



これまでの研究活動を一旦振り返って

1. はじめに

この度ペプチドニュースレターへの執筆の機会を頂きました九州大学の巢山慶太郎先生に厚く御礼申し上げます。特に制約なく何でも書いて良いということでしたので、若手学会員の方々を念頭に、これまでの私の研究の経緯について、まつわる当時の考えや思い出も踏まえつつ紹介させていただこうと思います。とりとめのない話かもしれませんが

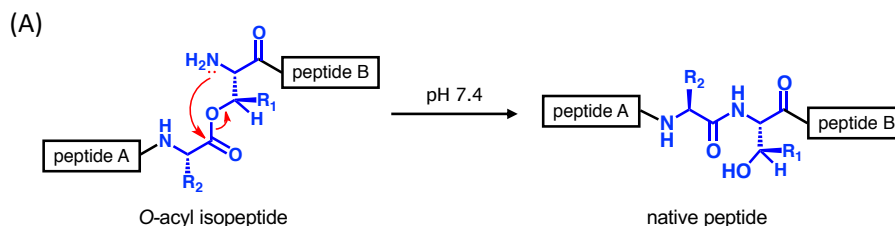


相馬 洋平

が、若手会員の皆様にとって今後の参考となるような内容が含まれていれば嬉しく思います。

2. 最初の約 10 年

ドクターコースの一年生の頃だったと思いますが、当時所属していた研究室（京都薬科大学木曾良明研究室）において、膜貫通ペプチドが固有の高疎水性ゆえに化学合成することが難しいという問題に遭遇していました。そこで親水性の向上を期待して対応する O-アシルイソペプチド（主鎖アミド結合を Ser/Thr 側鎖ヒドロキシ基にてエステル結合へと異性化した構造、図 1A）を合成したところ、意外にも、アミノ基に由来する親水性の向上だけでなく、エステル（O-ア



(B)

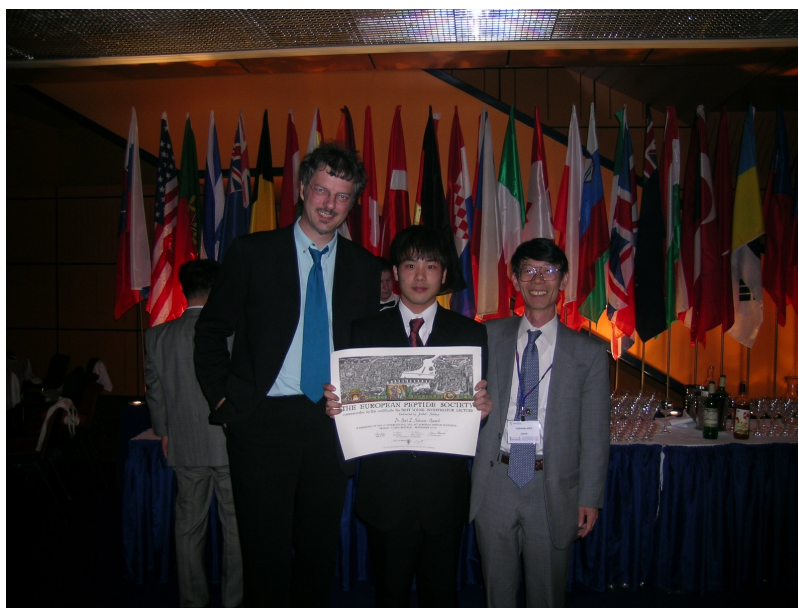


図1 (A) O-アシルイソペプチドからネイティブペプチドへの変換, (B) 第3回国際ペプチドシンポジウム/第28回ヨーロッパペプチドシンポジウムのバンケットにて。左から Morten Meldal 先生 (2022 年ノーベル化学賞), 著者, 木曾良明先生 (当時京都薬科大学教授)

シル) 構造により凝集性が顕著に低下することがわかりました。これにより、O-アシルイソペプチドは、凝集性の高いペプチドの固相合成(縮合/脱保護)効率や HPLC 精製回収率を有意に改善することができました¹。例えば、アルツハイマー病の原因となる凝集性ペプチドであるアミロイドβ (Aβ) の Gly25-Ser26 にてエステル結合を導入した O-アシルイソペプチドを合成すると、たった一箇所のエステル結合により 42 残基からなる Aβ 全体の凝集を強く抑えることができました。さらに、O-アシルイソペプチドは、O-to-N アシル基転位反応によりアミド結合型の(ネイティブな)ペプチドに変換することが出来ました。この成果を 2004 年にチェコ・プラハで開催された第 3 回国際ペプチドシンポジウム/第 28 回ヨーロッパペプチドシンポジウムにて発表したところ、50 回くらい練習した甲斐あってか、Dr. Bert L. Schram Award という国際若手口頭発表賞をいただくことができました(図 1B)。この時、Morten Meldal 教授(2022 年ノーベル化学賞)が審査の取りまとめ役を務められており、発表中 Meldal 教授からエステル形成時のエピメリ化について質問されたことをよく覚えています。皆さんもチャンスがあれば、国際学会の口頭発表に全力で挑戦されると良いと思います。というのは、このような賞によりエンカレッジされることはもちろんですが、海外の色々な研究者がその発表を見てくれます。実際、私の場合、とある学生が発表を見てくれたことが、その後私が Steve Kent 研(シカゴ大学)でポスドクをすることにつながっています(図 2A)。つまり、発表を通して当時の Kent 研の大学院生と仲

良くなり、彼らが私を Steve に推してくれたことで、後日 Steve から直接オファーをいただきました。

Kent 研では天然のインスリン前駆体であるプロインスリンを人工的に模倣したエステルインスリン(またエステルですが)を鍵中間体とするインスリンの化学合成法を創製しました²(図 2B)。30 残基ほどあるプロインスリンの C ペプチドを Glu と Thr の側鎖を使って形成した 1 つのエステル結合で代替することで、プロインスリンよりなお効率的にフォールディングおよび位置選択的なジスルフィド形成反応を進めることができました。また、エステルインスリンは鹼化反応によりインスリンへと定量的に変換することが出来ました。すなわち、自然界が 30 残基ほどのリンカー(C ペプチド)を持つ前駆体を使ってインスリンの位置選択的なジスルフィド形成を行なっているのに対し、我々は分子量がマイナスの人工前駆体でインスリンの位置選択的なジスルフィド形成を実現しました。留学は私にとってかけがえのない機会だったと思います。親友とも呼べる研究仲間ができ、彼らが独立 PI として出している論文を目の当たりにするたび私もエンカレッジされています。また、さらにこの後移る先のポストとなる金井求先生(東京大学薬学系研究科教授)は、私がシカゴで出したこのエステルインスリンの論文を通して、私のことを知っていてくださったそうです。一見分野の異なる人、あるいはすぐには関わり合いのない人を含め、頑張った仕事はどこかで誰かが見てくれているかもしれません。また、それが、人生のターニングポイントにつながる可能性もあると

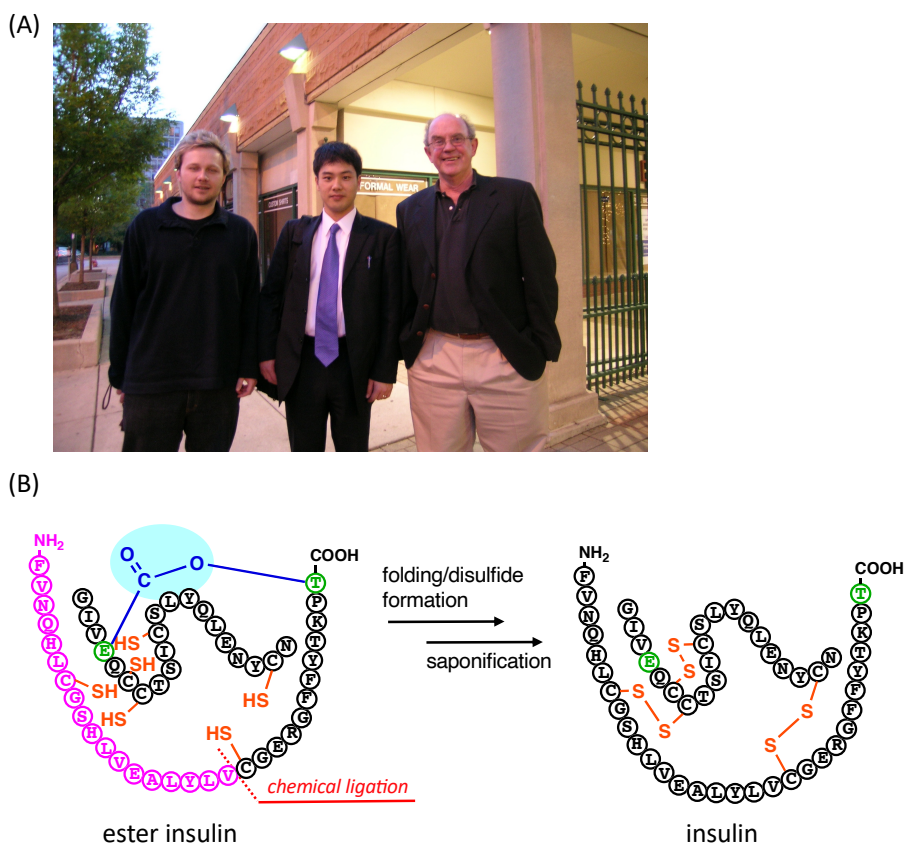


図 2 (A) 留学前、セミナーツアーにてシカゴ大学を訪問した折にて。左から Brad L. Pentelute 先生(当時 Kent 研大学院生, 現 MIT 教授), 著者, Steve Kent 先生(シカゴ大学教授), (B) エステルインスリンを鍵中間体とするインスリンの化学合成法

いうことです。

3. 次の約 10 年

留学から帰国して 2 年ほど経った頃、東大薬の金井先生より、ERATO プロジェクトのグループリーダーとしてオファーをいただきました。おかげさまで、東大に移って 10 年弱の長きに渡り、刺激的で温かい多くのメンバーにも恵まれ、学びと実りの多い充実した研究生生活を送らせていただきました。

ERATO 金井触媒分子生命プロジェクトでは、それまで主に物質生産に力を発揮してきた化学触媒を使って、生体内化学反応ネットワークに介入することを柱の一つとしていました。そこで、私が担当したグループでは、この概念に基づき、有効な治療薬が（ほとんど）ないアルツハイマー病治療法の開発研究に着手しました。これは、私がそれまでに関わった経験のあるアミロイドペプチド（アルツハイマー病原因物質）の研究ノウハウを活かせるであろうと考えたことと、新しい創薬モダリティにつながる概念実証研究でもあるので既存の薬では治療が未到達な疾患を対象にすべきという考えに基づいています。アミロイドは、主に疎水性相互作用により形成されるクロスβシートと呼ばれるβシートの異常な積み重なりを立体構造上の特徴としています。したがって、ペプチド鎖間の相互作用表面に対し親水性の高い酸素原子を導入（＝酸素化）することは、アミロイドのクロスβシートを不安定化することにつながり、結果的にアミロイドの形成阻害や除去促進を誘導すると期待しました。そこで、空気中の分子酸素を酸素原子ドナーとして、光エネルギーを利用することで、アミロイドを酸素化できる化学触

媒（＝光酸素化触媒）の開発研究を進めることにしました³（図 3A）。

この考えに基づいた 2015 年頃までの我々の取り組みは、ペプチドニュースレター 96 号に記載していますのでそちらをご参照ください。2015 年頃までは主に *in vitro* にて光酸素化触媒の改良を行っていましたが、その後現在までは *in vivo* でも有用性を実証できる触媒の創製を目指して検討・改良を進めてきました。本格的な *in vivo* での検討が可能であったのは、東大薬の富田泰輔教授、堀由起子准教授（機能病態学教室）との共同研究のおかげです。まずは、動物個体内でも光酸素化活性を発現できるように、組織透過性の高い長波長光を吸収して酸素化活性を発現することのできる触媒を開発しました^{4,5}。このような光触媒を利用することで、アルツハイマー病モデルマウスの脳内にて Aβ アミロイドの光酸素化を誘導することができました。また、その結果、興味深いことに、酸素化を受けた Aβ は、通常の Aβ と比べてマウス脳内での分解が促進されることがわかりました。このような酸素化 Aβ の分解促進には、脳内ミクログリア細胞による貪食加速が効いていることが分かっています⁵。

光酸素化触媒を治療目的で使用するためには、アミロイド以外の生体分子（オフターゲット）とは反応しないことが求められます。すなわち、生命機能を担っている生体分子を酸素化することは、副作用の出現につながる恐れがあるため、アミロイドに対して選択的に酸素化を進行する触媒が必要になります。そこで、2016 年以降に我々が発表している光酸素化触媒は全て、アミロイドの有無を感知して活性化（あるいは不活性化）される分子設計を取り入れています⁶。すなわちこれらの触媒は、アミロイドのクロスβシート構

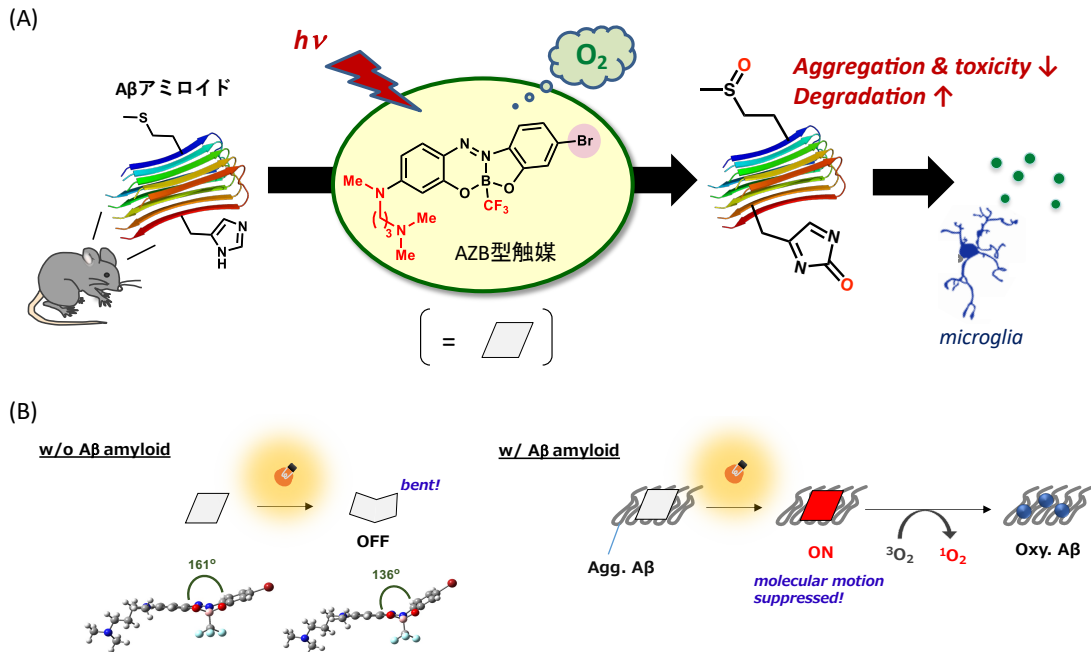


図 3 (A) 空気中の分子酸素を酸素原子ドナーとして、照射条件下、アミロイドを酸素化する AZB 型触媒、(B) AZB 型触媒のアミロイド選択的な酸素化機構。アミロイドが存在しない条件では、照射による励起状態において、触媒の屈曲運動によって緩和するため、酸素化活性を発しない（左側）。他方、アミロイドのクロスβシートと結合することにより、当該分子運動が抑制されることにより、項間交差（臭素原子により促進される）を経て励起三重項状態の触媒濃度が増加する。これが分子酸素にエネルギーを移すことにより、アミロイドの近傍でのみ一重項酸素を産生する（右側）。

造に結合した時だけ一重項酸素を生成する機構に基づき、アミロイドを高い選択性で酸素化することが出来ます。例えば、最近我々が開発した AZB 型触媒⁷は、アミロイドが存在しない条件では、励起状態での平面性構造から折れ曲がり構造への変化を伴う分子運動により緩和が進むのに対し、アミロイドが存在する条件ではこのような分子運動が妨げられる結果、一重項酸素生成経路による緩和が進みます (図 3B)。また、この AZB 型触媒は、低分子量であるため血液脳関門を通過することができ、末梢からの触媒投与と体外からの光照射を組み合わせた非侵襲的な方法によってマウス脳内で Aβ アミロイドの酸素化が可能です。

近年、抗 Aβ 抗体であるレカネマブが、ヒト脳内の Aβ アミロイドを除去することによりアルツハイマー病の進行を抑制するという画期的な臨床試験結果が発表されました⁸。同じく脳内で Aβ アミロイドを除去可能な光酸素化触媒は、低分子量の有機化合物である分、抗体と比べて脳内移行性が高いという優位性があると考えられます。また、低分子量の有機化合物であるがゆえ、合成コストも低く抑えられるため、薬価の面でも抗体と比べて優位性があると考えられます。今後さらに、ヒトでの使用を見据えた触媒の改良を進めてまいりたいと考えています。光酸素化触媒の研究は、共同研究者または私自身によって、2014 年から毎年ペプチド討論会にてそのアップデートを発表することができました。昨年の第 59 回ペプチド討論会では、マウス脳内のタウアミロイドを除去促進する化学触媒を発表しました。

4. おわりに～これからの 10 年に向けて～

振り返るのはこれくらいにして、これから先の 10 年、前だけを見て全力で走ってゆきます。2021 年 4 月より、和歌山県立医科大学薬学部にて研究室を主宰する機会をいただきました。ここ和歌山の地から全く新しいペプチド化学研究を発信する所存です。幸い和歌山県立医科大学薬学部には、思う存分新しい研究に挑戦することのできる環境が十分に整っています。これまで私を育ててくださった先生方や研究仲間、そしてペプチド学会から受けたご恩に報いるためにも、新たなペプチド化学研究を推し進めこれを発信できればと思います。

ところで和歌山県立医科大学薬学部 (伏虎キャンパス) は、和歌山市の中心部に位置し、和歌山城もすぐ目の前にあります。(意外に) 交通の便もよく、新大阪や大阪なんばから 1 時間、関空から 40 分程度でキャンパスの最寄り駅に着くことができます。また、私のラボは 11 階にあるため和歌山城をきれいに眺めることもできます。ですので皆様、お近くにお越しの際は是非ともお立ち寄りください。その際、ペプチド研究のディスカッションができることを楽しみにしています。興味があれば、最近 Steve から送られてきた彼の伝記をお見せします。若手の皆様にとっては今後の参考になるようなことも書かれているかもしれません。それでは、ペプチド学会員の皆様、今後とも何卒よろしくお願い申し上げます。

参考文献

1. Sohma, Y.; Sasaki, M.; Hayashi, Y.; Kimura, T.; Kiso, Y. Chem Commun 2004, 124-125.
2. Sohma, Y.; Hua, Q.-X.; Whittaker, J.; Weiss, M.A.; Kent, S.B.H. Angew Chem Int Ed 2010, 49, 5489-5493.
3. For a review; see: Sohma, Y.; Sawazaki, T.; Kanai, M. Org Biomol Chem 2021, 19, 10017-10029.
4. Ni, J.; Taniguchi, A.; Ozawa, S.; Hori, Y.; Kuni-nobu, Y.; Saito, T.; Saido, T. C.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. Chem 2018, 4, 807-820.
5. Ozawa, S.; Hori, Y.; Shimizu, Y.; Taniguchi, A.; Suzuki, T.; Wang, W.; Chiu, Y. W.; Koike, R.; Yokoshima, S.; Fukuyama, T.; Takatori, S.; Sohma, Y.; Kanai, M.; Tomita, T. Brain 2021, awab058.
6. Taniguchi, A.; Shimizu, Y.; Oisaki, K.; Sohma, Y.; Kanai, M. Nat Chem 2016, 8, 974-982.
7. Nagashima, N.; Ozawa, S.; Furuta, M.; Oi, M.; Hori, Y.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. Sci Adv 2021, 7, eabc9750.
8. Christopher H van Dyck et al., N Engl J Med 2023, 388, 9-21.

(そうま ようへい)
和歌山県立医科大学 薬学部
ysohma@wakayama-med.ac.jp
https://www.wakayama-med.ac.jp/pharm/yakuhinkagaku/

α,α-ジ置換アミノ酸ペプチドの 2 次構造解析と不斉触媒としての応用

はじめに

編集委員の巢山先生から PNJ への寄稿をお願いされたのが、小職は PNJ に 2006 年に「有機化学からペプチド 2 次構造へのアプローチ」について、さらに 2015 年に研究室紹介「配座自由度制限アミノ酸の設計とその機能化を目指して」(長崎大学赴任後の状況)について寄稿しているので、内容が重ならないようにしないといけないと考えた。そこで今回は、現在行っている α,α-ジ置換アミノ酸 (有機化学の命名法からすると二置換アミノ酸あるいは α ア



田中 正一

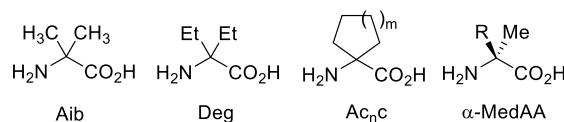


図 1 α,α-ジ置換アミノ酸

ルキル化アミノ酸の方が正しいかもしれないが、この名称を随分前から使っているのをそのまま用いる)を導入したペプチドの2次構造解析とその応用として不斉触媒としての利用についてまとめることを考えた。

アミノ酸アラニンの α 位水素をメチル基に置換したジメチルグリシン(α -メチルアラニン、2-アミノイソ酪酸 Aib)は、ペプチド系抗生物質の構成成分として古くから知られている¹(図1)。このアミノ酸はペプチドの構成成分として発見される前に化学者により合成されており、このアミノ酸は α 位に2つのメチル置換基を有するので、筆者らは α,α -ジ置換アミノ酸と呼んでいる。 α,α -ジ置換アミノ酸には、Aib 以外にジエチルグリシンやジプロピルグリシンなどが報告されており、さらにアミノ酸側鎖構造が環状になった環状ジ置換アミノ酸 Ac_nc (n は環サイズ)などが知られている。これらのアミノ酸はアキラルな化合物であるが、筆者らはキラルな α,α -ジ置換アミノ酸を設計・合成して、アミノ酸のキラル構造とそのペプチドの2次構造の関係を調べている。

ペプチド 2 次構造

キラルな α,α -ジ置換アミノ酸からなるペプチドの2次構造解析では、イタリアの Toniolo らの先駆的な報告がある²。彼らはキラルな α -メチル化ジ置換アミノ酸からなるホモペプチドを合成しその二次構造を調べており、ジ置換アミノ酸の α 位不斉中心により、その

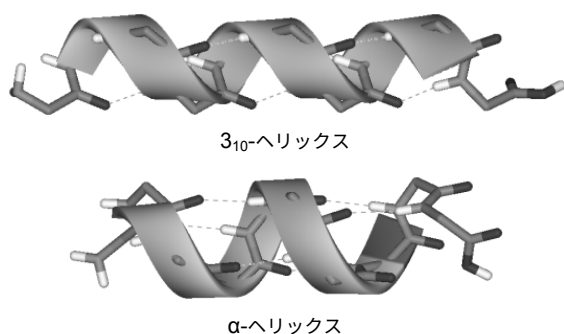


図2 ペプチドのヘリックス2次構造

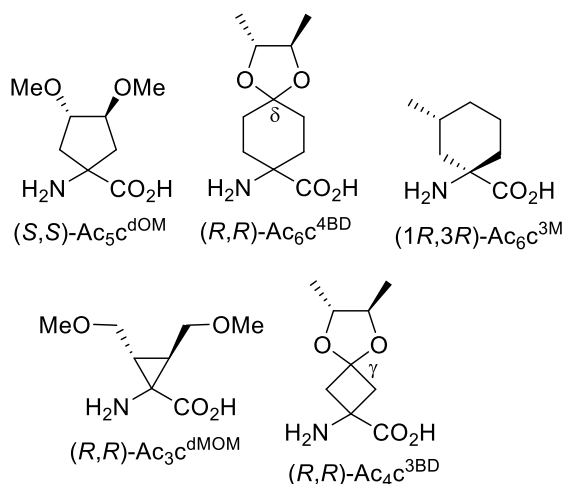


図3 キラルな環状 α,α -ジ置換アミノ酸

ペプチドのヘリックス構造の右巻きあるいは左巻きが制御されることを報告している。また、Aibを通常のL-アミノ酸よりなるペプチド配列に導入すると、Aibの割合が多いと右巻きの3₁₀-ヘリックス構造を、Aibの割合が少ないと α -ヘリックス構造を形成することを報告している(図2)。それに対して、筆者らはAibの代わりに5員環状アミノ酸 Ac₅cを導入すると α -ヘリックス構造を優先して形成することを報告した。

さて、キラルな α -アルキル化 α,α -ジ置換アミノ酸をペプチドに導入しようとするると大問題が生じた。1個の α -アルキル化ジ置換アミノ酸をペプチドの中に導入することは可能であるが、 α 位の置換基としてメチル基以外では立体障害のためにジ置換アミノ酸を連続して複数個導入することは困難であった。院生の頑張りにより激しい反応条件にて長時間反応を行うとペプチドの中に導入することは可能であったが、大量に合成して機能を研究するのは不適であった。それに対して、側鎖が環状になったジ置換アミノ酸は、ペプチドの中に導入しやすいことが分かった³。そこで、側鎖に不斉中心をもつ各種の環状ジ置換アミノ酸を合成して、そのペプチドの2次構造を研究することにした(図3)。各種のキラルな5員環状ジ置換アミノ酸よりなるペプチドは右巻きあるいは左巻きのヘリックス構造を形成することが判明した。さらに、6員環状ジ置換アミノ酸よりなるペプチドも合成して、そのヘリカル2次構造を解析した。しかし、ペプチド合成では6員環状ジ置換アミノ酸は5員環状ジ置換アミノ酸に比較すると、立体障害のためペプチドの中への導入が大変であった。8位にキラルなアセタール構造を持つ6員環状アミノ酸からなるホモペプチドは、結晶化が困難で完全な2次構造の決定は出来なかったが、キラルアセタールの影響で片方の巻き方のヘリックス構造が優先していることが示唆された。

そこで、環サイズを小さくした環状ジ置換アミノ酸を合成して、そのペプチドの2次構造を調べることにした。側鎖3員環上のみ不斉中心を有するジ置換アミノ酸 (R,R)-Ac₃c^{dMOM} よりなるホモペプチドは、歪んだ左巻きのヘリックス構造をとっていた。特に側鎖 MOM 基とペプチド主鎖の NH 間で水素結合が生じており、これがヘリックス2次構造の歪みの原因であるようであった。さらに、3員環状ジ置換アミノ酸よりなるペプチドでは、側鎖に水素結合できる置換基がなくても主鎖のねじれ角は理想的なヘリックスからは歪むようであった。

次に、側鎖不斉中心がペプチド主鎖から近くなった側鎖 γ 位にアセタール構造を持つ4員環状ジ置換アミノ酸 (R,R)-Ac₄c^{3BD} からなるホモペプチドの二次構造について調べた⁴。X線解析に適した結晶はなかなか得られなかったが、CHCl₃/n-hexaneより再結晶すると良い結晶が得られ、このヘプタペプチドは、側鎖上に14個もの不斉中心を持つがヘリックスの左右の巻き方の方向性は制御できず、結晶中でジアステオメリックな左右の巻き方のペプチドが1対1で存在していた。

ペプチド触媒

ヘリカルペプチドを不斉分子触媒として利用することを考えた。ヘリックスペプチドの不斉触媒としての利用では, Juliá-Colonna らのカルコンの不斉エポキシ化が知られているが⁵, 環状アミノ酸を導入した L-Leu ペプチドでも高エナンチオ選択的エポキシ化反応が進行する。しかし, このペプチドの不斉エポキシ化以外への展開はほとんど進んでいなかった。工藤らは, 筆者らが報告していた $-(L\text{-Leu-L-Leu-Aib})_n$ -シークエンスを導入したヘリックスペプチドを樹脂上で合成し, この樹脂担持ペプチドを用いたニトロメタンの高エナンチオ選択的 1,4-付加反応を報告している⁶。彼らは, ペプチドの 2 次構造を 3_{10} -ヘリックスと推定しているが詳細な実験結果は示されていない

かった。筆者らは, 5 員環状アミノ酸 Ac₅c を導入したペプチド H-(L-Trp)₂-(L-Leu-L-Leu-Ac₅c)₂-OMe を合成し, 不斉触媒として利用した。この右巻きの α -ヘリックス構造をとるペプチドはニトロメタンの高エナンチオ選択的 1,4-付加反応を触媒することが分かった⁷ (図 4)。さらに, 5 員環状置換アミノ酸を導入したヘリックスペプチド触媒はマロン酸ジエステルの環状エノンへの 1,4-付加反応でも高いエナンチオ選択性を示した。

応用できる不斉反応の展開を図るために, N 末に触媒基としてチオウレア部位を付加したペプチドを設計合成し, ニトロステレンとマロン酸エステルとの不斉 1,4-付加反応を検討した。このペプチド触媒を用いると幅広いニトロステレン基質において高い鏡像体過剰率の 1,4-付加体が得られ, ペプチド触媒を X 線解析し

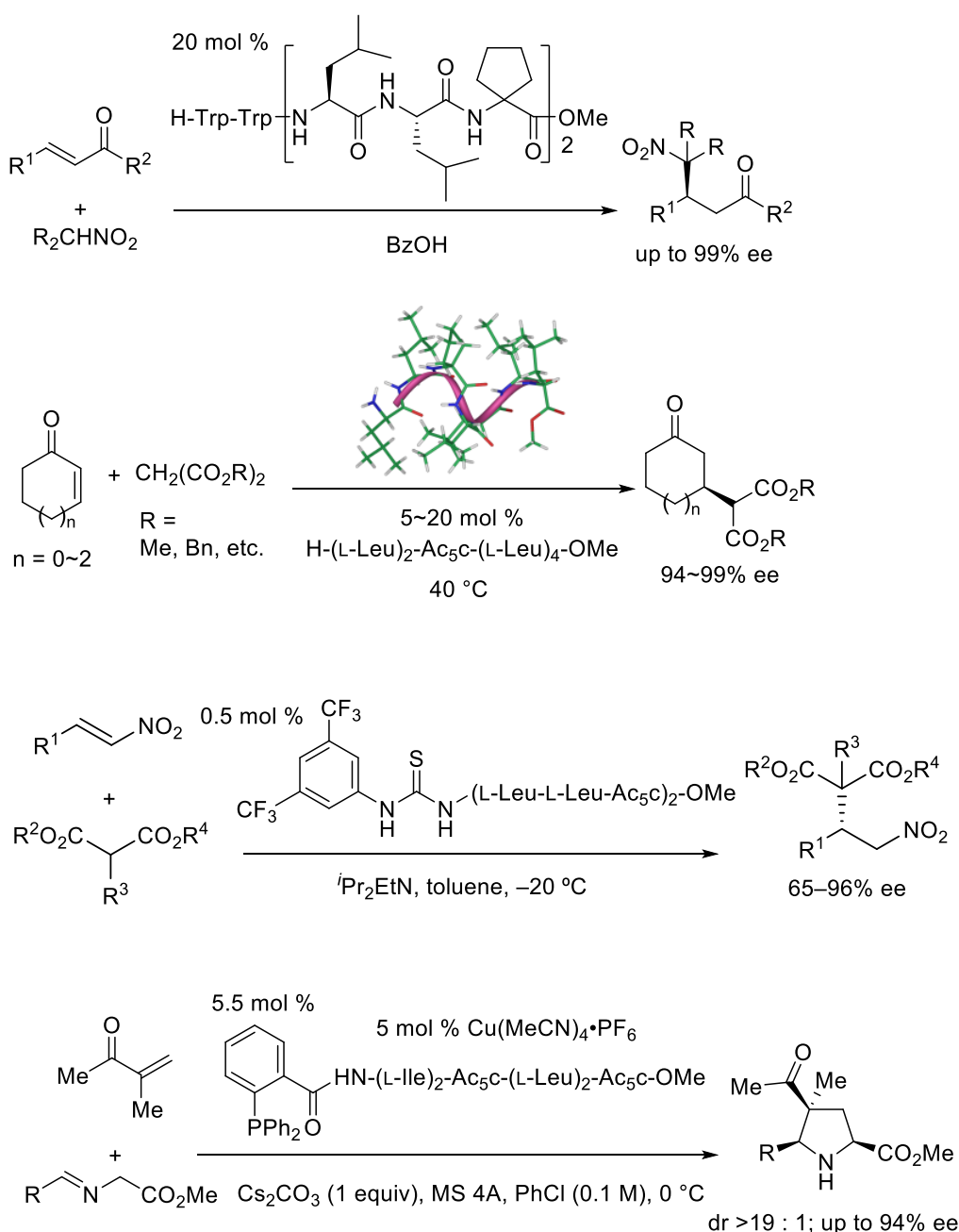


図 4 ヘリカルペプチドによる不斉触媒反応

たところ、右巻きの 3_{10} -ヘリックス構造をとっていることが判明した⁸。

さらなるペプチド触媒の展開を期待して、ヘリックスペプチドのN末に金属へ配位できるリン配位子部位を付けたペプチドを合成した。このペプチドでは、配位子が配位する金属とヘリックス構造の2点で触媒の調整が可能である。ヘリックスペプチドのN末にリン配位子を付けた配位子を用いると、銅触媒によるイソプロベニルメチルケトンとグリシンイミノエステルとの不斉[3+2]付加環化反応は高収率で進行し、高ジアステレオ選択的、且つ高エナンチオ選択的なピロリジン誘導体を与えた⁹。

まとめ

環状ジ置換アミノ酸を合成して、ペプチドに導入すると安定なヘリックス2次構造をとることが分かった。そして、このヘリックスペプチドの応用として、不斉触媒としての利用を行った。特に、2次構造を形成したヘリックスペプチドを修飾すると従来知られていないような触媒能を創出することが可能となった。環状ジ置換アミノ酸は固相合成法への適用が可能であり、細胞膜透過性ペプチドとしての利用も可能であり、大庭 誠教授(京都府立医科大学)と共同研究を行っている。最後に、長崎大学薬化学研究室にて日夜実験に励んでくれた院生諸氏、並びに、上田篤志准教授にこの場を借りて深謝申し上げます。また、X線結晶解析は大阪医科薬科大の土井光暢教授、加藤巧馬博士との共同研究の賜であり御礼申し上げます。

参考文献

1. 田中正一 有機合成化学協会誌 2002, 60, 125-136.
2. Toniolo C.; Crisma M.; Formaggio F. et al. *Biopolymers* 1993, 33, 1061-1072.
3. 田中正一; 上田篤志 *ファインケミカル* 2019, 48, 31-40.
4. Eto R.; Oba M.; Ueda A.; Tanaka M. et al. *Chem Eur J* 2017, 23, 18120-18124.
5. Juliá S.; Colonna S. et al. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* 1982, 1317-1324.
6. Akagawa K.; Suzuki R.; Kudo K. *Asian J Org Chem* 2014, 3, 514-522.
7. Ueda A.; Umeno T.; Tanaka M. et al. *J Org Chem* 2016, 81, 6343-6356.
8. Sato K.; Umeno T.; Ueda A.; Tanaka M. et al. *Chem Eur J* 2021, 27, 11216-11220.
9. Unpublished data

たなか まさかず
長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科
生命薬科学専攻 分子創薬科学講座
薬化学研究室
matanaka@nagasaki-u.ac.jp
<https://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/biomimic/index-j.html>

標的タンパク質分解薬 PROTAC

1. タンパク質分解薬 PROTAC

多くの細胞内タンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系と呼ばれる経路によって分解されている。すなわち、ヒトでは600種類以上あるユビキチンリガーゼは、基質タンパク質に特異的に結合し、ポリユビキチン鎖を付与する。加水分解酵素を含む複合体プロテアソームは、ポリユビキチン化されたタンパク質を分解する。このユビキチン-プロテアソーム系を利用したタンパク質分解薬 PROTAC (Proteolysis Targeting Chimera) の研究が、近年注目されている。

PROTACは、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質に対するそれぞれのリガンドをリンカーで連結した分子であり、標的タンパク質のポリユビキチン化・プロテアソーム分解を誘導する¹(図1a)。これまでの多くの低分子医薬(鍵)は、疾患関連タンパク質のポケット(鍵穴)に結合してその機能を制御するメカニズムであった。これに対してPROTACは、タンパク質存在量減少による薬効増強・持続、触媒作用、足場タンパク質や転写因子などポケットを持たない undruggable なタンパク質への適用などが期待されている。

最初のPROTACは2001年に、Yale大学のCrews博士らによって報告された。ユビキチンリガーゼSCF(Skp1-Cullin1-F-box)複合体の一種SCF^β-TRCPと、VHL(von Hippel Lindau)に着目し、これらユビキチンリガーゼが認識する基質タンパク質上のペプチド配列と、標的タンパク質(メチオニウムペプチダーゼ:MetAP, FK506結合タンパク質:FKBP)に対するリガンドを連結したペプチド性PROTAC **1**, **2**を設計した(図1b)。そしてこれらPROTACが、標的タンパク質の分解を誘導することを報告した^{2,3}。本研究は先駆的であるものの、細胞膜透過性などペプチド構造・高分子に由来する課題があった。PROTAC **2**に関しては、膜透過性ペプチド(オリゴアルギニン)の連結により生細胞系で活性を示すことに成功した。

2. 低分子 PROTAC の創製

筆者らのグループ(当時東京大学分子細胞生物学研究所の橋本祐一研究室と内藤博士)は独自に、ユビキチンリガーゼであるcIAP1(cellular inhibitor of apoptosis protein 1)のリガンドであるベスタチンメチルエステル **3**を利用したPROTACを発案した(図2a)。cIAP1はアポトーシスを阻害することから抗がん薬の標的として注目されているが、**3**はcIAP1



石川 稔



友重 秀介

のポリユビキチン化・プロテアソーム分解を引き起こす⁴。本作用を考慮し、標的のがん関連タンパク質から選定することに決め、細胞内レチノイン酸結合タンパク質 (CRABP: cellular retinoic acid binding protein) を選択した。CRABP は、全トランス型レチノイン酸 (4) を核内に移行させる基質結合タンパク質である。CRABP は神経芽腫細胞の遊走に関与

しているとの報告があるが、この作用は 4 非依存的である。以上、リンカーを介して 3 と 4 を連結させた低分子 PROTAC 5 を設計・合成した。研究開始後に PROTAC の上記先行研究を知ったが、PROTAC の低分子化とがんに対する作用を志向して研究を継続することにした。そして、生細胞株を用いた実験系において、5 が CRABP と cIAP1 の両方を減少させることを

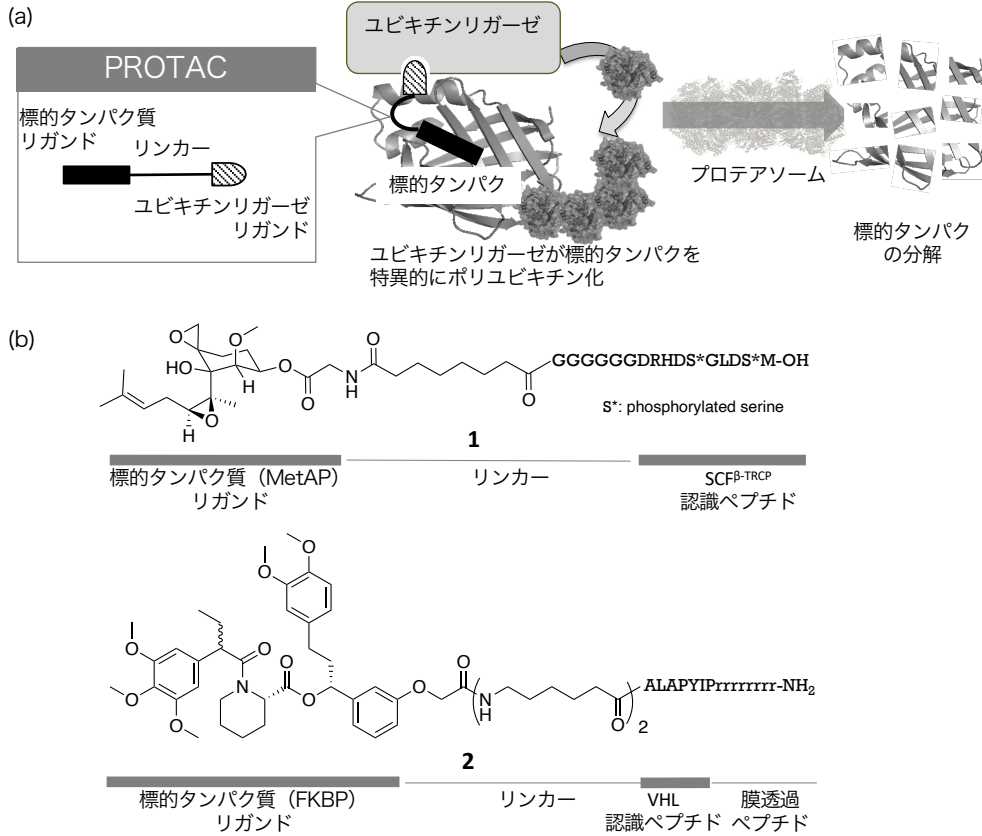


図1 PROTAC の概念図とペプチド性 PROTAC

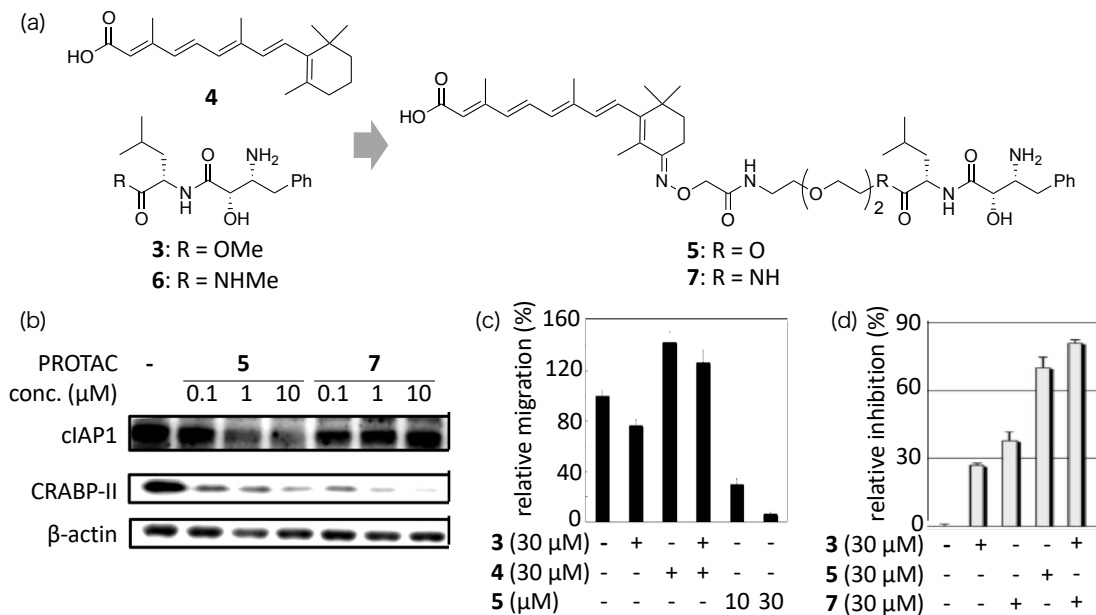


図2 低分子 PROTAC の創製

見出した (図 2b)。更に、ヒト神経芽腫細胞に対する遊走阻害作用を評価したところ、**5** は濃度依存的に遊走を阻害することが明らかになった (図 2c)。以上、筆者らは低分子 PROTAC を 2010 年に報告し、阻害剤の知られていないがん関連タンパク質に対してタンパク質分解アプローチが有効である可能性も提案した⁵。

3. cIAP1 とがん関連タンパク質を同時に分解するデュアル PROTAC の意義

次に、がん以外の疾患を標的とする場合も想定し、cIAP1 を分解することなく標的タンパク質のみ分解する PROTAC の創製を目指した。詳細は割愛するが、cIAP1 を分解しない cIAP1 リガンド **6** と **4** を連結した PROTAC **7** (図 2a) が、0.1 μM の濃度で CRABP を減少させた一方で、10 μM の濃度で cIAP1 を減少させないことを見出した⁶ (図 2b)。また、**7** を神経芽腫細胞に処理したところ、濃度依存的にこの増殖を抑制した。そこで次に、増殖抑制作用に対する cIAP1 と CRABP の寄与を考察した。cIAP1 と CRABP の両方を減少させる条件 (**5** の単独処理もしくは **3** と **7** の併用処理) の方が、cIAP1 と CRABP の片方を減少させる条件 (**3** と **7** の単独処理) よりも増殖抑制作用が強いことが明らかになった (図 2d)。すなわち、cIAP1 とがん関連タンパク質を同時に分解するデュアル PROTAC が、抗がん薬として優れている可能性が示唆された。これは、後述する他グループが開発した低分子 PROTACs (ユビキチンリガーゼとして VHL もしくはセレブロンを利用) には無い特長と考えられる。

4. 神経変性タンパク質を分解する PROTAC の創製

神経変性疾患は、神経細胞の脱落などによって認知障害や運動失調などの神経・精神症状を呈する難治性の疾患群である。ハンチントン病は、41 以上のグルタミン連続配列を遺伝的に有する変異ハンチンチン (mHtt) が、凝集性の高い β シート構造に富む折りたたみ不全構造に変性し、高毒性の可溶性凝集体を経て、難溶性凝集体が神経細胞内に蓄積し、不随意運動を引き起こす疾患である。著者らのグループは、神経変性タンパク質 mHtt を分解する PROTAC の創製を目指した。この分子設計において、mHtt に対する低分子リガンドが知られていないため、代わりに凝集タンパク質の特徴的構造 (連続する β シート構造) に特異的に結合する神経変性疾患診断薬に着目し、神経変性疾患診断薬と cIAP1 リガンド **6** を連結した PROTAC **8**, **9** を設計・合成した (図 3a)。68 のグルタミン連続配列を有する mHtt (68Q mHtt) や 47Q mHtt を発現している細胞、緑色蛍光タンパク質融合 145Q mHtt のエクソン 1 を遺伝子導入した細胞に、**8**, **9** を処理したところ、それぞれの条件で mHtt 量が減少することを見出した (図 3b)。さらに PROTAC **8** 処理によって、蛍光顕微鏡で輝点として観測される凝集体数も有意に減少すること (図 3c) を見出した⁷。次に、グルタミン連続配列を遺伝的に有する他の神経変性タンパク質である変異 ataxin-3, 変異 ataxin-7, 変異 atrophin-1 を発現する細胞に **8**, **9** をそれぞれ処

理したところ、これら神経変性タンパク質を減少させることが明らかになった⁸。以上、PROTAC を用いた神経変性疾患の治療可能性を提案できたと考えている。

さて、これら神経変性疾患を対象とした PROTAC は、患部に到達するために血液脳関門を通過する必要がある。PROTAC は中枢薬らしくない物理化学的性質を有しており、実際に脳移行性が乏しいことが明らかになった。そこで筆者らは次に、血液脳関門を通過するタンパク分解薬の創製を目指した。折りたたみ不全タンパク質は、疎水性アミノ酸側鎖が外側に担持されている構造的特徴を有し、シャペロンタンパク質によって疎水性構造が認識されることが起点となり、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される。疎水性タグ法は、疎水性アミノ酸側鎖を模倣した「疎水性タグ」と標的タンパク質リガンドを連結した低分子が、上記のタンパク質品質管理機構を模倣して標的タンパク質を分解誘導する手法である⁹。cIAP1 リガンド **6** と比較して疎水性タグは中枢薬にふさわしい物理化学的性質 (より小さい分子量, 少ない水素結合受容体数・供与体数) であることから、PROTAC の脳移行性を改善できると期待した。このように設計・合成した疎水性タグ連結分子 **10** は、生細胞中の mHtt 量と凝集体数を減少させ、また脳移行性を示すこと (脳/血漿間薬物濃度比 (マウス Kp,brain) = 4.89) も確認された¹⁰。近年、他グループからも神経変性タンパク質を標的としたタンパク質分解薬が報告されている¹¹。一例を挙げると、2019 年には Haggarty 博士により、神経変性疾患診断薬とサリドマイドを連結させ

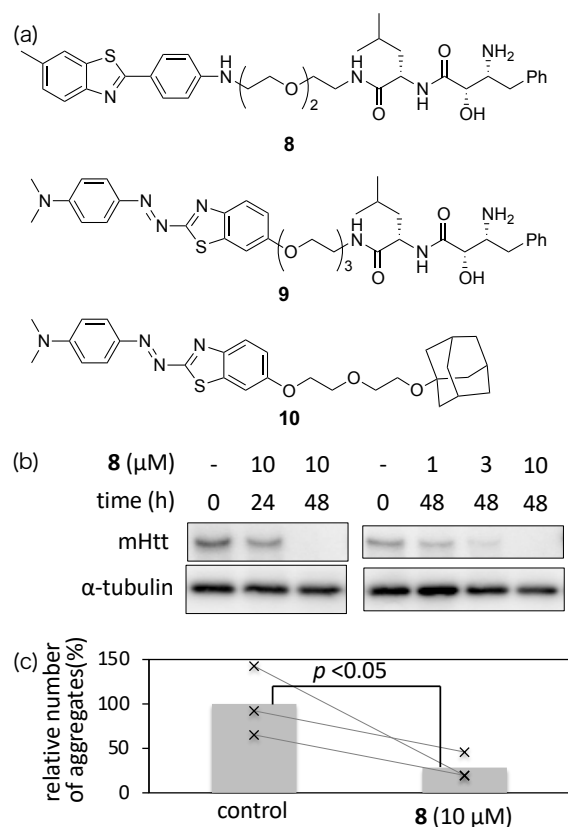


図 3 神経変性疾患を標的としたタンパク質分解薬

た低分子 PROTACs が、アルツハイマー病の原因タンパク質であるタウを減少させ、神経細胞保護作用を示すことが報告された。

5. おわりに

本稿では、タンパク質分解薬 PROTAC について、著者らの研究を中心にまとめた。PROTAC の発展には多くの研究者が貢献しているが、筆者らも、1) PROTAC の低分子化、2) cIAP1 が PROTAC に利用できること、3) cIAP1 とがん関連タンパク質を同時に分解するデュアル PROTAC が抗がん剤として有望である可能性、4) 「鍵と鍵穴創薬」では対応できない undruggable なタンパク質にも適用できる PROTAC の特長（タンパク質の機能を制御できないリガンドの利用、また難病である神経変性疾患の原因タンパク質も減少できること）を示し、PROTAC 研究に部分的に貢献できたと自負している。

2015 年、Bradner 博士と Crews 博士はそれぞれ独立して、ユビキチンリガーゼであるセレブロンや VHL に対する低分子リガンドを、標的タンパク質リガンドに連結した低分子 PROTAC を報告した。これら低分子 PROTAC の特徴として、nM オーダーの低濃度で分解活性を示すこと、動物モデルにおいても有効性を示すことが挙げられる。このブレークスルーを契機に多くのグループが PROTAC 研究に参入し、2022 年に米 Arvinas 社によりアンドロゲン受容体を標的とした PROTAC を用いた第二相臨床試験が開始された。近年の低分子 PROTAC 研究の動向については、優れた総説を参照されたい¹。

ペプチド性 PROTAC が報告されてから 20 年以上経過した。PROTAC 研究を回顧すると学ぶ点が多々あるが、その一つがペプチドリガンドを用いてコンセプトを迅速に証明した点である。PROTAC 研究の発展を受け、薬物複合体の研究が今後益々発展すると思われる。この際、低分子リガンドが発見されていないタンパク質のリガンドとして、基質タンパク質のペプチド配列は益々重要な意味を持つと思われる。同時に、ペプチド創薬のノウハウや、ペプチド分子の送達技術も益々注目されると考えている。

謝辞

本稿の前半部分は、東京大学分子細胞生物学研究所生体有機化学研究分野で行われたものであり、橋本祐一名誉教授に感謝申し上げます。また研究を行なった卒業生（佐藤伸一博士（現東北大学助教）、伊藤幸裕博士（現大阪大学准教授）、北口梨沙氏、大金賢司博士（現お茶の水大学講師）、野村さやか氏（現防衛医科大学校助教）、山下博子博士）に深謝致します。後半部分は現職で行われたものであり、佐藤伸一助教（兼任）、平井景梧氏、三島祐悟氏に感謝致します。また、発案段階からの共同研究者である東京大学の内藤幹彦特任教授に感謝致します。本研究は、JSPS 科研費 JP18H05502, 22H00436, AMED-CREST の課題番号 JP21gm1410007 の支援を受けたものです。

参考文献

1. Békés, M.; Langley, D. R.; Crews, C. M. *Nat Rev Drug Discov* 2022, 0123456789.
2. Sakamoto, K. M.; Kim, K. B.; Kumagai, A.; Mercurio, F.; Crews, C. M.; Deshaies, R. J. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98, 8554–8559.
3. Schneekloth, J. S.; Fonseca, F. N.; Koldobskiy, M.; Mandal, A.; Deshaies, R.; Sakamoto, K.; Crews, C. M. *J Am Chem Soc* 2004, 126, 3748–3754.
4. Sekine, K.; Takubo, K.; Kikuchi, R.; Nishimoto, M.; Kitagawa, M.; Abe, F.; Nishikawa, K.; Tsuruo, T.; Naito, M. *J Biol Chem* 2008, 283, 8961–8968.
5. Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Naito, M.; Hashimoto, Y. *J Am Chem Soc* 2010, 132, 5820–5826.
6. Itoh, Y.; Ishikawa, M.; Kitaguchi, R.; Sato, S.; Naito, M.; Hashimoto, Y. *Bioorg Med Chem* 2011, 19, 3229–3241.
7. Tomoshige, S.; Nomura, S.; Ohgane, K.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. *Angew Chem Int Ed* 2017, 56, 11530–11533.
8. Yamashita, H.; Tomoshige, S.; Nomura, S.; Ohgane, K.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. *Bioorg Med Chem* 2020, 28, 115175.
9. Neklesa, T. K.; Tae, H. S.; Schneekloth, A. R.; Stulberg, M. J.; Corson, T. W.; Sundberg, T. B.; Raina, K.; Holley, S. A.; Crews, C. M. *Nat Chem Biol* 2011, 7, 538–543.
10. Hirai, K.; Yamashita, H.; Tomoshige, S.; Mishima, Y.; Niwa, T.; Ohgane, K.; Ishii, M.; Kanamitsu, K.; Ikemi, Y.; Nakagawa, S.; Taguchi, H.; Sato, S.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. *ACS Med Chem Lett* 2022, 13, 396–402.
11. Tomoshige, S.; Ishikawa, M. *Angew Chem Int Ed* 2021, 60, 3346–3354.

いしかわ みのる
東北大学 大学院生命科学研究科
minoru.ishikawa.e4@tohoku.ac.jp
https://www.agri.tohoku.ac.jp/ishikawa-lab/
ともしげ しゅうすけ
東北大学 大学院生命科学研究科
stomoshi@tohoku.ac.jp

組換え抗菌ペプチドの効率的な発現技術と NMR 解析への応用

はじめに

生物界に広く存在し、抗微生物活性を有する抗菌ペプチドは、本学会においても多くの先生が素晴らしい研究を進められてきた興味深い研究対象である。アミノ酸残基数が少ないことから、主に固相合成により生産されたペプチドが研究に利用されることが多い。しかし我々のグループでは、より高度な NMR 法による解析を用いるため、 ^{15}N や ^{13}C による安定同位体標識試料調製が容易な遺伝子組換え抗菌ペプチドの生産法の研究に積極的に取り組んできた。



相沢 智康

1. 組換え抗菌ペプチド発現の問題点

組換え抗菌ペプチド生産で問題となる点は、その活性が宿主へ与える毒性である。また、抗菌ペプチドは微生物表面との相互作用に有利な正電荷に富んだ配列を有することが多く、発現宿主内のプロテアーゼによる分解を受けやすいことも問題となる。特に、標的微生物の膜との相互作用時にのみ安定な立体構造を形成する抗菌ペプチドも多く、この場合は発現宿主内では立体構造を有しないため、プロテアーゼ耐性が低いと考えられる。また、天然状態ではジスルフィド架橋により安定化された構造を有する抗菌ペプチドの場合にも、還元環境の宿主細胞内では分解を受けやすいと考えられる。

2. 融合発現による分解と毒性の抑制

このようなことから、大腸菌を宿主とした発現系で抗菌ペプチドを生産する場合には、単独発現ではなくキャリア蛋白質との融合発現により生産する方法が広く用いられる。キャリア蛋白質の付加による安定化の効果と同時に、抗菌ペプチドの活性を阻害し宿主への

毒性を低減する効果も期待される。遺伝子組換えによる抗菌ペプチド生産に関するデータベースによると、大腸菌を宿主とした組換え発現系において報告が最も多いキャリア蛋白質は thioredoxin (Trx) であり、大腸菌融合発現のおよそ 20% を占める¹。融合発現に一般に広く用いられる glutathione S-transferase (GST) と比較して約 2 倍もの割合で発現成功例が報告されているのは、酸性蛋白質である Trx が塩基性の高い抗菌ペプチドの発現に効果的である可能性が示唆されている。

我々のグループは calmodulin (CaM) が抗菌ペプチドの可溶性発現のためのキャリア蛋白質として有用であることを報告してきた^{2,3}。CaM は、真核生物に広く存在する約 17 kDa の酸性の Ca^{2+} 結合蛋白質で、 Ca^{2+} 結合部位を持つ 2 つの球状ドメインをフレキシブルな領域がつなぐダンベル様の構造を有している。CaM は Ca^{2+} の濃度変化にตอบสนองし構造変化を起こし、その標的結合部位で多様なターゲット蛋白質の多様な標的配列を包み込むような構造を形成する (図 1)。この標的配列は、偶然にも抗菌ペプチドと類似した塩基性に富む両親媒性構造を有するという物理化学的特徴を有しており、実際、CaM は多様な抗菌ペプチドに対して高い親和性を有している。そこで、CaM と抗菌ペプチドの相互作用による毒性や分解の回避を期待して、大腸菌を宿主とし T7 プロモーターを用いて CaM をキャリア蛋白質として付加する融合発現系を構築した。この発現系を用いることで、極めて多様な抗菌ペプチドの効率的な生産に成功しており、CaM が広範な抗菌ペプチドの生産に活用可能な可溶性キャリア蛋白質であることを明らかにした。

3. 共発現による封入体形成促進法

可溶性での生産とは逆に、封入体形成能の高い不溶性のキャリア蛋白質を積極的に用いて、抗菌ペプチドとの融合蛋白質を不溶化し毒性と分解の両方の抑制を狙う手法も多く用いられている¹。不溶性キャリア蛋白質を用いて封入体を得るさらなる利点として、破碎菌体から遠心分離のみで精製可能なこと、含まれる蛋白質の種類が可溶性画分と比較して少なく精製の過程を簡素化可能なことが挙げられる。

しかし、キャリア蛋白質を用いてペプチドを生産する場合、可溶性、不溶性に係らず最終的にはその切断と除去が必要となる。また、可溶性発現では factor Xa, thrombin, TEV protease, enterokinase といった酵素切断が利用可能だが、不溶性発現では、変性剤存在下での可溶化が一般的であり、酵素を用いた切断が困難なことから、臭化シアン処理等による化学的切断が用いられることが多く、誤切断や切断効率などが問題となることも多い⁴。

そこで我々は、キャリア蛋白質の切断が不要となるように、融合ではなく共発現により抗菌ペプチドの封入体形成を促進する手法の検討を進めてきた⁵⁻⁸。封入体形成能が高い蛋白質として、種々の α -lactalbumin (LA) 及び lysozyme (LZ) を選択した。これらの蛋白質は、高い相同性を有するが、ヒト及びウシ由来 LA は酸性側に等電点を持つのに対し

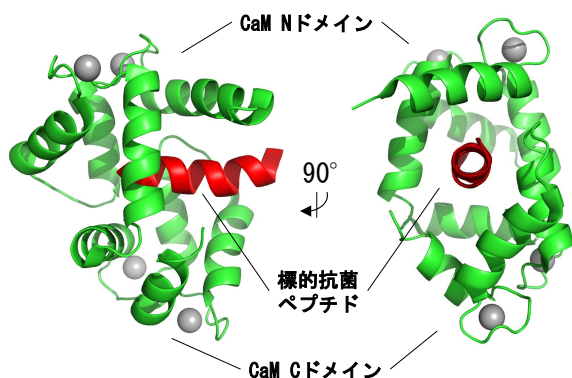


図1 CaM の抗菌ペプチド結合状態の模式図。CaM (緑)、 Ca^{2+} (灰)、標的抗菌ペプチド (赤)

て、ウシ由来 LZ は中性、ヒト由来 LZ は塩基性であり、共発現するパートナー蛋白質の電荷の影響を検証するのに適当である。大腸菌を宿主とし、T7 プロモーターを用いて目的抗菌ペプチドと各パートナー蛋白質を共に誘導発現させる発現系を構築し種々の検討を行った。線虫 *Caenorhabditis elegans* 由来の 67 残基の塩基性の抗菌ペプチド antibacterial factor-2 (ABF-2) を用いた共発現の効果の検討では、酸性の等電点の LA を共発現させた場合には、単独発現と比較して顕著な発現量の増加が確認された (図 2a)。これに対して、中性や塩基性の LZ の共発現では、ABF-2 の封入体増加への効果はわずかであり、効率的な封入体形成には、逆の電荷をもつパートナーが効果的であることが確認された。この手法で逆電荷のパートナー蛋白質の効果が高いことは精製での分離でも、異なる等電点のためイオン交換クロマトグラフィーにより簡便に分離が可能な点で利便性が高い (図 2b)。

その後の検討で、共発現を利用した封入体形成では、上述の静電相互作用のみでは封入体形成が不十分である例も多いことが明らかになってきた。例えば、 α -defensin に属するマウスの腸管由来の抗菌ペプチド cryptdin (Crp) ファミリーの生産の例では、6 種類あるアイソフォームの中でもその生産量に大きな差があった⁸。無細胞発現系を用いた検討からリボソームでの合成が成功しているにも関わらず封入体形成の効率が低い場合があることが確認されたため、さらに封入体形成の効率を高める検討を行った。Crp は配列中に 6 つのシステインを含むことを利用し、発現宿主として菌体内が酸化的環境である菌株を用いることで、パートナー蛋白質の HLA との間に誤ったジスルフィド架橋を形成させ、封入体の効率的形成と収量の

増加に成功した。

4. 酵母を宿主とした分泌発現

複数のジスルフィド結合を有する抗菌ペプチドの生産では、翻訳後修飾の機能が低い酵母を用い、分泌シグナルを利用した分泌型での報告例も多い。蛋白質の高収量の報告が多いメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を宿主とした抗菌ペプチドの生産例が多く報告されている。*P. pastoris* はメタノールの資化に必要なアルコール酸化酵素遺伝子の強力なプロモーターが利用可能なことに加え、高密度培養法による効率な生産が可能である⁹。NMR 用の安定同位体標識が可能な培地も簡便に利用可能である¹⁰。

我々のグループでも溶菌活性を有する種々の生物由来のリゾチーム^{11,12}や線虫由来抗菌ペプチド¹³の生産などに成功してきた。最近の研究例として、植物由来 gibberellin regulated protein (GRP) ファミリーに属する抗菌ペプチドの生産について紹介する¹⁴。GRP は植物に広く保存されるペプチドで発生や分化、ストレス応答等の機能等が報告されているが、ジャガイモ由来の GRP である snakin-1 (SN1) は、その抗菌活性を指標として抗菌ペプチドとして発見された。全長約 60 残基のペプチドでありながら、12 個ものシステインを含み、それらが複雑なジスルフィド結合を形成しているという特徴を持つ。また、スギ花粉やモモ果実等に含まれる GRP がヒトに対してはアレルギーとなることから注目されている¹⁵。SN1 については、大腸菌発現系や固相合成による生産の報告があるが、より効率的な生産の可能性を検討するため *P. pastoris* を宿主とした分泌系での発現を試みた。酵母由来で発現成功例の報告の多い α -ファクタープレプロ配列を利用し、分泌型での発現を検討した。ジャーファーマンターを用いた高密度培養を行い、48 時間に渡りメタノールでの誘導を行い、最終的な菌体の湿重量は 300 g/L 程度に到達した。等電点 8.97 の SN1 を陽イオン交換クロマトグラフィーで培地上清より回収した後、逆相クロマトグラフィーにより最終精製を行うことで、培地 1L あたり約 40 mg の SN1 を得た。得られた SN1 と天然の SN1 の NMR スペクトルの比較を行い両者間で良い一致が見られたことから、得られた組換えペプチドは天然型の構造を有していると判断した。SN1 は抗真菌活性を有するため、*P. pastoris* に対しても活性を示すが、培地中への分泌での濃度は最小生育阻害濃度以下であること、培地中の高濃度の塩などで活性が阻害されることなどから、培養には悪影響を与えなかったと推測している。

5. 安定同位体標識抗菌ペプチドの NMR 解析への応用

組換え発現により得られた安定同位体標識試料ペプチドは NMR 法による立体構造・相互作用解析に有用である。我々の研究として、抗菌ペプチドのモデルとして研究例が多く、微生物の検出技術への応用研究^{16,17}なども進められている線虫由来 cecropin P1 (CP1) の例を紹介する。CP1 の膜相互作用時の構造や相互作用を解析するために、安定同位体標識 CP1

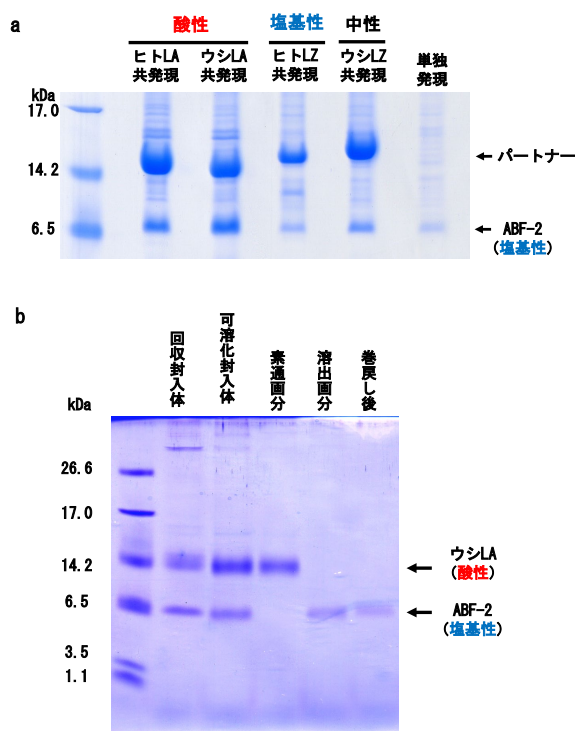


図 2 共発現による封入体形成促進効果とその精製。(a) 各パートナー蛋白質による封入体形成促進効果の比較、(b) 精製の各段階の比較

を用いて DPC ミセルやグラム陰性菌外膜を構成する LPS ミセルといった膜模倣環境を利用した研究を進めた^{3,18}。DPC ミセルとの相互作用解析では、ミセルとペプチド複合体の分子量が比較的小さいため、ペプチドの信号はやや広幅化するものの、複合体を形成しているペプチドの NMR 信号の直接の観測や立体構造解析が比較的容易である。信号帰属と構造計算の結果、CP1 は水溶液中ではランダム構造であるが、DPC ミセル中では全長が α ヘリックスを形成していることが確認された (図 3)。これに対して LPS は水溶液中で見かけの分子量が数十万以上のミセルを形成するため、それに結合する抗菌ペプチドの NMR 信号を直接観測することは困難である。そのため、LPS 結合状態の抗菌ペプチドの NMR 解析には転移 NOE 法が応用されることがある。この手法では、NMR 観測可能な濃度の抗菌ペプチドの水溶液に LPS ミセルを少量添加した試料を用意し、これらの平衡状態で NMR 測定を行う。遊離と結合の 2 つの状態の交換速度が十分に速い場合には、1 つの信号のみが観測され、これに 2 つの状態の情報が平均化して含まれる状態となる。溶液中に遊離の抗菌ペプチドが大過剰に含まれた状態では、広幅化の影響も受けず、ほぼ遊離の抗菌ペプチドのケミカルシフトをもつ信号が観測されるが、この信号から複合体形成時の構造計算が可能な情報を転移 NOE として得ることが可能である。転移 NOE 法のメリットの一つとして、遊離状態の信号を観測して解析を行うため、結合状態での帰属が不要である点があげられる。しかしながらこれは逆に、CP1 のように水溶液中ではランダム構造のペプチドでは、NMR 信号の重なり合いから帰属や解析が困難となることを意味する。そこで我々は、安定同位体標識 CP1 での三重共鳴実験を行い、水溶液中でのランダム構造の CP1 の信号帰属と転移 NOE の詳細な解析を行った。この結果、DPC ミセル中とは異なり、LPS との相互作用時には全長の約半分の C 末端側の残基のみが α ヘリックス構造を形成することが明らかになった (図 3)。この領域の N 末端側の塩基性残基が連続する領域は LPS のリン酸基と、中央部の疎水性残基が連続する領域は LPS の脂肪酸のアシル基と、それぞれ相互作用すると予想され、このような構造が外膜の透過に重要であることが示唆された。

このように転移 NOE 法による解析は、抗菌ペプチドが高分子量の複合体を形成する際の解析に有用ではあるが、間接的な測定であることから、重水素化した試料を用いる等による、脂質膜に結合した抗菌ペプチ

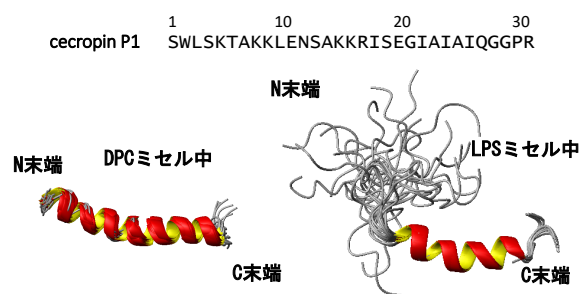


図3 CP1 の DPC ミセル中及び LPS ミセル中の立体構造

ドの複合体の直接の NMR 観測技術などの検討も重要と考えられる。

おわりに

抗菌ペプチドは様々な分野での応用も期待されていることから、作用機構の解明だけでなく、生産コストの低減などの課題も重要である。遺伝子組換え発現による抗菌ペプチドの生産技術は、NMR 法による安定同位体標識による立体構造や相互作用解析に有用だけでなく、新たな応用分野を切り開く技術としても重要性が高いと考えられる。

最後にこれらの一連の研究にお力添えいただいた多くの共同研究者の皆様と、本稿の執筆の機会を与えてくださった九州大学栗山先生にこの場を借りて感謝の意を表します。

参考文献

- Li, Y. *Protein Expr Purif* 2011, 80, 260–267.
- Ishida, H.; Nguyen, L. T.; Gopal, R.; Aizawa, T.; Vogel H. J. *J Am Chem Soc* 2016, 138, 11318–11326.
- Gu, H.; Kato, T.; Kumeta, H.; Kumaki, Y.; Tsukamoto, T.; Kikukawa, T.; Demura, M.; Ishida, H.; Vogel, H. J.; Aizawa, T. *ACS Omega* 2022, 7, 31924–31934.
- Hwang, P. M.; Pan, J. S.; Sykes, B. D. *FEBS Lett* 2014, 588, 247–252.
- Tomisawa, S.; Hojo, E.; Umetsu, Y.; Ohki, S.; Kato, Y.; Miyazawa, M.; Mizuguchi, M.; Kamiya, M.; Kumaki, Y.; Kikukawa, T.; Kawano, K.; Demura, M.; Aizawa, T. *AMB Express* 2013, 3, 45.
- Tomisawa, S.; Sato, Y.; Kamiya, M.; Kumaki, Y.; Kikukawa, T.; Kawano, K.; Demura, M.; Nakamura, K.; Ayabe, T.; Aizawa, T. *Protein Expr Purif* 2015, 112, 21–28.
- Kuddus, M. R.; Yamano, M.; Rumi, F.; Kikukawa, T.; Demura, M.; Aizawa, T. *Biotechnol Prog* 2017, 33, 1520–1528.
- Song, Y.; Wang, Y.; Yan, S.; Nakamura, K.; Kikukawa, T.; Ayabe, T.; Aizawa, T. *Microb Cell Fact* 2023, 22, 9.
- Ahmad, M.; Hirz, M.; Pichler, H.; Schwab, H. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, 98, 5301–5317.
- Pickford, A. R.; O’Leary, J. M. *Methods Mol Biol* 2004, 278, 17–33.
- Koganesawa, N.; Aizawa, T.; Masaki, K.; Matsura, A.; Nimori, T.; Bando, H.; Kawano, K.; Nitta, K. *Protein Eng* 2001, 14, 705–710.
- Nonaka, Y.; Aizawa, T.; Akieda, D.; Yasui, M.; Watanabe, M.; Watanabe, N.; Tanaka, I.; Kamiya, M.; Mizuguchi, M.; Demura, M.; Kawano, K. *Proteins* 2008, 72, 313–322.

13. Kato, Y.; Aizawa, T.; Hoshino, H.; Kawano, K.; Nitta, K.; Zhang, H. *Biochem J* 2002, 361, 221-230.
14. Kuddus, M. R.; Rumi, F.; Tsutsumi, M.; Takahashi, R.; Yamano, M.; Kamiya, M.; Kikukawa, T.; Demura, M.; Aizawa, T. *Protein Expr Purif* 2016, 122, 15-22.
15. Iizuka, T.; Takei, M.; Saito, Y.; Rumi, F.; Zheng, J.; Lu, X.; Chafey, P.; Broussard, C.; Guilloux-Assalet, L.; Charpin, D.; Ebisawa, M.; Sénéchal, H.; Aizawa, T.; Poncet, P. *Allergy* 2021, 76, 2297-2302.
16. Arcidiacono, S.; Pivarnik, P.; Mello, C. M.; Senecal, A. *Biosens Bioelectron* 2008, 23, 1721-1727.
17. Yonekita, T.; Ohtsuki, R.; Hojo, E.; Morishita, N.; Matsumoto, T.; Aizawa, T.; Morimatsu, F. *J Microbiol Meth* 2013, 93, 251-256.
18. Baek, M. H.; Kamiya, M.; Kushibiki, T.; Nakazumi, T.; Tomisawa, S.; Abe, C.; Kumaki, Y.; Kikukawa, T.; Demura, M.; Kawano, K.; Aizawa, T. *J Pept Sci* 2016, 22, 214-221.

あいざわ ともやす
 北海道大学 大学院先端生命科学研究院
 蛋白質科学研究室
 aizawa@sci.hokudai.ac.jp
<https://altair.sci.hokudai.ac.jp/g5/>

The Akabori Memorial Award 2022 を 受賞して

このたび、日本ペプチド学会の国際賞 The Akabori Memorial Award 2022 を受賞することができ、大変光栄に思います。選考に携わってくださった委員の方々ならびに日本ペプチド学会の関連の先生方に心より感謝いたします。

私は現在 63 歳になります。現職の任期があと約 2 年と言うことで、これを意識せざるを得ない年齢になりました。定年前の回顧録にはしたくないですが、ペプチドニューズレターに寄稿の機会を与えてくださることで、何故受賞に関わる研究に至ったかについて書かせていただければと思います。

私とペプチド化学との出会いは、学部 4 回生の卒業実習生としての矢島治明先生の研究室への配属でした。タンパク質化学・生化学に興味があったのですが、当時は遺伝子組換えによるタンパク質調製技術は一般的なものではなく、もっぱら天然に多量に存在するタンパク質を単離して研究を進めるという時代でした。ペプチド・タンパク質を自分の手で合成できれば、従来とは異なるアプローチでタンパク質の機能解



二木 史朗

析や機能創出を行えるのではと期待したからでした。

大きな誤算（というか私の不勉強）であったことには、当時、ペプチドの合成自体も決して簡単なものではなく、アミノ酸 30 個くらいのペプチドの合成でも液相法を用いて 2~3 年かかるのが普通でした。その後、博士後期課程を 2 年次で退学し、徳島大学薬学部助手として着任しました。論文博士取得、米国留学を経て、遺伝子工学を専門とする研究室が同学部に新設されたのに伴い助教授に昇任しました。この頃になると、Fmoc 固相法が実際的な方法として確立され、30-50 アミノ酸程度のペプチドも容易に合成できるようになってきました。一方では、Kaiser, Mutter, DeGrado などに触発される形で、ペプチドの構造機能設計という研究の流れが生まれてきました。この間、遺伝子工学・分子生物学・構造生物学も発展し、生体分子の相互作用の姿が次々と明らかになってきました。これらの動向を肌と感じ、私自身もペプチドの機能設計に重きを置いた研究をしたいと思います。

1997 年に京都大学化学研究所の杉浦幸雄先生の研究室に助教授として採用していただいたのを機に、細胞内のタンパク質の相互作用を調節できるペプチドの設計に取り組むことを考えました。その際に問題となったのは、設計したペプチドを効果的に細胞内に導入する手段がないことでした。種々の方法を試す中、HIV-1 Tat タンパク質由来の塩基性ペプチド (GRKKRRQRRPPQ) と連結することで、ペプチドやタンパク質が容易に細胞内に送達できることを知りました。配列を見るとアルギニン・リジンに富む塩基性、親水性の配列です。膜を透過させるには疎水性分子で修飾することが当時の一般的なアプローチであり、何故このような塩基性・親水性のペプチドを連結することによりペプチド・タンパク質が細胞内に導入できるのかに興味がありました。

私にとって幸いであったことは、当時、培養細胞の扱いに習熟していた鈴木智樹君（現大塚製薬）が大学院生としてこのプロジェクトに参画してくれていたことです。種々の類縁体を合成して調べた結果、Tat 由来ペプチドの膜透過性には、分子内のアルギニン残基が重要な役割をしていることや、Tat 由来ペプチドに限らず、アルギニンに富む配列を有する多くのペプチドが細胞透過性を示す可能性を指摘することができました¹。2001 年に発表したこの論文は、細胞透過ペプチド cell-penetrating peptides の透過様式に関しての先駆的な研究の一つとなり、現時点で 1400 回近く引用されています。その後、アルギニンに富むペプチド（アルギニンペプチド）の細胞内移行における膜結合型プロテオグリカン（硫酸化多糖）の重要性やエンドサイトーシスを介したアルギニンペプチドの細胞内取り込みにおけるマクロピノサイトーシスの関与に関しても示すことができました²⁻⁴。一方、条件を選ぶとアルギニンペプチドはエンドサイトーシスを介さず、直接細胞膜を介してサイトゾルに移行します⁵。この際、適度な疎水性配列を加えることや適切な対イオン分子を介在させることで透過が促進されること、また、細胞膜に曲率が誘導されると脂質パッキングが緩み、疎水性コア部分が膜表面により露出することで透過が促進されることなどを示すことが出来ま

した⁶⁻⁸。

私の考えでは、アルギニンペプチドは膜を局所的・一過的に不安定化することで膜を透過します。したがって、アルギニンペプチドに連結されている分子や薬物の大きさが大きくなるほど、一般に膜透過効率は低くなります。抗体サイズのタンパク質 (IgG であれば ~150 kDa) を一層効果的に送達するためには、異なる視点からのペプチド設計が必要となるのではないかとこの発想から L17E ペプチドが生まれました⁹。L17E の存在下に抗体を細胞培養液に同時に加えると IgG の細胞内送達が可能とされます。細胞外から送達された IgG により細胞内の標的タンパク質を認識可能であることや、細胞内情報伝達の調節が可能であることも示すことができました。L17E は、強い膜傷害性を有する両親媒性塩基性ペプチド M-lycotoxin の疎水性アミノ酸をグルタミン酸に置換することにより細胞表面での膜傷害性を軽減させる一方、エンドソーム内の pH 低下に伴うグルタミン酸の電荷の減少 (膜傷害性の回復) に呼応してエンドソーム膜を破壊することを期待して設計されました。しかし、詳細な検討の結果、予想とは異なり、L17E 存在下に投与された IgG が主として細胞表面もしくはエンドサイトーシスの極めて早い段階で細胞内 (サイトゾル) に移行することにより、効果的な細胞内への IgG の送達が可能と示唆されました¹⁰。このことを受け、エンドソーム内の低 pH 環境での膜傷害性をより高めた設計 (HAad ペプチド) や、多量体化、あるいは疎水性で膜のパッキングを緩和する作用のあるピレンブチル酸修飾等を行うことにより IgG の細胞内送達能力がさらに高まることも見いだしました¹¹⁻¹³。

IgG をより効果的に細胞内に送達することや、将来的な *in vivo* への展開を考える際の方策の一つとして、L17E と IgG を何らかの形で複合体化することが考えられます。これに関して、現在、いくつかのアプローチを試みている段階ですが、この過程で私たちは L17E 誘導体 (Fc 結合ペプチドと L17E の 3 量体とのコンジュゲート) と蛍光標識した IgG が液-液相分離により液滴を形成することや、液滴が細胞膜と接することで IgG が細胞内に一気に注入されることを見いだしました¹⁴。この細胞内流入は細胞骨格タンパク質 (アクチン) と細胞膜の構造変化などの生物学的要因が伴うことが必要であり、単なる物理化学的な小孔形成とは異なる細胞内移行経路ではないかと考えています。

L17E とは別の発想による細胞内送達を促進するペプチドとして私たちは SN21-LK15 を報告しています¹⁵。マクロピノサイトーシスはアクチン駆動型のエンドサイトーシスで、多量の細胞外液とその溶質を非特異的に取り込む経路と考えられています。クラスリン依存性エンドサイトーシスやカベオラ依存性エンドサイトーシスにより生じるエンドソームの直径がただか 100 ~ 200 nm 程度であるのに対し、マクロピノサイトーシスから生じるエンドソームは数 μm に達することも知られており、この経路を利用すれば、タンパク質やナノ粒子の細胞内移行はより容易に行われることが期待されます。上述のアルギニンペプチドを用いた細胞内送達においてもこの経路が関与している

ことが知られています。私たちは SN21 というマクロピノサイトーシス誘導ペプチドを新たに見だし、このペプチド、あるいはその誘導体 P4A に膜傷害性を有する LK15 ペプチドを連結することによって、抗体をはじめとする種々のタンパク質の効果的な細胞内送達が可能とすることを見いだしました¹⁵⁻¹⁶。このほかにも膜曲率誘導によりエンドサイトーシスを亢進するペプチドなど、種々の活性を有する膜相互作用ペプチドを見いだしてきました¹⁷。

振り返ってみると、私の研究が大きく進展したのは当初予想されたものとは異なる意外な結果が出たときです。頭で考えても、予想できないことは必ずや起こります。でも、予想できないことに出会うには、たとえ既報の結果であっても実際に手を動かして、自分の目で確認することが重要ではないかと思えます。今回の受賞対象となった研究は、私にお付き合いいただき、試行錯誤を繰り返し、粘り強く研究を進めてくれたスタッフ、学生をはじめとする歴代の研究室員の方々の多大な努力に負うものです。ここに敬意と深い感謝の意を表したいと思えます。また、多くの共同研究者の方々からのご支援・ご協力、また、恩師あるいは上司の先生方のご指導・ご理解がなければ一連の研究の遂行・展開は不可能であったと感じます。これらの方々には厚く御礼申し上げます。私自身が、当時のペプチド化学討論会に参加したのは、恐らく 1978 年 (第 16 回、九州大学) が最初であったと思えます。以後、日本ペプチド学会会員の皆様からは多くの知的刺激を受けるとともに、数多くのことを学びました。この場を借りて厚く御礼申し上げますとともに、日本ペプチド学会のますますの発展を願ってやみません。

参考文献 (代表的なものを記載しました)

1. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J Biol Chem* 2001, 276, 5836-40.
2. Nakase, I.; Niwa, M.; Takeuchi, T.; Sonomura, K.; Kawabata, N.; Koike, Y.; Takehashi, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Simpson, J. C.; Jones, A. T.; Sugiura, Y.; Futaki, S. *Mol Ther* 2004, 10, 1011-1022.
3. Suzuki, T.; Futaki, S.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J Biol Chem* 2002, 277, 2437-2443.
4. Nakase, I.; Tadokoro, A.; Kawabata, N.; Takeuchi, T.; Katoh, H.; Hiramoto, K.; Negishi, M.; Nomizu, M.; Sugiura, Y.; Futaki, S. *Biochemistry* 2007, 46, 492-501.
5. Kosuge, M.; Takeuchi, T.; Nakase, I.; Jones, A. T.; Futaki, S. *Bioconjug Chem* 2008, 19, 656-64.
6. Takeuchi, T.; Kosuge, M.; Tadokoro, A.; Sugiura, Y.; Nishi, M.; Kawata, M.; Sakai, N.; Matile, S.; Futaki, S. *ACS Chem Biol* 2006, 1, 299-303.
7. Takayama, K.; Nakase, I.; Michiue, H.;

- Takeuchi, T.; Tomizawa, K.; Matsui, H.; Futaki, S. *J Contol Release* 2009, 138, 128–133.
8. Murayama, T.; Masuda, T.; Afonin, S.; Kawano, K.; Takatani-Nakase, T.; Ida, H.; Takahashi, Y.; Fukuma, T.; Ulrich, A. S.; Futaki, S. *Angew Chem Int Ed Engl* 2017, 56, 7644–7647.
 9. 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.
 10. Akishiba, M.; Futaki, S. *Mol Pharm* 2019, 16, 2540–2548.
 11. Sakamoto, K.; Akishiba, M.; Iwata, T.; Murata, K.; Mizuno, S.; Kawano, K.; Imanishi, M.; Sugiyama, F.; Futaki, S. *Angew Chem Int Ed Engl* 2020, 59, 19990–19998.
 12. Nomura, Y.; Sakamoto, K.; Akishiba, M.; Iwata, T.; Hirose, H.; Futaki, S., *Bioorg Med Chem Lett* 2020, 30, 127362.
 13. Sakamoto, K.; Michibata, J.; Hirai, Y.; Ide, A.; Ikitoh, A.; Takatani-Nakase, T.; Futaki, S. *Bioconjug Chem* 2021, 32, 950–957.
 14. Iwata, T.; Hirose, H.; Sakamoto, K.; Hirai, Y.; Arafiles, J. V. V.; Akishiba, M.; Imanishi, M.; Futaki, S. *Angew Chem Int Ed Engl* 2021, 60, 19804–19812.
 15. Arafiles, J. V. V.; Hirose, H.; Akishiba, M.; Tsuji, S.; Imanishi, M.; Futaki, S. *Bioconjug Chem* 2020, 31, 547–553.
 16. Arafiles, J. V. V.; Hirose, H.; Hirai, Y.; Kuriyama, M.; Sakyamah, M. M.; Nomura, W.; Sonomura, K.; Imanishi, M.; Otaka, A.; Tamamura, H.; Futaki, S. *Angew Chem Int Ed Engl* 2021, 60, 11928–11936.
 17. Masuda, T.; Hirose, H.; Baba, K.; Walrant, A.; Sagan, S.; Inagaki, N.; Fujimoto, T.; Futaki, S. *Bioconjug Chem* 2020, 31, 1611–1615.

（ ふたき しろく ）
（ 京都大学 化学研究所 ）

日本ペプチド学会からのお知らせ

《2023 年度行事予定》

2023 年 4 月 15 日 (土)

第 113 回理事会

2023 年 4 月

Peptide Newsletter Japan No. 128 発行

2023 年 7 月

Peptide Newsletter Japan No. 129 発行

2023 年 8 月 8 日 (火)～10 日 (木)

第 55 回若手ペプチド夏の勉強会

場 所：京都大学宇治キャンパスおうぼくプラザ

世話人：河野 健一（京都大）

小林 和也（京都薬科大）

吉矢 拓（ペプチド研究所）

2023 年 10 月

Peptide Newsletter Japan No. 130 発行

2023 年 11 月 8 日 (水)～10 日 (金)

第 60 回ペプチド討論会

場 所：びわ湖ホール・中ホール，

ピアザ淡海（滋賀県大津市）

世話人：向井 秀仁（長浜バイオ大学）

相馬 洋平（和歌山県立医科大学）

2023 年 11 月

第 114 回理事会・第 42 回評議員会合同会議

2023 年 11 月

2023 年度日本ペプチド学会通常総会

2023 年 11 月

市民フォーラム 2023

2023 年 11 月

第 18 期評議員選挙公告

2023 年 12 月

第 18 期評議員選挙開票

2024 年 1 月

Peptide Newsletter Japan No. 131 発行

2024 年 1 月

第 115 回理事会

《海外関連学会》

2023 年 6 月 14 日～16 日

17th Chinese International Peptide Symposium

Tianjin, China

2023年6月24日～29日
28th American Peptide Symposium
Scottsdale, Arizona, USA
<https://aps2023.org/>

2023年7月3日～4日
26th Korean Peptide Protein Symposium
Jeju, South Korea

2023年10月11日～14日
9th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Applications Symposium (Solid Phase 2023)
Queensland, Australia
<https://www.solidphase.org/>

2023年10月15日～20日
13th International Peptide Symposium / 15th Australian Peptide Conference
Brisbane, Australia
<https://www.peptides2023.org/>

編集後記

ペプチドニュースレター No. 128 号をお届けいたします。本号では、幅広いペプチド科学をテーマとして、精緻な研究を展開されている先生方にご執筆をお願いしました。また、日本ペプチド学会の国際賞である The Akabori Memorial Award 2022 を受賞された二木史郎先生にもご執筆いただきました。年度末・年度始めのご多忙な中、ご執筆を頂きました先生方に心より感謝申し上げます。本号でも読者アンケートを実施いたしますので、ご協力のほどよろしく願いいたします。

新しい年度を迎え、気分も改まる時節です。また、昨年度の第 59 回ペプチド討論会をはじめ、徐々に学会やシンポジウム等も対面での開催ができるようになりつつあります。COVID-19 には引き続き注意が必要ですが、ポジティブな心持ちで研究に取り組める年度になることを期待したいところです。本年度が日本ペプチド学会に関わる皆様方にとって、健康で実りある一年になりますよう祈念申し上げます。

128 号アンケートフォーム URL :
<https://forms.gle/LADmMfUjQvRxsBT57>

(編集委員：栗山 慶太郎)

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4月25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

栗山 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：栗山 慶太郎)