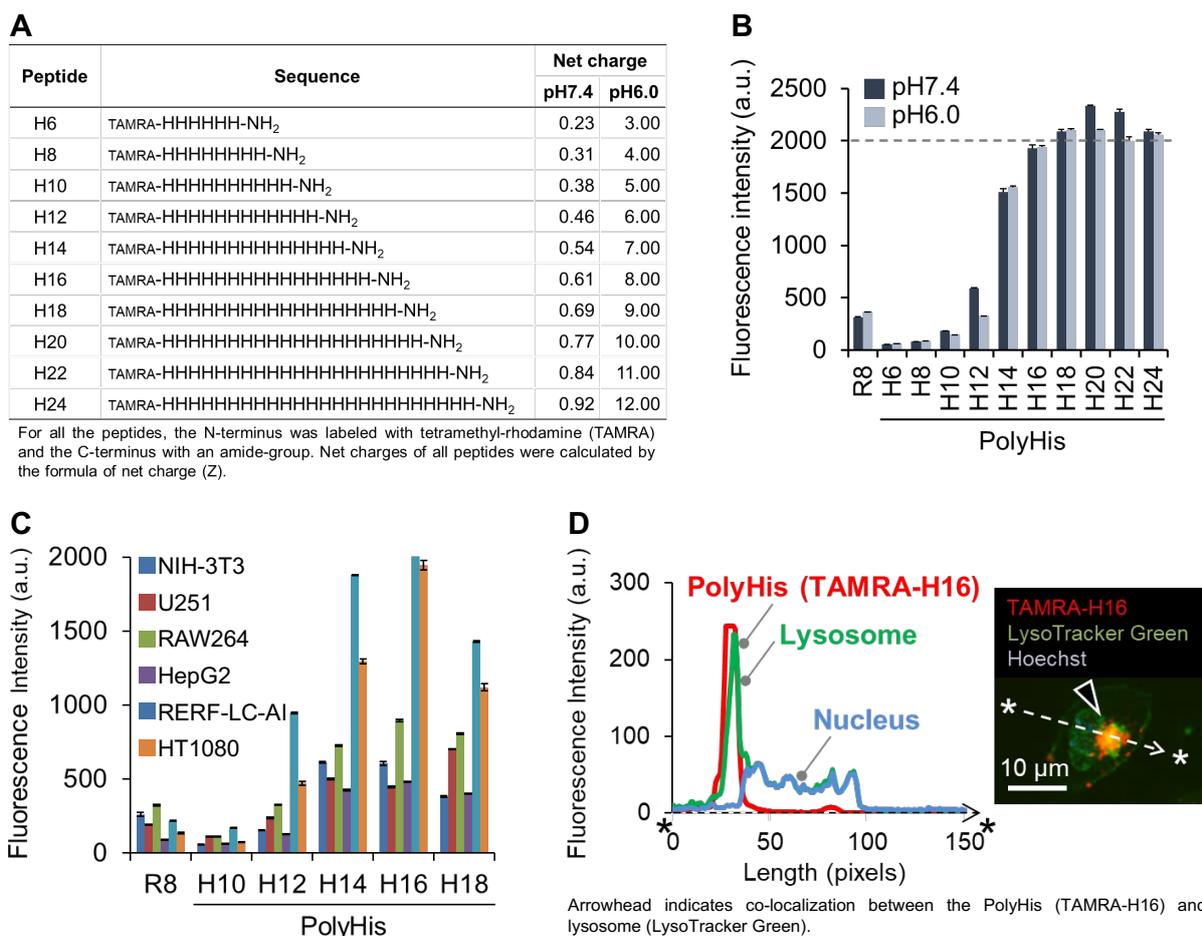


図1 (A) 本研究で使用した PolyHis の配列と生理的 pH 条件 (pH 7.4) および低 pH 条件 (pH 6.0) における電荷。(B) pH 7.4 および pH 6.0 における HepG2 (ヒト肝癌細胞株) に対する PolyHis の細胞膜透過。(C) さまざまな細胞株における PolyHis の細胞膜透過。(D) HT1080 (ヒト線維肉腫細胞株) における PolyHis の細胞内分布。核およびリソソームは Hoechst および LysoTrackerGreen で染色した。文献 7 を改変して掲載。

が蓄積していることが分かっています。そのため、腫瘍組織内部は低 pH (弱酸性) 環境にあることが知られています^{5,6}。近年では、この腫瘍組織内部の微小環境である低 pH 環境を標的とした薬物輸送技術の開発が盛んに進められています。

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

最初に、HepG2 (ヒト肝癌細胞株) を用いて、生理的 pH 条件 (pH 7.4) と低 pH 条件 (pH 6.0) における PolyHis の細胞膜透過を調べました。その結果、面白いことに、PolyHis を構成するヒスチジン残基数が増えるにしたがって PolyHis の細胞膜透過能は上昇し、ヒスチジン 16 残基 (H16 peptide) においてピークに到達することが明らかになりました。さらに予想外であり、かつ極めて興味深いことに、PolyHis の細胞膜透過は生理的 pH 条件 (pH 7.4) および低 pH 条件 (pH 6.0) において、ほとんど差がないことが分かりました (図 1B)。PolyHis は生理的 pH 条件 (pH 7.4) ではほとんど正電荷を帯びない一方で、低 pH 条件 (pH 6.0) においては高い正電荷を帯びるペプチドです。しかし、pH 条件 (正電荷の有無) に関係なく、PolyHis は細胞膜透過を示したことから、PolyHis は正電荷に依存しない CPP であることが明らかになりました。すなわち、低 pH 選択的な PolyHis を開発するという当初の目的は果たせませんでした。従来 CPP とは異なる新しいタイプの CPP として PolyHis を発見するに至りました⁷。

続いて、PolyHis の細胞選択性を明らかにするため、当研究室で保有している様々なヒト培養細胞株を用いて実験をしてみたところ、PolyHis は RERF-LC-AI (ヒト扁平上皮肺癌細胞株) や HT1080 (ヒト線維肉腫細胞株) といった比較的付着性の高い細胞株に対して、特に高い細胞膜透過を示すことが分かりました (図 1C)。また、PolyHis (H16 peptide) の細胞内局在を調べてみたところ、PolyHis (H16

peptide) は細胞膜を透過した後にリソソームに局在することが分かりました (図 1D)。そこで以降の研究では、H16 peptide を代表的な PolyHis として用い、H16 peptide を利用したリソソーム標的型 DDS の開発に挑戦しました。

3. リソソーム標的型 DDS 開発の意義

リソソームは、生体分子を消化・再利用し、細胞の恒常性を維持するために不可欠なオルガネラです。約 60 種類のリソソーム酵素が、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質などの生体高分子の加水分解に関与しています。一方で、リソソーム酵素をコードする遺伝子の変異は、リソソーム病 (Lysosomal storage disease, LSD) と呼ばれるヒト遺伝性疾患の原因になることが知られています。LSD は、特定のリソソーム酵素の欠損によって引き起こされる代謝異常であり、様々な神経変性疾患、心血管老化関連疾患、および癌と関連しています^{8,9}。

現在の LSD に対する治療法として、リソソーム中で欠損している酵素を、組換え酵素として細胞外部から補充する「酵素補充療法 (Enzyme replacement therapy, ERT)」が主流となっています^{10,11}。ERT に使用される組換えリソソーム酵素は、リソソーム内へ輸送するために、高密度のマンノース-6-リン酸 (M6P) で修飾される必要があります¹²。M6P 修飾されたリソソーム酵素は、細胞表面の M6P 受容体に結合し、後期エンドソームを介して細胞内リソソームへと輸送されることが知られています¹³。このように、従来の ERT では、組換えリソソーム酵素の M6P 修飾が必須条件であるのですが、残念ながら M6P 修飾リソソーム酵素の効率的な発現系は、一部のリソソーム酵素についてしか存在していません。そのため、現在 50 種類以上のリソソーム酵素が同数の LSD と関連していることが知られている一方で、米国食品医薬品局 FDA で承認されている ERT 用の組換えリソソーム酵素はわずか 9 種類 (12 薬剤) に限定されています。

そこで我々は、上記の問題を解決するために、PolyHis を DDS キャリアーとして利用した ERT の開発を試みました。前述の通り、PolyHis (H16 peptide) は、細胞膜透過した後にリソソームに効率的に集積することから、H16 peptide はリソソームを標的とした DDS キャリアーとして有力であるとともに、M6P 修飾非依存的な ERT を実現するためのリソソーム酵素キャリアーとして期待できます。これまでに我々は、H16 peptide を用いた簡便な (M6P 修飾非依存的な) ERT を開発しましたので、以下に紹介させていただきます。

4. リソソーム酵素結合型 H16 peptide を使った ERT の開発

我々は、リソソーム酵素を簡便に細胞内へ導入し、リソソームに集積させることを目指し、リソソーム標的型 DDS キャリアーである H16 peptide をリソソーム酵素に対して簡便に修飾する方法を考案しました。具体的には、リソソーム酵素の大部分が酸性タンパク質であることに着目し、H16 peptide をリソ

ソーム酵素に静電相互作用により容易に結合させる方法を開発しました。正電荷を帯びたポリリジン配列 (K10) と細胞膜透過能およびリソソーム集積能を有する H16 peptide を連続させた K10GH16 peptide (KKKKKKKKKKGGHHHHHHHHHHHHHHHHHH-NH₂) を設計し、混合するだけで酸性リソソーム酵素と結合する方法を考案しました (図 2)。本手法では、M6P 修飾されていない酸性リソソーム酵素に対しても簡単に H16 peptide を結合させることができるため、広範囲の酸性リソソーム酵素を M6P 修飾非依存的にリソソームへ輸送することが可能であると考えられます。実際に、我々は酸性リソソーム酵素の一種である α -galactosidase A (GLA) をモデル酵素として使用し、GLA と K10GH16 peptide と混合するだけで、M6P 修飾非依存的な細胞膜透過・リソソーム導入を実証しています¹⁴。具体的には、LSD の一種である GLA 欠損細胞に対して GLA-K10GH16 peptide 複合体を細胞外から投与することで、GLA 欠損細胞内のリソソームに GLA を輸送できること、さらに GLA 欠損細胞の表現型 (正常細胞よりも遅い細胞増殖) を回復させることに成功しています。これらの結果は、K10GH16 peptide が LSD 細胞のリソソーム酵素の不足を補うことを示唆するとともに、K10GH16 peptide は、M6P 修飾非依存的 (すなわち簡便な) ERT 用の DDS キャリアーとして有用であることを示しています。

5. リソソーム酵素内包型 H16 peptide 修飾リポソームを使った ERT の開発

前述の通り、我々は K10GH16 peptide を利用した M6P 修飾非依存的な ERT を開発しました。しかしこの手法は、一度に多数のリソソーム酵素を輸送するには不向きであるという問題点も有していました。そこで次に我々は、一度に多数のリソソーム酵素を輸送できる手法を開発するべく、H16 peptide を修飾したリポソームをキャリアーとした ERT の開発

を目指しました (図 3)。この手法では、M6P 修飾されていないリソソーム酵素である GLA を内包したリポソーム {Liposome (GLA)} を調製し、さらに N 末端にステアシル基 (CH₃(CH₂)₁₆CO-) を導入した H16 peptide (Stearl-H16 peptide) をリポソーム表面に修飾することで、H16 peptide 修飾した GLA 内包リポソーム {H16-Liposome (GLA)} を調製しました。この H16-Liposome (GLA) は、GLA 欠損細胞に対して細胞膜透過を示し、GLA 欠損細胞内のリソソームに集積することが確認されました。さらに、H16-Liposome (GLA) は GLA 欠損細胞の低下した細胞増殖を回復させる効果も示しました。この結果から、リソソーム酵素を内包した H16-Liposome は、LSD 細胞のリソソーム酵素の不足を補うことが可能であることが示唆されました。特に、M6P 修飾されていないリソソーム酵素であっても、H16-Liposome に内包することで LSD 細胞のリソソームへ輸送できることから、H16-Liposome は K10GH16 peptide と同様に M6P 修飾非依存的な ERT 用 DDS キャリアーとして利用可能であることが示されました。さらに H16-Liposome を利用した本手法は、一度に多量のリソソーム酵素を補充できる ERT の基盤技術になり得ると期待されます¹⁵。

6. H16 peptide 修飾リソソームを使った ERT の開発

ここまでに、我々は K10GH16 peptide や H16 peptide 修飾リポソームを利用した M6P 修飾非依存的なリソソーム酵素の DDS を開発してきました。しかしながら、これらの手法は組換えリソソーム酵素を利用するという共通点を有しているため、組換えタンパク質として入手可能なリソソーム酵素以外には利用できないといった問題点がありました。前述のように、リソソーム病に関与しているリソソーム酵素は 50 種類以上存在していますが、M6P 修飾の有無にかかわらず、組換え酵素として入手可能なリソ

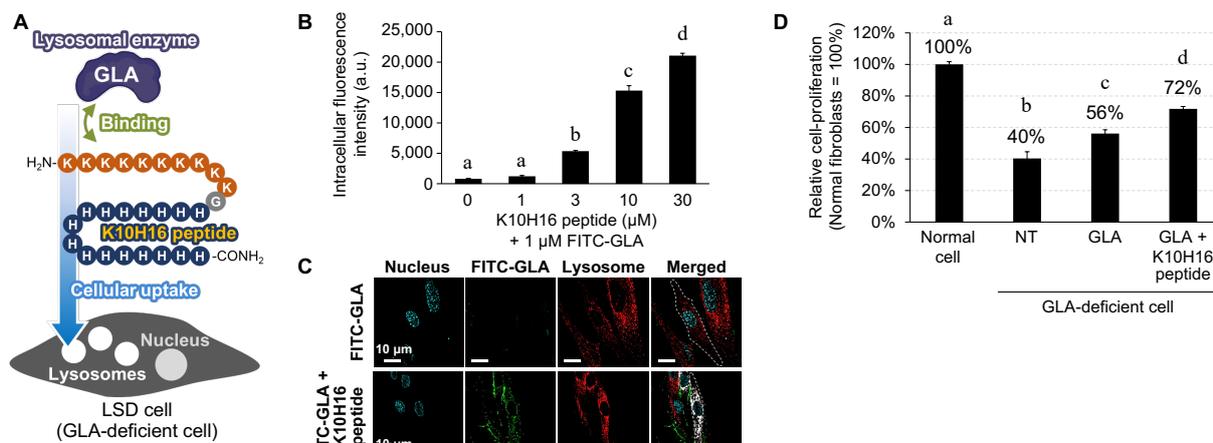


図 2 (A) K10GH16 ペプチドを利用したリソソーム標的型 DDS のスキーム。(B) FITC-GLA (1 μM) と混合した K10GH16 ペプチド (1 ~ 30 μM) の GLA 欠損細胞における細胞内取り込み。FITC-GLA-K10GH16 ペプチド複合体の細胞内取り込みはフローサイトメーターにて定量した。(C) FITC-GLA (1 μM) と K10GH16 ペプチド (30 μM) の複合体の GLA 欠損細胞内の分布。白色スポットは、FITC-GLA と細胞内リソソームの共局在を示す。破線は細胞膜の輪郭を示す。(D) GLA 欠損細胞に対する GLA-K10GH16 ペプチド複合体の ERT 効果。GLA (1 μM) 単独、または GLA (1 μM) と K10GH16 ペプチド (30 μM) の複合体存在下で GLA 欠損細胞を 72 時間培養し、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞増殖率を定量した。NT は未処理区を示す。データは平均値 ± S.D. を表す。異なる文字は有意差を示す ($p < 0.05$, Turkey's test)。文献 14 を改変して掲載。

ソーム酵素はごく一部に限られています。すなわち、K10GH16 peptide や H16 peptide 修飾リソソームを利用した ERT でも同様に、輸送可能なリソソーム酵素が限定されるといった問題点が存在していました。そこで、これらの問題点を克服し、組換え酵素として存在しないリソソーム酵素も輸送可能な ERT を開発するために、我々はリソソームそのものを丸ごと、LSD 細胞内へ導入する手法を考案しました (図 4)。LSD 細胞内へリソソーム酵素を輸送する手法は酵素補充療法 (Enzyme replacement therapy, ERT) と呼ばれていますので、我々はリソソームそのものを

丸ごと LSD 細胞内へ輸送する手法をオルガネラ補充療法 (Organelle replacement therapy, ORT) と命名し、その開発を試みました。原理としては非常にシンプルでありまして、前述のリポソームの代わりに、ヒト正常細胞から単離した正常なリソソーム (リソソーム酵素を全て保有しているリソソーム) に Stearyl-H16 peptide を修飾した H16 peptide 修飾リソソーム (H16-Lysosome) を調製して、LSD 細胞内へ導入するというものです。前述のリポソームは粒径が約 100 nm のものを使用していたのに対して、単離リソソームは粒径が約 500~1,000 nm にな

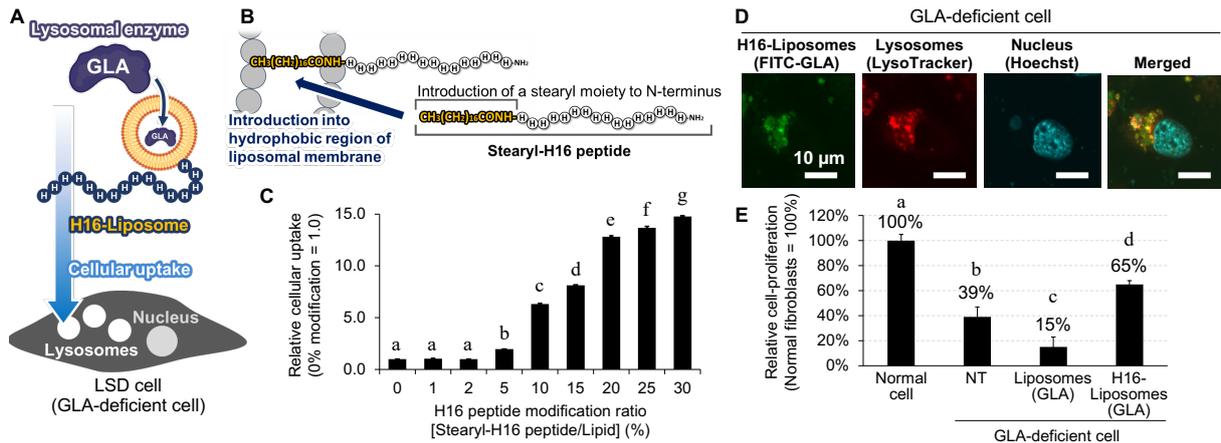


図 3 (A) H16-Liposome を利用したリソソーム標的型 DDS のスキーム。(B) H16-Liposome の調製スキーム。脂質フィルム {Dioleoylphosphatidylcholine : Cholesterol = 10 : 1 (mol/mol)} を FITC-GLA を含む緩衝液で水和し、超音波処理によりリポソームを形成した。調製したリポソームを Mini-Extruder (Avanti) を用いて約 100 nm の粒径に調整し、ゲルろ過カラムを用いて精製した。最後に、リポソームの疎水性領域に Stearyl-H16 ペプチドを導入した。(C) リポソーム表面の Stearyl-H16 ペプチド修飾比率と細胞膜透過。Stearyl-H16 ペプチドは、リン脂質 (Dioleoylphosphatidylcholine) に対して 0~30 mol% でリポソーム表面に修飾した。H16-Liposome の細胞取り込みは、フローサイトメーターにて定量した。(D) H16-Liposome (FITC-GLA) の GLA 欠損細胞内の分布。(E) GLA 欠損細胞に対する H16-Liposome (GLA) の ERT 効果。Liposome (GLA) または H16-Liposome (GLA) 存在下で GLA 欠損細胞を 72 時間培養し、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞増殖率を定量した。NT は未処理区を示す。データは平均値 ± S.D. を表す。異なる文字は有意差を示す ($p < 0.05$, Turkey's test)。文献 15 を改変して掲載。

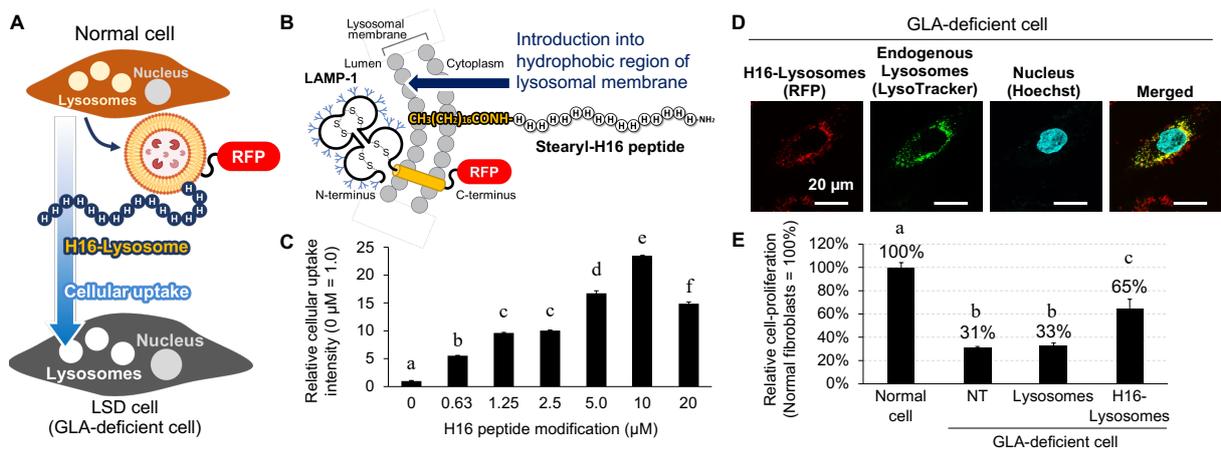


図 4 (A) H16-Lysosome を利用したリソソーム標的型 DDS のスキーム。(B) H16-Lysosome の調製スキーム。リソソーム膜タンパク質である LAMP-1 に RFP を融合発現したヒト細胞を構築し、この細胞より単離した RFP 発現リソソームの膜疎水性領域に Stearyl-H16 ペプチドを導入した。(C) 単離リソソーム表面の Stearyl-H16 ペプチド修飾比率と細胞膜透過。単離した RFP 発現リソソーム (5.0 μg/mL) に対して 0~20 μM の Stearyl-H16 ペプチドを修飾し、GLA 欠損細胞に対する細胞内取り込みをフローサイトメーターにて定量した。(D) H16-Lysosome の GLA 欠損細胞内の分布。(E) GLA 欠損細胞に対する H16-Lysosome の ERT 効果。単離した Lysosome 単独 (5.0 μg/mL) または H16-Lysosome (10 μM Stearyl-H16 peptide, 5.0 μg/mL lysosomes) 存在下で GLA 欠損細胞を 72 時間培養し、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞増殖率を定量した。NT は未処理区を示す。データは平均値 ± S.D. を表す。異なる文字は有意差を示す ($p < 0.05$, Turkey's test)。文献 16 を改変して掲載。

りますので、サイズの的に H16 peptide を使ってリソソームを丸ごと細胞内へ導入できるのか？という心配はありましたが、結果的にはまったく問題なく、H16-Lysosome は LSD 細胞内に取り込まれ、最終的に LSD 細胞の細胞増殖率を回復させるに至りました。これらの結果から、H16 peptide はかなり大きな物質（この場合は粒径約 500 ~ 1,000 nm のリソソーム）も細胞内へ輸送可能であることが示唆されました。また、H16-Lysosome を利用したオルガネラ補充療法 (ORT) という概念を実証することができたと言えます¹⁶。この H16-Lysosome を利用することで、多種・多量のリソソーム酵素を一度に細胞内へ補充することが可能になりますので、現在は治療法 (ERT) が確立されていない LSD や、複数のリソソーム酵素の欠損に起因している LSD など、幅広い LSD に対応できる汎用的な治療基盤技術が確立できたと考えています。今後は、リソソーム以外のオルガネラにも H16 peptide を修飾して細胞内輸送することも考えております。

7. PolyHis を使った植物細胞内へのタンパク質導入法の開発

ここまで、PolyHis を使ったヒト細胞に対するリソソーム標的型 DDS について紹介させていただきましたが、PolyHis は植物細胞にも有効な CPP であることが分かっています。植物細胞は、動物細胞には存在しない細胞壁を有しており、この細胞壁が物理的障壁として CPP の応用を阻んでいます。実際に、アルギニン/リジンに富んだ従来の CPP は細胞壁にトラップされてしまうため、植物細胞に対しては有効でないことが報告されています^{17,18}。この理由としては、負電荷に富んだ細胞壁に対して、正電荷に富んだ従来の CPP が電荷的にトラップされてしまうためであると考えられています。この点において、PolyHis は正電荷に依存しない新しいタイプの CPP であることから、細胞壁を有する植物細胞に対してにも有効な細胞膜

透過を示す可能性が期待されました。そこで我々は、PolyHis を利用した植物細胞内へのタンパク質導入を評価し、植物細胞に対する PolyHis の応用性について検証しました。

様々な鎖長の PolyHis を融合した組換え蛍光タンパク質 (Maltose-binding protein, MBP と Red fluorescent protein, RFP の融合タンパク質 MBP-RFP) を用いて、スギ (*Cryptomeria japonica*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*)、イネ (*Oryza sativa*) の細胞に対する細胞壁・細胞膜透過を調べました。その結果、すべての植物細胞に対して、長鎖の PolyHis (H20 peptide) が効率的なタンパク質導入を示しました (図 5)。以上の結果から、長鎖の PolyHis (H20 peptide) は植物細胞に対するタンパク質導入キャリアーとして有効であることが確認されました¹⁹。さらに我々は、長鎖の PolyHis (H20 peptide) を利用することで、ゲノム編集酵素を植物細胞内へ直接導入し、遺伝子組換えを使わずに植物細胞をゲノム編集する技術を開発しています²⁰。このように、PolyHis は植物の機能改変や品種改良においても有力な CPP であることが確認されました。

8. おわりに

本稿で示しましたように、我々は新しい CPP として PolyHis を発見し、ヒト細胞に対してはリソソーム標的型 DDS キャリアー、植物細胞に対してはタンパク質輸送キャリアーとして応用可能であることを明らかにしてきました。ともに、PolyHis というユニークな CPP であるからこそ実現できた応用技術であると考えています。現在はまだ *in vitro* 実験による概念実証の段階に過ぎませんが、今後は疾患モデル動物や植物体を利用した *in vivo* および *in planta* 実験により、さらに実証データを積み重ねていく所存です。

本研究は、JSPS 科研費、アステラス病態代謝研究

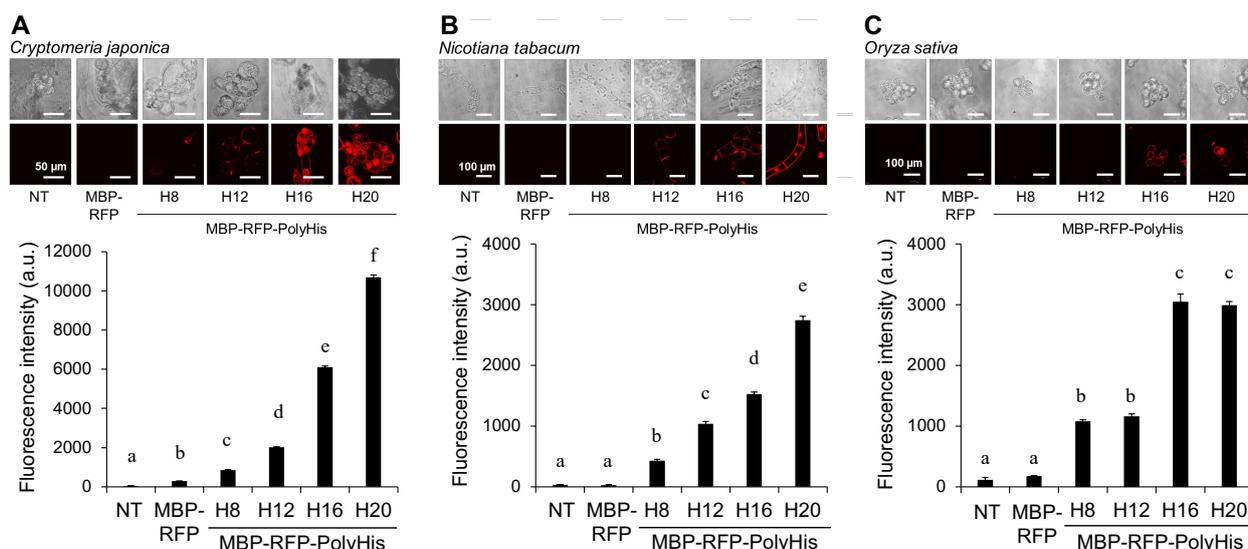


図 5 (A) スギ *C. japonica*, (B) タバコ *N. tabacum*, (C) イネ *O. sativa* の細胞に対する PolyHis 融合 MBP-RFP の細胞壁・細胞膜透過。PolyHis 融合 MBP-RFP (5 μ M) 存在下で植物細胞を 24 時間培養し、共焦点レーザー走査型顕微鏡下で観察するとともに、プロトプラスト化 (細胞壁を除去) した細胞内の PolyHis 融合 MBP-RFP の蛍光を定量した。NT は未処理区を示す。データは平均値 \pm S.D. を表す。異なる文字は有意差を示す ($p < 0.05$, Turkey's test)。文献 19 を改変して掲載。

会、加藤記念バイオサイエンス振興財団、住友電工グループ、野口研究所、稲盛財団、キヤノン財団のご支援を受けて実施しました。この場を借りて御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたっては、多くの共同研究者の皆様のお力添えを賜りました。紙面をお借りして厚く御礼申し上げます。また、研究室運営をサポートしてくださった河野強教授とのディスカッションは本研究を大きく発展させるうえで欠かせないものでした。改めて深く感謝申し上げます。本研究を遂行する上で、熱心に実験に取り組んでくれました学生の皆様にも心より感謝いたします。今回の奨励賞を励みに、より一層、オリジナルのペプチド化学研究を発展できるように精進する所存です。今後ともご指導ご鞭撻を賜りますよう、何卒よろしくお願い申し上げます。また最後になりましたが、本稿執筆の機会を賜りましたペプチドニュースレター編集委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J Biol Chem* 1994, 269, 10444-10450.
2. Vives, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. *J Biol Chem* 1997, 272, 16010-16017.
3. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J Biol Chem* 2001, 276, 5836-5840.
4. Futaki, S.; Nakase, I.; Tadokoro, A.; Takeuchi, T.; Jones, A. T. *Biochem Soc Trans* 2007, 35, 784-787.
5. Pan, J. G.; Mak, T. W. *Sci STKE* 2007, e14.
6. Tannock, I. F.; Rotin, D. *Cancer Res* 1989, 49, 4373-4384.
7. Iwasaki, T.; Tokuda, Y.; Kotake, A.; Okada, H.; Takeda, S.; Kawano, T.; Nakayama, Y. *J Control Release* 2015, 210, 115-124.
8. Platt, F. M.; Boland, B.; van der Spoel A. C. *J Cell Biol* 2012, 199, 723-734.
9. He, L. Q.; Lu, J. H.; Yue, Z. Y. *Acta Pharmacol Sin* 2013, 34, 605-611.
10. Clarke, J. T. R.; Iwanochko, R.M. *Mol Neurobiol* 2005, 32, 43-50.
11. Bruni, S.; Loschi, L.; Incerti, C.; Gabrielli, O.; Coppa, G. V. *Acta Myol* 2007, 26, 87-92.
12. Saftig, P.; Klumperman, J. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10, 623-635.
13. Coutinho, M. F.; Prata, M. J.; Alves, S. *Mol Genet Metab* 2012, 105, 542-550.
14. Iwasaki, T.; Murakami, N.; Kawano, T. *Biochem Biophys Res Commun* 2020, 533, 905-912.
15. Hayashi, T.; Shinagawa, M.; Kawano T.; Iwasaki, T. *Biochem Biophys Res Commun* 2018, 501, 648-653.

16. Hayashi, T.; Okamoto, R.; Kawano, T.; Iwasaki, T. *Molecules* 2019, 24, 2995.
17. Mizuno, T.; Miyashita, M.; Miyagawa, H. *J Pept Sci* 2009, 15, 259-263.
18. Chang, M.; Chou, J. C.; Lee, H. J. *Plant Cell Physiol* 2005, 46, 482-488.
19. Tanaka, Y.; Nanasato, Y.; Omura, K.; Endoh, K.; Kawano, T.; Iwasaki, T. *Biosci Biotechnol Biochem* 2021, 85, 1405-1414.
20. PCT/JJP2021/046845

いわさき たかし

鳥取大学 農学部 生体制御化学分野

itaka@tottori-u.ac.jp

<http://muses.muses.tottori-u.ac.jp/faculty/itaka/>

2022年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

この度は、名誉ある日本ペプチド学会奨励賞を賜り、光栄に存じております。これも、学会長の坂口和靖先生をはじめ、選考に関わりいただいた先生方、並びに本学会の温かいコミュニティの皆様のおかげでございます。本誌をお借りして、心より御礼申し上げます。本稿では、受賞の対象となりました「糖タンパク質の効率的な化学合成法の開発」について、簡単ながらご紹介させていただきます。



朝比奈 雄也

はじめに

糖タンパク質の糖鎖は、細胞の接着や、がん化、分化、認識など、生命現象において重要な役割を担い、タンパク質、ひいては生命の高機能化に深く関わる。この糖鎖機能の解明のために、研究者の多大な努力が払われているものの、未だに構造と機能の相関関係が明確に得られていない。これは、糖タンパク質糖鎖のマイクロ不均一性により、純粋な糖鎖構造を含む糖タンパク質サンプルを供給する方法がないことに起因している。この不均一性に対抗する方法として、化学合成法によるサンプル調製法が挙げられる。化学合成ならば、原理上、天然、非天然を区別せず標的化合物の設定が可能であり、糖鎖も含めて均一な目的物を得ることができる。加えて、糖タンパク質は、複雑な糖鎖とポリペプチド鎖がそれぞれ組み合わせられた巨大な生体分子であり、化学合成のターゲットとしては非常に挑戦的で魅力的な研究でもある。そこで著者は、糖タンパク質の化学合成法の開発を始めた。

糖タンパク質の合成ステージは、大きく分けて2つに分けることができる。それは、第一に糖アミノ酸の合成と糖ペプチドセグメントの合成、第二にペプチドセグメント縮合法によるポリペプチドの構築である。

しかし、既存の方法論には、多くの問題が残されており、複雑な糖タンパク質を自在に合成することは困難であった。そこで、我々は新たな方法論を開発し、高効率かつ汎用性や柔軟性のある化学合成法を確立することを目指した。これら新規法の解説を以下で紹介する。

糖ペプチド合成に適した保護戦略；TFA 感受性保護基の開発

糖ペプチド合成は、まず、無保護の糖から順次適切な保護基の導入を行い、グリコシル化を経て、Fmoc-糖アミノ酸誘導体の合成から行う。次に、得られた糖アミノ酸を固相合成法により導入し、保護糖ペプチド樹脂として得る。最後に、ペプチドの脱保護と糖鎖の脱保護を行うことで、目的の糖ペプチドを得ることができる。従来法では、糖水酸基の保護基は、Bn 基、もしくは Ac 系保護基など、糖化学で汎用される保護基が一般的に利用されてきた。しかし、これら保護基を用いることで、ペプチドの脱保護のためのトリフルオロ酢酸 (TFA) 処理後に、糖水酸基の脱保護処理を追加で行う必要がある。この追加の脱保護工程は、強塩基性もしくは強酸性条件下で行われるため、特に複雑な糖ペプチドの場合では、糖鎖もしくはペプチドに対して許容できない量の副反応を誘発していた。そこで、温和かつペプチドの脱保護処理と並行して除去できる、糖ペプチド合成に適切な保護基を新たに模索することにした。しかし、求められる保護基の条件は、糖鎖合成の初期段階から導入でき、各種糖鎖誘導条件 (グリコシル化、保護基の脱着など) や、ペプチド固相法の条件に耐えられ、なおかつ、最終脱保護時の TFA 処理では速やかに脱保護できるものである。つまり、極めて都合の良い保護基を見つける必要があった。種々検討の結果、4-メチルベンジル基 (MBn 基) などを始めとする置換型ベンジル系保護基が、堅牢性と TFA 感受性とのバランスが取れることがわかった (図 1)。開発初期の成果はニュースレター No.96

にて、すでに紹介しているのでご参照されたい¹。その後、様々なグライコフォームを持つ糖ペプチドの合成に利用された。特筆すべき点は、シアル酸やフコースなど、従来法では合成が難しかった酸感受性の高い糖鎖を含有していても、問題なく本保護基戦略は適用することができたことである^{2,3}。温和な条件で一挙に脱保護することができる本戦略の長所を生かした成果であると言える。

難溶性ペプチドセグメント可溶化法の開発

(糖) タンパク質の全合成時、そのペプチドセグメントが高い難溶性を示すことが頻繁にある。こういった場合、すべての合成操作に支障をきたし、精製すら不可能になる。結果、その全合成は失敗に終わる。我々は、数多くの難溶性ペプチドの合成を通じて、ある傾向を掴むことができた。それは、疎水性アミノ酸の含有率が高く、加えて等電点が低い酸性ペプチドであることだった。こういったペプチドは、逆相 HPLC に利用される酸性アセトニトリル水溶液中で電荷を持たず、疎水性相互作用により凝集し、難溶性を表す。そこで、ピコリル基 (Pic 基) を利用した新規可溶化法を開発した (図 2)。Pic 基は、難溶性ペプチド中の Glu 側鎖カルボキシ基にエステル型で導入することで、酸性官能基を塩基性官能基へ変換し、効果的にペプチドの等電点を上昇させ、ペプチドの可溶化を強力に促進することができる。我々はこの方法を、難溶性ペプチドセグメントを含むインターロイキン-2 (IL-2) の全合成に利用した⁴。IL-2 の C 末端セグメントは極めて高い難溶性を示し、通常の方法での全合成は困難を極めていた。そこで、Pic 基を難溶性ペプチドに導入したところ、劇的に溶解性が改善され、IL-2 の全合成の成功にたどり着くことができた。この報告後、様々な研究グループからペプチド可溶化法の開発が盛んに報告されるようになった。やはり難溶性の問題は、多くのタンパク質の全合成にて頻繁に起きるよ

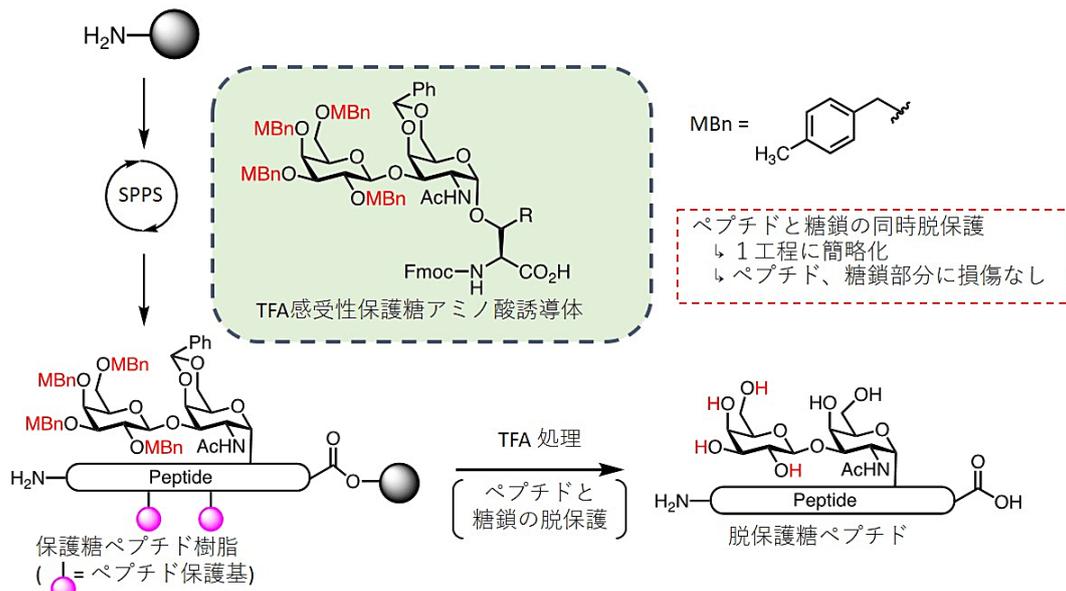


図 1 TFA 感受性保護戦略による糖ペプチド合成図

うである。今後もよりよい方法論が開発されていくことに期待している。

ワンポットペプチドセグメント縮合法の開発

固相合成法の伸長限界を超えた長鎖ポリペプチドの合成を行う際、一般的にペプチドセグメント縮合法が利用される。我々がよく用いるセグメント縮合法として、チオエステル法とネイティブケミカルライゲーション法（NCL法）が挙げられる。これら方法では、ペプチドチオエステルが選択的な縮合反応の足場として利用される。セグメント縮合法の発達によって、より長鎖のポリペプチド合成が可能になりつつある。よ

り長いポリペプチドの合成を行うためには、より多くのペプチドセグメントを複数回に分けて縮合することになる。この際、問題となるのが中間体精製で引き起こされる収率の低下である。その例として、従来法による3セグメント連結反応を挙げる（図3）。この場合、中央セグメントのN末端に保護基を導入することで、第1縮合反応の選択性を制御する。しかし、続く第2縮合に備えるため、得られた中間体セグメントの脱保護と精製を必ず行う必要がある。ペプチドの精製は、一般的な有機化合物のものと異なり、大幅な回収率の低下を生じ、特に、疎水性が高いペプチドの場合、その損失は全体の合成効率に大きな影響を与える。そこで、保護基を用いることなく、反応の足場と

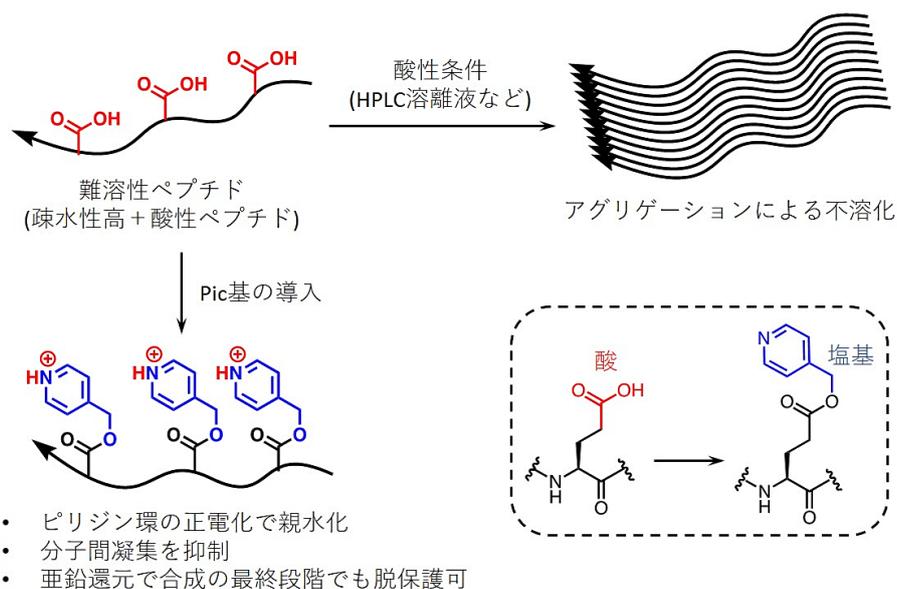


図2 ピコリル基を利用したペプチド新規可溶化法

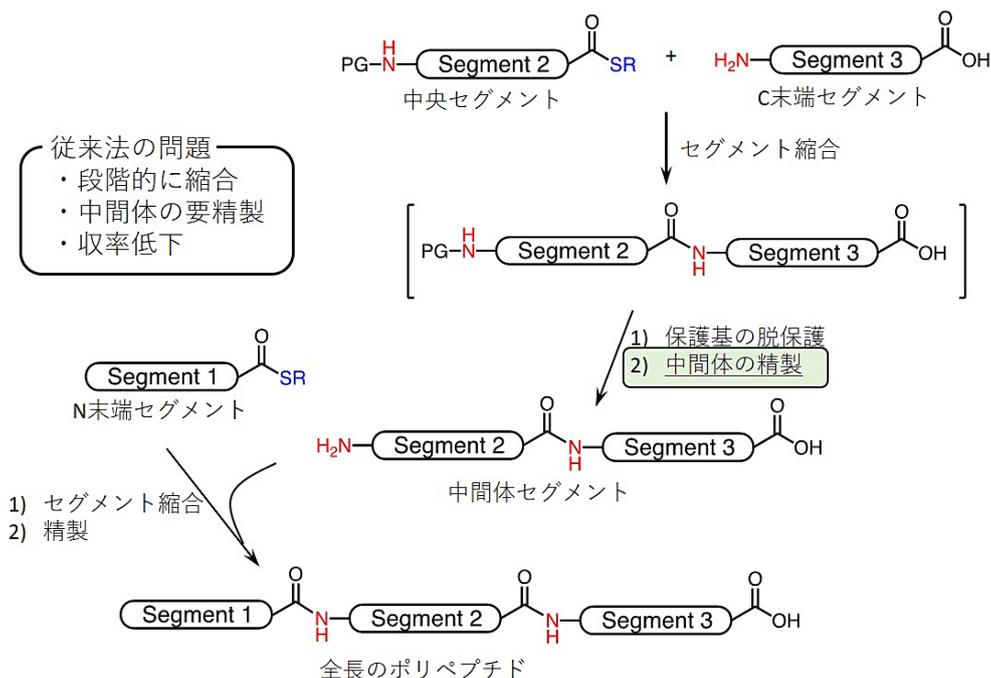


図3 従来法による段階的なセグメント縮合とその問題点

なるチオエステルの反応性を制御し、3 セグメントを連続的に縮合できる、ワンポットセグメント縮合法の開発を行い、問題となる中間体セグメントの精製を回避することにした。なお、本ワンポット法の解説も他誌にて報告しているので、ご参照されたい⁵。

チオエステル法のワンポット化

チオエステル法は、1991 年に開発されたペプチドセグメント縮合法の一種である (図 4)。本方法では、ペプチドチオエステル (N 末端セグメント) を、極性有機溶媒中で 3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one (HOObt), DIEA 存在下, Ag^+ イオンにより活性化し、活性エステルへ誘導した後、系中の C 末端セグメントが反応することで、セグメント間の縮合が完結する。これが、 Ag^+ -promoted チオエステル法である。その後、活性化に Ag^+ を必要としない Ag^+ -free チオエステル法が新たに開発された。この方法では、従来法で利用していたアルキルチオエステルを、より脱離能の高い芳香族チオエステルに置換することで、 Ag^+ の添加なしに活性化と続く縮合を行うことができる。すなわち、反応性の異なるアルキル及び芳香族のチオエステルは、 Ag^+ の添加の有無で選択的に活性化することができることになる。そこで、この反応性の差を利用したワンポットチオエステル法を開発した。この方法は、糖タンパク質 Tim-3 Ig 様ドメインの合成で初めて利用された⁶ (図 5)。この合成では、まず、N 末端セグメントの芳香族チオエステル、及び中央セグメントのアルキルチオエステルを Ag^+ -free 法により第一縮合を行った。この反応では、反応性の高い芳香族チオエステルのみが選択的に反応し、望む中間体を得ることができた。この反応の最中で、アルキルチオエステルは全く活性化されなく残った。中間体の精製を行わず、次に、C 末端セグメントと $AgCl$ を添加し、第二縮合を開始した。この反応では、 Ag^+

がアルキルチオエステルを活性化して、次の縮合を進行させた。結果、目的とする糖タンパク質の全長配列をワンポットで構築することに成功した。中間体の精製を回避したお陰で、収率が 2 倍以上向上した。その後、様々な (糖) タンパク質合成に利用され、その汎用性は十分に示された。

ネイティブケミカルライゲーション法のワンポット化

NCL 法では、まず、N 末端セグメントをペプチドチオエステル、C 末端をシステニルペプチドとして調製する。次に、これらセグメントを中性緩衝液下に溶解すると、セグメント間のチオエステル交換反応に続く、分子内 S-to-N 転移反応が進行し、縮合反応が進行する。我々は、この NCL 法を行う際に、2 種類のペプチドチオエステル等価体、システニルプロリルエステル法 (CPE 法) と N-アルキルシステイン法 (NAC 法) を利用していた (図 6)。CPE 法では、ペプチドの CPE 部分が弱塩基性条件下 (pH 7.8) で、N-to-S アシル転移反応と同時にジケトピペラジン環化反応が進行し、チオエステルが得られ、続く NCL 反応を駆動することができる。一方、NAC 法では、弱酸性条件下 (pH 4-6) で N-to-S アシル転移体、すなわち、チオエステルが生成し、続く縮合反応を進行させる。これら事実を、これら 2 つのチオエステル等価体が、反応系中の pH を変化させるだけで、直交して活性化することができることを示していた。そこで、この直交性 (orthogonality) を利用して、NCL 反応のワンポット化を計画した。この方法は、histone H4 の合成に初めて利用された⁷ (図 7)。まず、N 末端セグメントに CPE、中央セグメントに NAC を導入した 2 つのセグメントを塩基性条件下で NCL 反応に処した。すると、CPE のみが選択的に活性化され、望む中間体セグメントを与えた。中間体を精製することなく、C 末端セグメントを加え、反応混合物の pH を

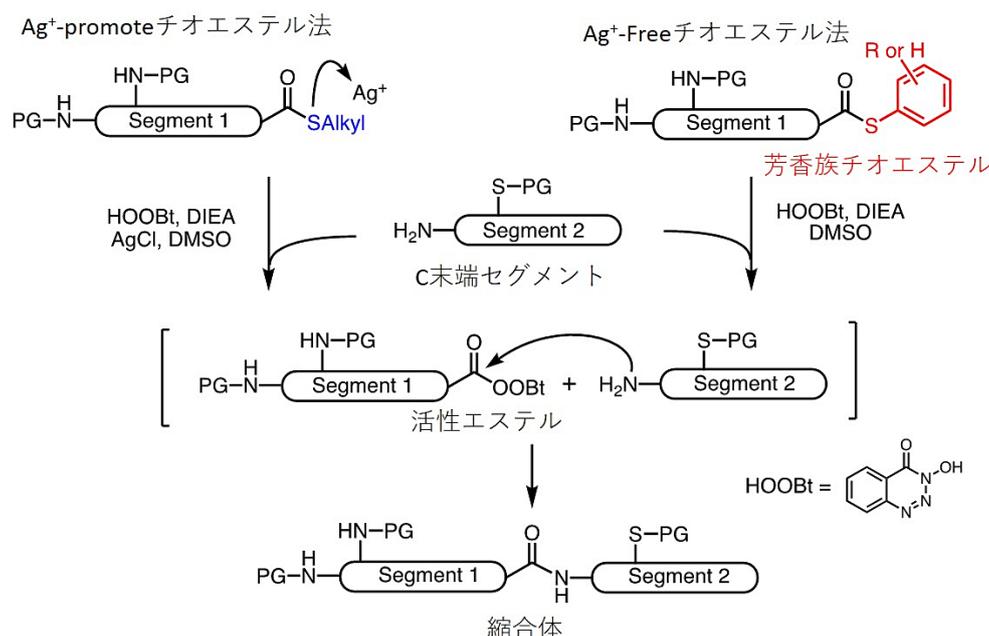


図 4 2 種類のチオエステル法

5.5 に調節し、次の反応を開始した。すると、不活性だった NAC 部分が活性化され、第 2 縮合が進行した。その結果、目的のポリペプチドをワンポットで合成することに成功した。さらなる検討の結果、4 セグメントワンポット反応まで、本合成法を拡張することができた⁸。これら開発により、より長鎖のポリペプチドが、より高効率かつ簡便に得られるようになった。

おわりに

以上、これまでに行ってきた糖タンパク合成法の開発について概説をした。これらアプローチにより、簡単に、早く、確実に目的物の構築が可能な“オンデマンド合成”ができるようになったことを期待して

いる。

最後に、本研究はすべて、東海大学大学院総合理工学研究科の北條研究室、及び大阪大学蛋白質研究所の蛋白質有機化学研究室で行われたものです。これら成果が得られたのも、学生時代から助教時代の 14 年間の長きに渡って、温かいご指導を北條裕信教授からいただけたお陰であり、ここに深く感謝申し上げます。2022 年 4 月より、現職の株式会社日本触媒、健康・医療事業室に就きましたが、フィールドは変わっても、まだまだペプチド化学の研究に携わって参ります。今後とも変わらず、ご指導ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

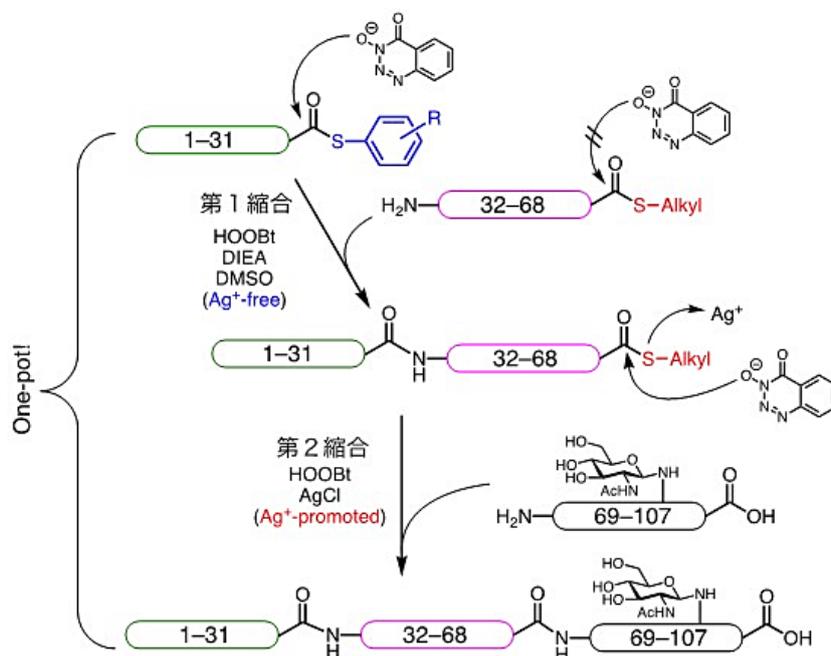
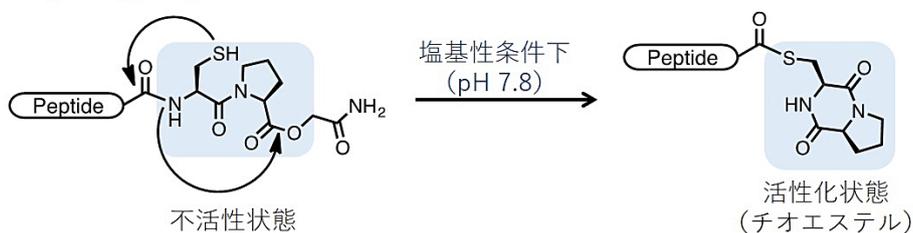


図 5 ワンポットチオエステル法による Tim-3 Ig 様ドメインの合成図

Cysteinyloxy ester 法 (CPE法)



N-Alkylcysteine法 (NAC法)

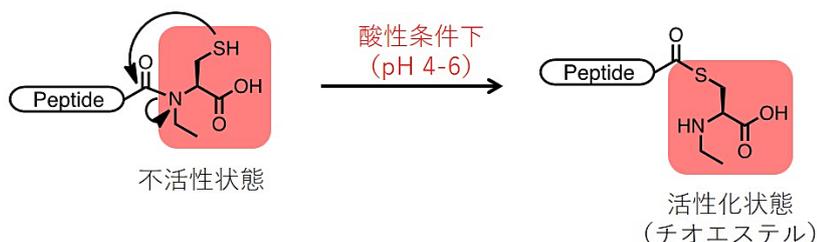


図 6 直交した 2 種類のチオエステル等価体

Excellent Stone Award を受賞して



栗山 理志

2022年10月26日から28日の3日間にわたってトークネットホール仙台にて開催された第59回ペプチド討論会において若手口頭発表を行い、同時に Excellent Stone Award に選出していただきました。貴重な発表の機会をいただいたことに感謝するとともに、名誉ある賞をいただきましたことを大変光栄に思います。研究活動を始めて1年ほどでコロナ禍に突入した筆者にとって、今回は初めてのペプチド討論会への参加というだけでなく、初めての現地開催の学会でもありました。討論会では、英語での口頭発表と質疑応答に加え、ポスター発表では多くの方と対面でのディスカッションの機会をいただき、オンライン学会にはない盛り上がりを感じることができました。また、口頭発表では周囲の学生の高い研究力と英語力を目の当たりにし、自分もより一層努力しようとの引き締まる思いでした。本稿では、受賞対象となった“Identification of biomolecules that contribute to the activity of the cytosolic delivery peptide L17E”の研究内容について紹介いたします。

抗体などの機能性タンパク質をはじめとする高分子は、そのサイズが大きいため細胞膜を透過することができません。これらの高分子を細胞内で機能させることを目的として、細胞内への高分子の導入方法が広く研究されてきました。所属研究室ではペプチドをツールとしてこのような導入方法の開発に取り組んでおり、その成果として、クモ毒由来の溶血性ペプチドの配列を改変しその膜障害活性を調節することで、新規細胞内送達ペプチド L17E の開発に成功しました¹。L17E は送達したい目的分子と単に混ぜ合わせて細胞に投与することで、抗体などの分子量の大きい分子であっても容易に細胞内に送達することができます。その後、L17E の配列にさらに改変を加えることによる送達活性の向上²や、L17E の多量体化と抗体結合配列の付与による抗体送達の新規プラットフォームの創出³などの研究が進み、本手法の細胞内導入法としてのポテンシャルの高さが示されました。しかし、細胞生物学研究への利用や薬物送達分野への応用を見据えると、L17E の細胞内送達活性は必ずしも満足できるものではなく、より一層効率の高い細胞内送達系の開発が求められます。そのため我々は、L17E による細胞内送達法の改善点の理解を目指し、その作用機序の検討を行ってきました⁴。

L17E の開発当初のコンセプトは、細胞自身が持つ飲食作用（エンドサイトーシス）によって L17E と送達したい目的分子を取り込ませ、L17E の持つエンドソーム不安定化能によって目的分子をエンドソームから放出させるというものでした¹。すなわち、pH に応答して膜障害活性を發揮するよう設計することで、細胞外では低い膜障害活性を保持し、エンドソームが酸

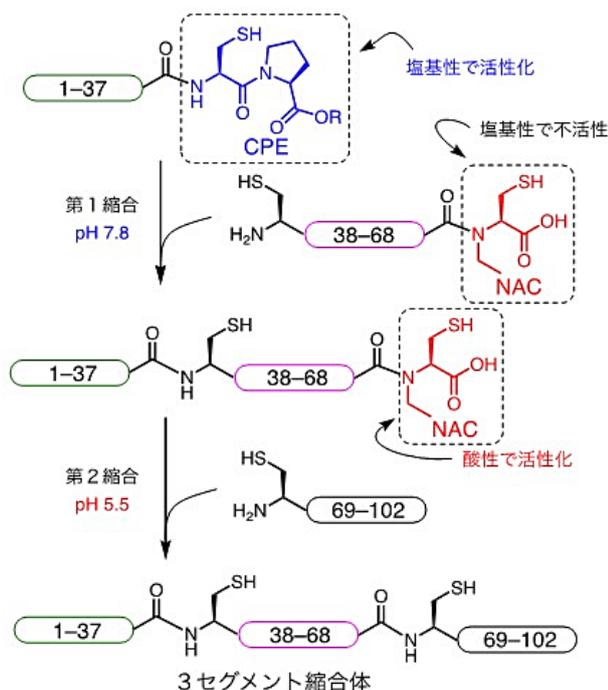


図7 直交したチオエステル等価体を利用したワンポット NCL 縮合法によるヒストン H4 の合成

参考文献

- 朝比奈雄也, Peptide Newsletter Japan No. 96 2015 10-12.
- Takeda, N.; Takei, T.; Asahina, Y.; Hojo, H. Eur Chem J 2018, 24, 2593-2597.
- Asahina, Y.; Ando, T.; Hojo, H. Bull Chem Soc Jpn 2022, 95, 1196-1208.
- Asahina, Y. et al Angew Chem Int Ed 2015, 54, 8226-8230.
- 朝比奈雄也, 化学と生物 2022, 60, 116-122.
- Asahina, Y.; Kamitori, S.; Takao, T.; Nishi, N.; Hojo, H. 2013, 52, 9733-9737.
- Asahina, Y.; Kawakami, T.; Hojo, H. Chem Commun 2017, 53, 2114-2117.
- Asahina, Y.; Kawakami, T.; Hojo, H. Eur J Org Chem 2019, 1915-1920.

あさひな ゆうや
 株式会社日本触媒 健康・医療事業室
 yuya_asahina@shokubai.co.jp

性化するに伴って膜障害活性を獲得することが期待されてきました。しかしその後、L17E による細胞内送達にはエンドソームの成熟化が不要であることが分かり⁴、想定とは異なる経路の関与が示唆されました。

そこで本研究では、L17E による細胞内送達の機序の解明を目指し、その糸口として L17E による細胞内送達活性が細胞種によって異なる点に着目しました。L17E は特定の細胞種において極めて高い効率で高分子を導入できる一方で、L17E がほとんど効かない L17E 非感受性の細胞種も存在します。L17E への感受性が高い細胞と低い細胞の違いが分かれば、L17E が細胞においてどのように作用しているのか、その機序の解明につながる可能性があると考えました。

我々は、細胞種ごとの L17E 感受性の違いがそれぞれの細胞種における特定のタンパク質の発現量の差に起因するのではないかと仮説を立て、L17E の活性に影響するタンパク質の特定を目指しました。そのために、複数の細胞種を用いて、それぞれの細胞種における L17E 活性と発現量が相関する遺伝子の探索を行いました (図 1)。L17E 活性に影響を与える遺伝子が存在するならば、L17E への感受性が異なる細胞種においてはその発現量が大きく異なっていると考えられます。まず、異なる 11 種類のがん細胞種での L17E の活性を、膜不透過性の核酸染色色素であるヨウ化プロピジウム (PI) の送達効率を指標として評価しました。L17E と PI を細胞に投与し、PI が細胞内に送達された細胞の割合をフローサイトメトリーにより評価したところ、L17E による送達割合は細胞種によって 5% から 70% と大きく異なっていることが確認されました。続いて、がん細胞株の遺伝子発現データベース

である Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)⁵ から、11 種類それぞれの細胞種における約 16,000 遺伝子の発現量データを取得しました。そして、L17E による送達効率と遺伝子発現量の相関を解析することで、L17E による細胞内送達に関与する可能性のある候補遺伝子群を見出すことができました。

その中でも、カリウムチャンネルをコードする遺伝子に着目し、現在 L17E 活性との関連の検討を進めています。細胞膜透過ペプチド (cell-penetrating peptide, CPP) の内在化に膜電位が必要であるということが古くから知られており⁶、さらに近年、膜電位の調節に寄与するいくつかのカリウムチャンネルが CPP の内在化に関与しているという報告もされました⁷。L17E の場合も同様に膜電位調節に依存する仕組みで細胞に作用することで細胞内送達が行われている可能性があります。今後、L17E の作用機序をより詳細に検討していくことで、抗体などの高分子の高効率な細胞内送達を指向した新たな導入方法の確立が期待されます。

本研究は京都大学化学研究所の広瀬久昭先生と二木史朗先生のご指導のもと行った研究であり、細胞内送達ペプチドの作用機序に関する研究の機会と多くのご支援をいただいたことに深く感謝いたします。また、研究を遂行するにあたり、種々のご助言をいただきました京都大学化学研究所の川口祥正先生に心より感謝申し上げます。そして、本ペプチド討論会の運営にご尽力いただきました東北大学の土井隆行先生、山形大学の今野博行先生ならびに審査員の先生方、支援していただいた皆様方に深く御礼申し上げます。最後になりましたが、ペプチドニュースレター 127 号への執筆の機会をくださった北海道大学の薬師寺文華先生と編集委員の先生方に本紙面をお借りして御礼申し上げます。この度の受賞を励みに、より一層研究に邁進していく所存です。引き続きご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

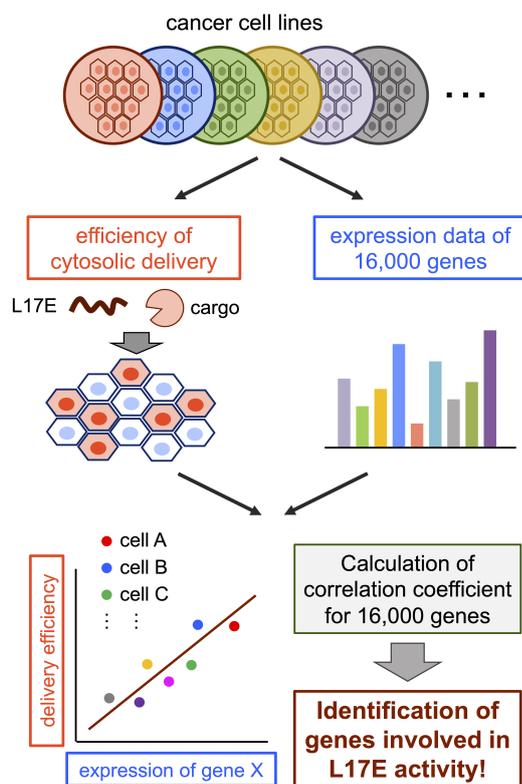


図 1 本研究の戦略

参考文献

1. Akishiba, M.; Takeuchi, T.; Kawaguchi, Y.; Sakamoto, K.; Yu, H. H.; Nakase, I.; Takatani-Nakase, T.; Madani, F.; Gräslund, A.; Futaki, S. *Nat Chem* 2017, 9, 751-761.
2. Sakamoto, K.; Akishiba, M.; Iwata, T.; Murata, K.; Mizuno, S.; Kawano, K.; Imanishi, M.; Sugiyama, F.; Futaki, S. *Angew Chem Int Ed* 2020, 59, 19990-19998.
3. Iwata, T.; Hirose, H.; Sakamoto, K.; Hirai, Y.; Arafiles, J. V. V.; Akishiba, M.; Imanishi, M.; Futaki, S. *Angew Chem Int Ed* 2021, 60, 19804-19812.
4. Akishiba, M.; Futaki, S. *Mol Pharm* 2019, 16, 2540-2548.
5. Barretina, J.; Caponigro, G.; Stransky, N.; Venkatesan, K.; Margolin, A. A.; Kim, S.; Wilson, C. J.; Lehár, J.; Kryukov, G. V.; Sonkin, D.; Reddy, A.; Liu, M.; Murray, L.; Berger,

- M. F.; Monahan, J. E.; Morais, P.; Meltzer, J.; Korejwa, A.; Jané-Valbuena, J.; Mapa, F. A.; Thibault, J.; Bric-Furlong, E.; Raman, P.; Shipway, A.; Engels, I. H.; Cheng, J.; Yu, G. K.; Yu, J.; Aspesi, P.; Jr de Silva, M.; Jagtap, K.; Jones, M. D.; Wang, L.; Hatton, C.; Palescandolo, E.; Gupta, S.; Mahan, S.; Sougnez, C.; Onofrio, R. C.; Liefeld, T.; MacConaill, L.; Winckler, W.; Reich, M.; Li, N.; Mesirov, J. P.; Gabriel, S. B.; Getz, G.; Ardlie, K.; Chan, V.; Myer, V. E.; Weber, B. L.; Porter, J.; Warmuth, M.; Finan, P.; Harris, J. L.; Meyerson, M.; Golub, T. R.; Morrissey, M. P.; Sellers, W. R.; Schlegel, R.; Garraway L. A. *Nature* 2012, 483, 603–607.
6. Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. A.; Wender, P. A. *J Am Chem Soc* 2004, 126, 9506–9507.
7. Trofimenko, E.; Grasso, G.; Heulot, M.; Chevalier, N.; Deriu, M. A.; Dubuis, G.; Aribat, Y.; Serulla, M.; Michel, S.; Vantomme, G.; Ory, F.; Dam, L. C.; Puyal, J.; Amati, F.; Lüthi, A.; Danani, A.; Widmann, C. *eLife* 2021, 10, e69832.

くりやま まさし
 京都大学 化学研究所
 生体機能設計化学分野
 kuriyama.masashi.46v@st.kyoto-u.ac.jp

Excellent Poster Presentation Award を受賞して

この度、2022年10月26日から28日にわたり仙台にて開催された第59回ペプチド討論会において“Development of melittin derivatives for intracellular delivery of biomacromolecules”という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発表優秀賞に選出いただきました。また、コロナ禍において不透明な状況にも関わらず、あらゆる感染対策の上、オンラインで開催いただき、非常にエキサイティングな時間を過ごすことができました。本学会長である坂口先生、第59回ペプチド討論会オーガナイザーの土井先生および今野先生、選考委員会の先生方に、心より御礼申し上げます。本稿では、ポスター発表の内容を紹介させていただきます。

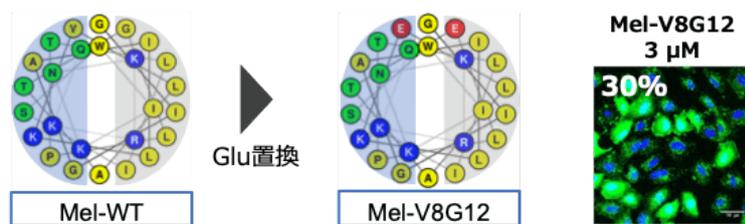
抗体などの機能性タンパク質は高い生理活性を有することから、バイオ医薬品として脚光を浴びています。一方で、抗体などの生理活性高分子は膜透過性に乏しく細胞内分子を標的にすることが困難であること



川口 祥正

から、効率的に機能性タンパク質をサイトゾルに送達する手法の開発が望まれています¹。私が所属する二木研究室では、ペプチドを用いた機能性高分子の細胞内送達に関する研究に取り組んでおり、クモ毒由来の膜傷害性ペプチドである M-Lycotoxin においてグルタミン酸置換することで、細胞毒性を低減して、抗体などの機能性高分子をサイトゾルに送達可能なサイトゾル送達ペプチド“L17E”を開発しました²。この知見を活かして、ハチ毒由来の両親媒性の膜傷害性ペプチドである Melittin に対してグルタミン酸置換残基をスクリーニングすることで、“V8G12”という新規サイトゾル送達ペプチドの開発に成功しました³。V8G12 は、Melittin の親水面と疎水面の界面に2つのグルタミン酸置換を施すことで、野生型 Melittin と比較して脂質膜への挿入が浅くなり、膜傷害性が低減されることが分子動力学計算によって示唆されました。それによって、V8G12 は野生型 Melittin と比較して細胞毒性を10倍以上低減し、3 μM という低濃度で30%程度の細胞においてサイトゾル送達を達成しました(図1)。一方で、将来的に細胞内導入抗体による細胞機能解析や *in vivo* への展開を想定すると送達効率は十分ではなく、より高活性なサイトゾル送達ペプチドの開発が必要であると考えられました。そこで、本研究では、V8G12 を鋳型として高活性なサイトゾル送達ペプチドを創製し、そのペプチドによる機能性分子の送達、さらに送達メカニズム解析を行いました。

これまでの検討から、Melittin の細胞毒性と送達活性を調節する上で、親水面と疎水面の境界に位置するアミノ酸を親水性アミノ酸に置換することが重要であることが示唆されていました³。そこで、V8G12 の全原子分子動力学シミュレーションにおいて、疎水面と親水面の境界に位置するアミノ酸について親水性アミノ酸に置換したペプチドを VG-1 から VG-6 まで6種類を設計・合成しました。まず、これらのペプチドについて、細胞毒性および蛍光標識デキストランを用いたサイトゾル送達活性を評価したところ、細胞毒性はペプチド間でほとんど変化がなかったにもかかわらず、VG-6 において約50%の細胞でデキストランのサイトゾルへの拡散が観察され、極めて高い送達活性を有することが明らかとなりました。次に、VG-6 によって機能性タンパク質が送達可能かどうかについて評価しました。Cre recombinase を VG-6 と混合して細胞に添加したところ、L17E と同等の組換え効率を確認しました。さらに、蛍光標識した抗体についても同様に評価したところ、細胞内において標的分子への集積が観察されたことから、VG-6 によって抗体を含む機能性タンパク質をサイトゾル送達可能であることが示されました。さらに、VG-6 の細胞汎用性を確認するために、L17E では導入効率が低いとされる各種細胞種に対して、蛍光標識デキストランを導入したところ、これらの細胞種においてもサイトゾルへの蛍光の拡散が観察されました。よって、VG-6 は高い細胞汎用性を有する可能性があることが示唆されました。ここで、VG-6 は、L17E では導入効率が低い細胞に対しても高い導入効率を示したことから、細胞内送達メカニズムが異なる可能性が考えられました。よっ



Name	Sequence	CC ₅₀ (μM)
Melittin	GIGAILKVLATGLPTLISWIKNKRKQ-amide	0.28
Mel-V8G12	GIGAILK E LAT E LPTLISWIKNKRKQ-amide	4.0

図1 V8G12 の配列設計と細胞内送達

て、次に、VG-6 のサイトゾル送達メカニズムについて検討を行いました。

これまでの報告から、L17E によるサイトゾル送達はエンドソームからの脱出促進ではなく、細胞膜表面からの直接流入であることが示唆されています⁴。そこで、VG-6 のサイトゾル送達が L17E と同様に細胞膜からの直接流入かどうかを評価するために、蛍光標識デキストランの経時的なサイトゾル送達効率を算出しました。その結果、L17E はこれまでの報告と同様に送達効率が 5 分でプラトーに達する一方で、VG-6 は経時的に送達効率が増加しました。さらに、各種エンドサイトーシス阻害剤を用いることで、VG-6 の細胞内取り込みおよびサイトゾル送達には、エンドサイトーシスが関与していることが示され、L17E とは異なる送達メカニズムである可能性が示唆されました。

本研究では、VG-6 の創製から送達機序についての検討を進めてきましたが、安全性と高活性を両立するための設計指針は明確になっていません。今後、脂質膜への傷害メカニズムも含めた VG-6 のより詳細な送達機構の解明に取り組むことで、「低毒性」かつ「高効率」なサイトゾル送達ペプチドの論理的設計、さらには *in vivo* への応用につなげていけると考えています。

本研究は、二木研究室の卒業生である為本尚樹博士(当時修士 2 年)が二木史朗教授の指導の下、精力的に取り組んだ研究です。また、本研究は、塩野義製薬 FINDS 共同研究の支援をいただき実施したものであり、この場を借りて御礼申し上げます。また、私は、二木史朗先生の元で博士課程を修了後、製薬会社に約 5 年半勤めたのちに、改めて京都大学化学研究所二木研究室に戻ってきました。今後は、アカデミアという場にてペプチド・タンパク質サイエンスの発展に貢献すべく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、何卒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 127 号への執筆の機会をくださった北海道大学の薬師寺先生および編集委員の先生方に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Carter, P.; Lazar G. *Nat Rev Drug Discov* 2018, 17, 197-223.
2. Akishiba, M.; Takeuchi, T.; Kawaguchi, Y.; Sakamoto, K.; Yu, H. H.; Nakase, I.; Takatani-Nakase, T.; Madani, F.; Gräslund, A.; Futaki, S. *Nat Chem* 2017, 9, 751-761.
3. Tamemoto, N.; Akishiba, M.; Sakamoto, K.; Kawano, K.; Noguchi, H.; Futaki S. *Mol Pharm* 2020, 17, 2175-2185.
4. Akishiba, M.; Futaki, S. *Mol Pharm* 2019, 16, 2540-2548.

かわぐち よしまさ
 京都大学 化学研究所
 生体機能設計化学領域
 kawaguchi.yoshimasa.st@kyoto-u.ac.jp
<https://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/>

第 59 回ペプチド討論会ポスター賞を受賞して

2022 年 10 月 26 日から 28 日にわたって開催された第 59 回ペプチド討論会において、大変光栄なことにポスター賞をいただきました。この場をお借りして日本ペプチド学会会長坂口和靖先生をはじめ、土井隆行先生、今野博行先生を代表とする第 59 回ペプチド討論会実行委員、選考委員の先生方に厚く感謝申し上げます。本稿ではポスター発表した“Genome mining and heterologous expression-based discovery of a new depsipeptide from *Chaetomium* fungi”について紹介させていただきます。



本間 悠人

これまで植物や微生物が生産する多様な骨格や機能を有する天然物は創薬研究をはじめ、様々な分野の研究に貢献してきました。一方で、近年のゲノム解析技術の向上とそれに伴う生合成研究の発展により、微生物のゲノム上にはこれまでに発見されてきた天然物以上に多様な天然物をコードする遺伝子が存在することが明らかになりました。したがって、これら遺伝子資源を天然物に変換することができれば、従来よりも

効率的な新規構造・機能を有する天然物の獲得が期待されます。ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学的手法はゲノム情報を天然物に合理的に変換する手法であり、当研究室では多数の新規天然物の獲得を達成してきました¹⁻⁴。そこで、私は本手法を用いることで新たなペプチド含有天然物の獲得を目指すこととしました。

私はターゲットとなる化合物群としてペプチド鎖と脂肪酸鎖が融合することで生合成されるリポペプチドおよびデプシペプチド群に着目しました。それらの骨格形成に関与する非リボソームペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) と高還元型ポリケタイド合成酵素 (highly reducing

polyketide synthase, HR-PKS) をコードする遺伝子が近傍に存在する遺伝子群 (遺伝子クラスター) を独自に収集したゲノム情報から探索しました。その結果、*Chaetomium mollipilium* のゲノム上に NRPS, HR-PKS, アシルトランスフェラーゼ, AMP リガーゼからなる *cmlp* クラスターを見出しました (図 1A)。続いて、このクラスターの新規性を評価しました。生合成される天然物に含まれるアミノ酸の活性化にかかわる NRPS の A ドメインに着目しながら類縁クラスターを探索すると、A ドメインが 2, 3, 5, 6, 8, 12 個の NRPS を含む *cmlp* 様クラスターが見出されました⁵⁻⁸ (図 1A)。また、A ドメインが 3, 5, 8, 12 個の NRPS を含むクラスターからはそれぞれの A ドメ

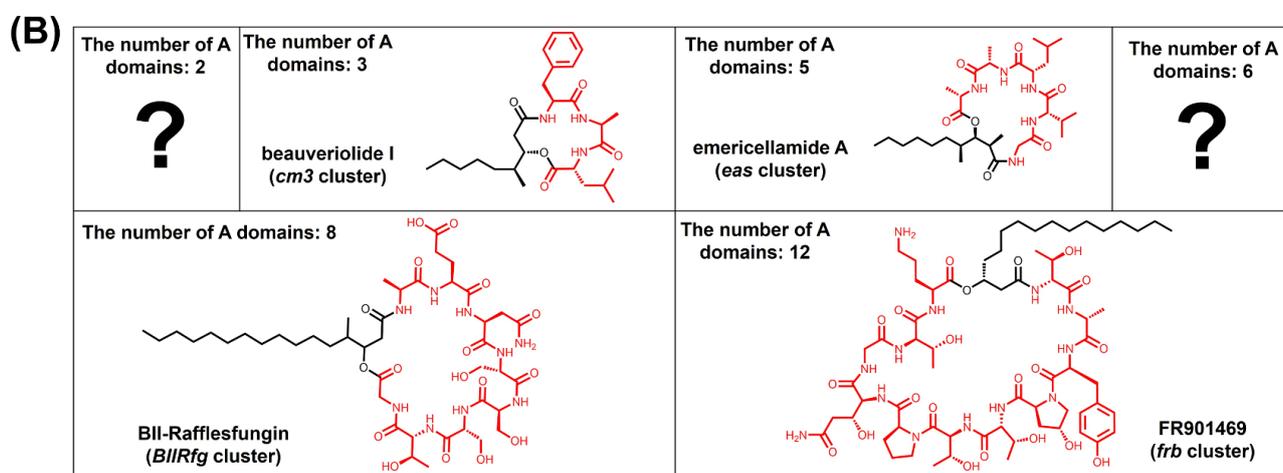
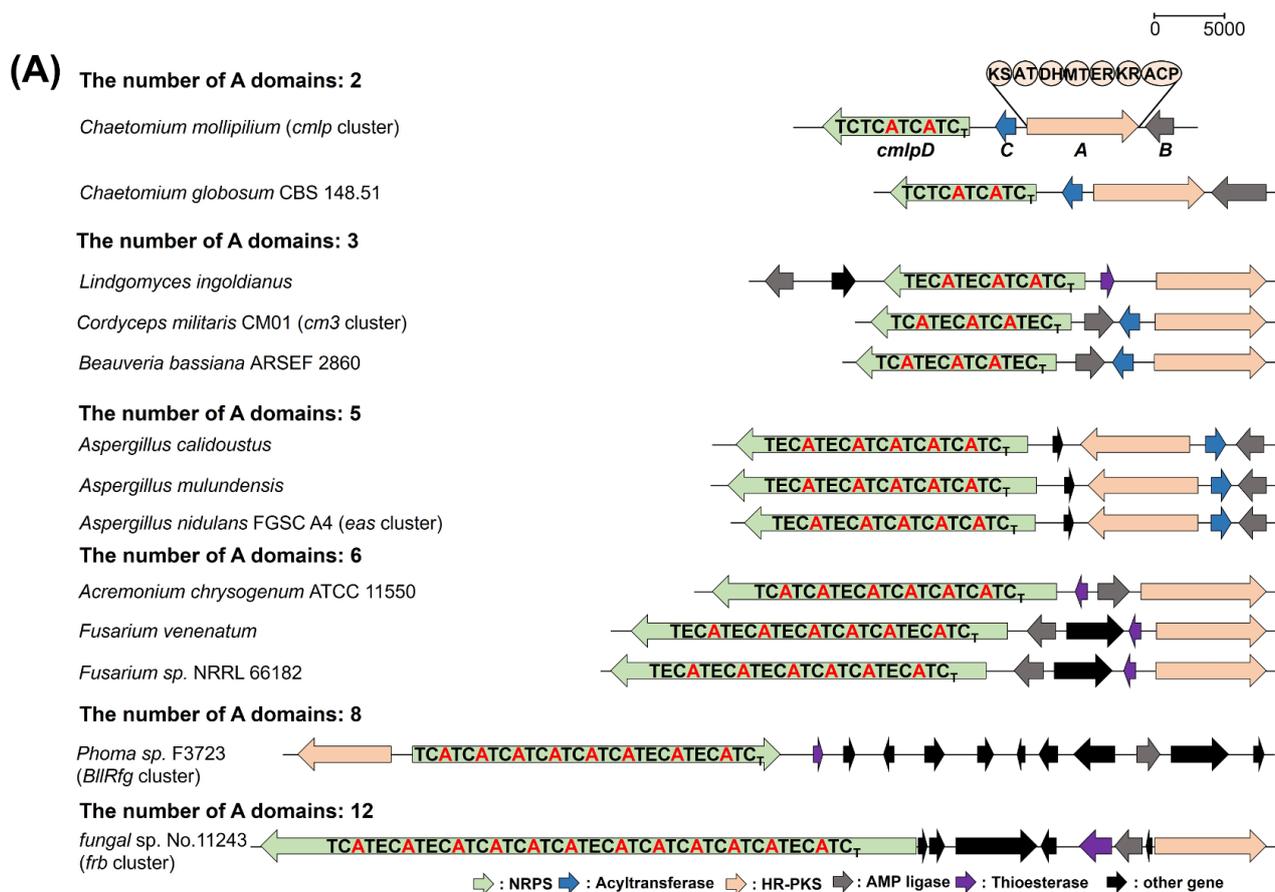


図 1 (A) *cmlp* クラスターおよびその類縁クラスター, (B) *cmlp* 類縁クラスターがコードする天然物

インの数と対応したアミノ酸残基を含むデプシペプチドの報告がありました (図 1B)。一方で *cmlp* クラスターと同じ A ドメインが 2 個の NRPS を含むクラスターからは天然物の報告がありませんでした。したがって、*cmlp* クラスターは 2 つのアミノ酸と脂肪酸が融合した新規デプシペプチドをコードすると考えられます。そこで、このクラスターを標的として異種発現を行うこととしました。

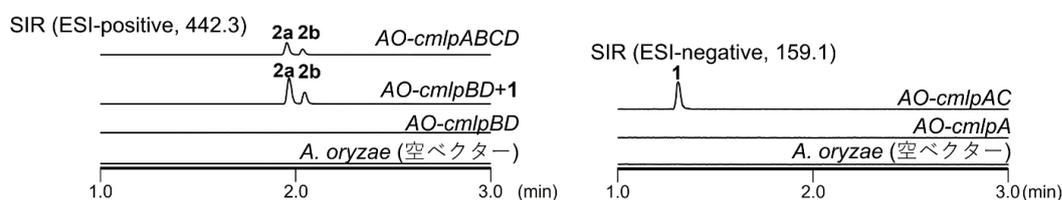
cmlp クラスター内のすべての遺伝子 *cmlpABCD* を汎用宿主である麹菌 (*Aspergillus oryzae*) に異種発現した結果、予想通りの骨格を有した新規デプシペプチド chaetodepsipeptin A (**2a**) および **2a** のロイシン残基の窒素原子とトリプトファン残基のカルボニル間でシクロール構造を形成した chaetodepsipeptin B (**2b**) の平衡混合物の生産を確認しました (図 2A, 2B)。**2a/2b** の相対配置は NOESY スペクトルにより決定し、絶対配置は Marfey 法, 改良 Mosher 法, 既知化合物との NMR の比較により決定しました。また、**2a/2b** の構造について確証を得るための化学変換を検討しました。その結果、**2a/2b** の混合物に LAH 還元を適用することで **2a** のエステル結合が開裂した化合物 **3** を、**2a/2b** の混合物を DMSO 下, 加熱処理することで **2b** のシクロール構造を形成しているヒドロキシ基が脱離した化合物 **4** の取得に成功しました。これらの結果からも **2a/2b** の構造を支持することができました。

続いて、過去の生合成の知見から生合成経路を推定しました (図 2C)。すなわち、HR-PKS である *CmlpA*

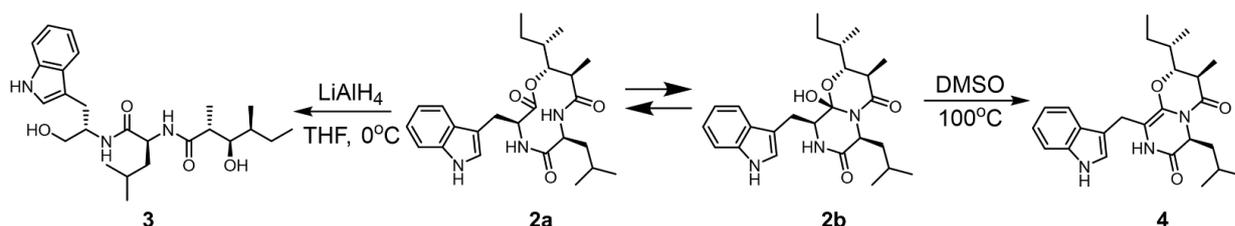
によって生合成されたポリケチド鎖は HR-PKS 内に切り出しに関わるドメインが存在しないため、他の酵素により *CmlpA* から切り出され、**1** を放出します。続いて、AMP リガーゼと相同性を示す *CmlpB* によって活性化され NRPS である *CmlpD* に転移した後、ペプチド鎖の伸長、環化が進行すると予測されます。本遺伝子クラスターにはアシル鎖の加水分解を触媒する典型的な酵素やドメインはありませんでしたが、私たちはアシルトランスフェラーゼと相同性を示す *CmlpC* がこの役割を担うと推測しました。また、*CmlpD* のドメイン構造と生合成に必要なと推定されるドメインを比較すると、*CmlpD* 内にはそれぞれ 1 つずつ余分な C ドメインと T ドメインの存在が示唆されました。以上の仮説を検証するため、**2a/2b** の各酵素及びドメインの機能の検証を行いました。

まず、**1** の生合成に関する研究に取り組みました。*cmlpA* および *cmlpAC*, *cmlpBD* をそれぞれ麹菌に導入した株 AO-*cmlpA*, AO-*cmlpAC*, AO-*cmlpBD* を作製しました。まず、AO-*cmlpA* と AO-*cmlpAC* の代謝物を比較すると、AO-*cmlpAC* のみ **1** を生産することを確認しました (図 2A)。また、**1** を AO-*cmlpBD* に添加して培養することで **2a/2b** を生産することを確認しました。これにより、*CmlpC* がポリケチド鎖の加水分解を担うとともに **1** がその後の基質となることを確認しました。また、NRPS である *CmlpD* のドメインの機能を検証しました。各ドメインの活性中心をアラニンに変異させた酵素を作製し麹菌に導入し、**2a/2b** の生産を確認しました。その結果、C2 ド

(A)



(B)



(C)

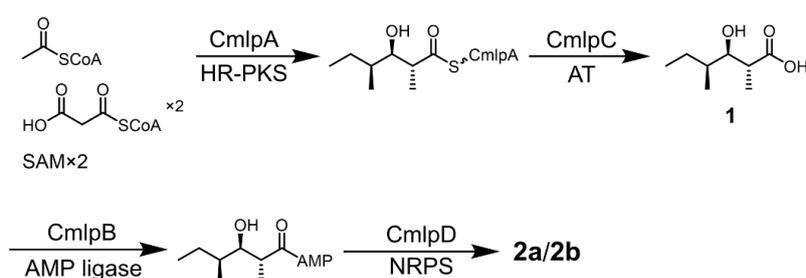


図 2 (A) *cmlp* クラスター形質転換株の HPLC 図, (B) **2a/2b** の構造及び化学変換, (C) **2a/2b** の推定生合成経路

第36回 European Peptide Symposium / 第12回 International Peptide Symposium (36th EPS/12th IPS) 参加報告

メインおよび T2 ドメインが機能しないドメインであるシュードドメインである可能性が示唆されました。

本研究では、ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学的手法を用いることで新規天然物の獲得に成功し、各合成酵素の機能を検証することでこの化合物特有の生合成経路を明らかにできました⁹。今後、本研究をもとにさらなる新規ペプチド天然物の獲得が期待されるとともに、これまでにない多種多様な真菌由来天然物の獲得が期待されます。

本研究は東北大学大学院薬学研究科の浅井禎吾先生、尾崎太郎先生、菅原章公先生のご指導のもと行った研究であり、多くのご助言をいただきました。この場を借りて深く感謝申し上げます。末筆になりましたが、ペプチドニュースレター 127 号への執筆の機会を与えてくださった北海道大学の薬師寺文華先生にこの場をお借りして深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Kaneko, A.; Morishita, Y.; Tsukada, K.; Taniguchi, T.; Asai, T. *Org Biomol Chem* 2019, 17, 5239–5243.
2. Morishita, Y.; Zhang, H.; Taniguchi, T.; Mori, K.; Asai, T. *Org Lett* 2019, 21, 4788–4792.
3. Tsukada, K.; Shinki, S.; Kaneko, A.; Murakami, K.; Irie, K.; Murai, M.; Miyoshi, H.; Dan, S.; Kawaji, K.; Hayashi, H.; Kodama, E. N.; Hori, A.; Salim, E.; Kuraishi, T.; Hirata, N.; Kanda, Y.; Asai, T. *Nat Commun* 2020, 11, 1830.
4. Morishita, Y.; Aoki, Y.; Ito, M.; Hagiwara, D.; Torimaru, K.; Morita, D.; Kuroda, T.; Fukano, H.; Hoshino, Y.; Suzuki, M.; Taniguchi, T.; Mori, K.; Asai, T. *Org Lett* 2020, 22, 5876–5879.
5. Wang, X.; Gao, Y.-L.; Zhang, M.-L.; Huang, J.-Z.; Li, L. *J Biotechnol* 2020, 309, 85–91.
6. Sinha, S.; Nge, C.-E.; Leong, C. Y.; Ng, V.; Crasta, S.; Alfatah, M.; Goh, F.; Low, K.-N.; Zhang, H.; Arumugam, P.; Lezhava, A.; Chen, S. L.; Kanagasundaram, Y.; Ng, S. B.; Eisenhaber, F.; Eisenhaber, B. *BMC Genom* 2019, 20, 374.
7. Matsui, M.; Yokoyama, T.; Nemoto, K.; Kumagai, T.; Terai, G.; Tamano, K.; Machida, M.; Shibata, T. *J Biosci Bioeng* 2017, 123, 147–153.
8. Chiang, Y.-M.; Szwedczyk, E.; Nayak, T.; Davidson, A. D.; Sanchez, J. F.; Lo, H.-C.; Ho, W.-Y.; Simityan, H.; Kuo, E.; Praseuth, A.; Watanabe, K.; Oakley, B. R.; Wang, C. C. *Chem Biol* 2008, 15, 527–532.
9. Homma, Y.; Sugawara, A.; Morishita, Y.; Tsukada, K.; Ozaki, T.; Asai, T. *Org Lett* 2022, 24, 3504–3509.

ほんま ゆうと
東北大学 大学院薬学研究科 分子薬科学専攻
分子解析学講座 医薬資源化学分野
yuto.homma.p2@dc.tohoku.ac.jp

世界的なパンデミックを引き起こしたコロナウイルスによって中断されていた、第36回 European Peptide Symposium / 第12回 International Peptide Symposium (36th EPS/12th IPS) が8月28日から9月2日までの6日間、スペインバルセロナのシッチェスにある Hotel Melia Sitges にて開催されました。私は日本ペプチド学会 Travel Award のご支援の下、若手口頭発表で本学会に参加し、今回執筆の機会をいただきましたので参加報告をいたします。



岡本 英之

開催地であるシッチェスはバルセロナの南西、地中海沿岸に位置し、綺麗なビーチを有するリゾート地です。本学会の開催期間中は、スペイン特有の太陽が照り付けるカラッとした気候で、正に絶好の海水浴日和でした。そのため、ビーチにはたくさんの海水浴客がいました（写真1）。

学会の初日には夕方からオープニングセレモニーがあり、受賞公演を拝聴しました。特に、Ali Tavassoli 先生のご講演は大変興味深く、ペプチド研究の分野に身を置く私にとって有意義な時間でした。その後のウェルカムレセプションでは、スペイン料理のパエリアをワインと共にいただき、長時間の飛行機で疲れた身体を癒しました。

2日目からは学会が本格的に始まり、午前からペプチドに関連する様々な分野の講演を聞きました。自身の研究が世界的に見てどのような立ち位置なのか再確認しました。夜は参加されている先生方と一緒に会場近くのスーパーで買い物をした後、スペインで有名なハムとワイン、そして手作りのお好み焼きを食べました。今回、我々が宿泊した場所は、アパートメントタイプの宿でキッチンや食器が備わっており、現地の食材を使って現地で料理を作る（しかも作った料理がお好み焼き）という普段なら味わえない体験をし



写真1 ビーチの様子

した。

3 日目には若手口頭発表があり、私は“Development of peptide-photooxygenation catalyst conjugates for myostatin inactivation”という題目で発表しました(写真 2)。内容を説明すると、生体内において筋肉量の減少をもたらすマイオスタチンをペプチド-光酸化触媒コンジュゲートによって不可逆かつ選択的に酸化し、不活性化させるという研究です。私にとって初の海外での口頭発表であったため終始とてつもない緊張感に襲われていましたが、この日までに練習してきたことを発揮し発表自体はうまくできたと感じています。しかしながら、質疑応答では私の英語力、特に語彙力や単語力の低さが露わになりました。質問を受け、何を聞かれているかは理解できましたが、その返答を考えている内に英語で表現できない難しい日本語があれこれ浮かんでしまいました。そして、何か答えなきゃと思い、咄嗟に「I don't word」という、今思い返しても意味の分からない返答をしました。私はこのシーンを鮮明に覚えており、今でも非常に悔しい経験として脳に刻まれております。しかし、この経験から自身の弱点を知ることができ、更なる英語力の向上に努めたいという意欲が湧きました。それを踏まえて、自身にとって良い貴重な経験だったと思うことにしました。

4 日目は夕方までフリータイムだったので、電車で一時間ほどかけてバルセロナの市街地へ行き、カタラーナやサングリア等、女子力高めなスペイン料理を堪能しました(写真 3)。さらに、サグラダファミリアを訪れ、外観から内部まで隅々を見学しました(写真 4)。サグラダファミリアは未完成ではありましたが、その荘厳さに思わず息を呑みました(2026 年頃完成予定なので是非訪れてはいかがでしょうか)。その後、夕方に菅裕明先生の基調講演を拝聴し、生理活性物質の探索に有用な新しいディスプレイ法というペプチド研究分野の新潮流を肌で感じました。そして、夜には地中海を一望できるレストランでスピーカーズディナーがあり、講演者の先生方と楽しく会話をしました。

5 日目も 2 日目と同じく、朝から講演を聞き自身の見識を広げました。夜にはバイキング形式のディナーがあり、この学会で知り合った色々な方々と別れを惜しみつつ語り合いました。そして、6 日目のお昼頃、クロージングセレモニーがあり、学会は大盛況で終わりを迎えました。

今回の 36th EPS では自身の英語力の無さを痛感しましたが、舞台上がって研究をご披露する楽しさを知りました。この貴重な経験を基により一層、私自身精進して研究に邁進する所存です。

今回、36th EPS/12th IPS への参加に際して、指導教員の林良雄先生をはじめとする諸先生方のご指導を賜りました。また、オーガナイザーの Meritxell Teixidó 先生およびその関係者の方々には本学会での若手口頭発表という大変貴重な機会をいただきました。さらに、東京大学の菅裕明先生や京都大学の二木史朗先生、本学会で初めて顔を合わせた諸先生方および学生の方々にも大変お世話になりました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

最後に、今回の学会参加は日本ペプチド学会 Travel Award としてご支援いただきました。学会役員ならびに選考委員の先生方、そしてこのような執筆の機会を下さいましたペプチド研究所の吉矢拓先生をはじめ

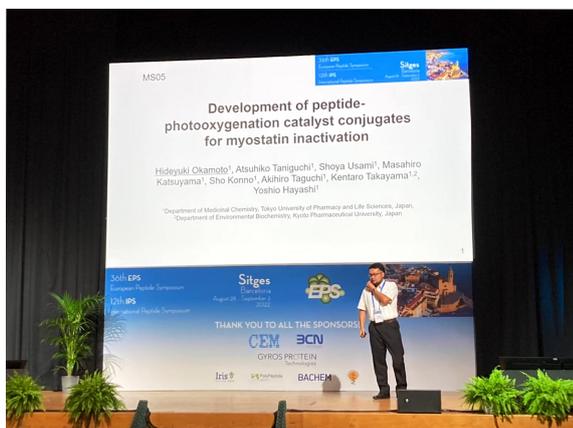


写真 2 実際の発表風景



写真 3 カタラーナ (左) とサングリア (右)



写真 4 サグラダファミリア

とする編集委員の先生方に心より御礼申し上げます。

（
おかもと ひでゆき
東京薬科大学 薬学研究科
薬学専攻 林良雄研究室
y141034@toyaku.ac.jp
https://www.hinka-toyaku.com/）

い1年になりますよう心からお祈りいたします。

127号アンケートフォーム URL :

<https://forms.gle/YnSYX6gQUQzA9b6u6>

(編集委員：薬師寺 文華)

新編集委員



薬師寺 文華

北海道大学大学院薬学研究
院の薬師寺文華と申します。
本年より、児島千恵先生に代
わって PNJ の編集委員を担当
させていただくこととなりま
した。ペプチド学会にこのよ
うな形で携わり、微力ながら
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、ペプチド学会の情報、ま

た関連する研究内容をお届けできるよう努めて参りたい
と思います。どうぞよろしくお願い申し上げます。

日本ペプチド学会からのお知らせ

《2022 年度行事予定》

2023 年 1 月 (予定)

第 112 回理事会

編集後記

あけましておめでとうございます。

コロナ禍も 3 年が過ぎようとしており、マスク姿
やオンラインでのイベントが日常になってきている
最近です。他方、以前の日常も戻りつつあり、喜ば
しいことに学会は対面での開催が増えてきていま
す。第 59 回ペプチド討論会は、土井先生、今野先
生をはじめとした実行委員会ならびに関係者の方々
のご尽力により 3 年ぶりに仙台での対面開催が実
現し、大変有意義な時間を共有することができまし
た。第 36 回 European Peptide Symposium / 第 12
回 International Peptide Symposium もスペイン・
シッチェスで開催され、127 号で参加報告を掲載でき
ることを嬉しく思います。

前に進んでいる感覚が得られるようになり、日々の
モチベーション向上にもつながっているかと思いま
す。今年の干支(卯)のごとく軽やかにジャンプし
て、飛躍・向上の年になると良いですね。

本年が日本ペプチド学会および皆様方にとって、良

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：2023 年 1 月 31 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

後藤 佑樹 (東京大学 大学院理学系研究科)

TEL 03-5841-4338

E-mail : y-goto@chem.u-tokyo.ac.jp

武居 俊樹 (大阪大学 蛋白質研究所)

TEL 06-6879-8602

E-mail : toshiki.takei@protein.osaka-u.ac.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：薬師寺 文華)