



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.53

2004年7月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

“バイオインフォマティクス解析”を応用した ペプチドーム研究の試み

この度、日本ペプチド学会
ニュースレターへの執筆依頼を
頂戴いたしました。私はペプチ
ド合成の世界は門外漢であるこ
ともあって、山積みの原稿依頼
を横目で見ながらお断りの言い
訳を考えておりましたが、ペプ
チドを使わせて頂く立場の者の
雑文でも構わないとのことでお受けした次第です。



七里 真義

私は内分泌代謝・高血圧・腎臓などを専門とする内
科医で、現在、東京医科歯科大学医学部附属病院で中
央診療施設に勤務しつつ、平田結喜緒教授が主宰する
内分泌代謝内科における診療と研究に携わっておりま
す。私たちのペプチド研究というのはペプチド化学の
専門家が丹精を凝らして合成・精製してくださったペ
プチドを使って実験するものですが、とくに内分泌学
など内科医が扱うような実験の中には細胞表面の受容
体や細胞内情報伝達系の解析にしても、市販の合成ペ
プチドを培養細胞などに添加して細胞応答を測定する
だけの簡単な手法も多いことから、他の分野の先生方
からは「ふりかけ実験」と揶揄されてきたこともしば
しばです。いうまでもなく、最近では分子生物学的な方
法論を使わないと論文が書きにくくなっていますので、
分子機構を検討する実験も多くなっていますが、
基本的にペプチドを「ふりかける」ことには変わりはありません。国立大学も法人化されて今後どのような変
革がおきるのか手探りが続く中、私たちのように医学
部附属病院に勤務するものにとっては「質の高い医療」
を提供しながら、病院経営の効率化を推し進め、その
うえで教育と研究でどのように成果を上げるかが外部
評価によっても問われる時代となったと言われていま
す。このような環境の中で競争的研究資金を獲得しな
がら研究活動を活性化する必要に迫られる訳ですが、
日本には国立循環器病センターの寒川先生の一門をは

じめとし、ペプチドの世界では国際的な研究の方向性
をリードするグループがいくつもあつたなかでそれなり
の成果を挙げるにはやはりゲノム資源を使う工夫をし
なければならぬと考えていたときに、協和発酵東京
研究所の皆さんに大変なご助力とお智慧をいただいて
研究を始めることが可能になった次第です。加えてヘ
リックス研究所とのご縁も幸運だったのですが、特に、
米国の Vanderbilt 大学稲上研究室へ留学されてAT_i受容
体をクローニングされた業績で知られる佐々木克敏様
にはいろいろとお世話になり、ペプチドは「ふりかけ
る」もの程度の認識しかなかったような私が新規生理
活性ペプチドを見つけるための手ほどきをいただいた
次第です。その結果、サリューションと命名した2つの
多機能性関連ペプチドを見いだすに至ったのですが、
これらは実に急峻で一過性の血圧降下と徐脈を同時に
きたす生理活性ホルモンで、血管平滑筋や線維芽細胞
では細胞増殖促進作用を示し、下垂体後葉に対しては
バゾプレッシン放出促進作用を示すなど、従来の生理
活性ペプチドとはちょっと毛色が違う物質です。¹⁾

サリューションの論文が昨年9月号の Nature Medicine
誌に出版されると、特に海外からの反響は大きかった
のですが、驚いたことに同じ9月の10日頃にはすでに
アメリカの会社がインターネットでこれらのペプチド
を発売していました。物質特許すら出願していません
が、発売前にそのことについての問い合わせもなかつ
た姿勢に、若干、疑問を感じています。その後、この
会社で購入したサリューションに論文に書いてあったよ
うな作用が見られなかったがどうということかという質
問が複数、寄せられて返答に困ったものです。日本国
内の施設や企業で合成して頂いたものは全くそのよう
なことはなく、いくつかの研究室でも全く同じ結果が
得られているので、ペプチドを見つけた本人としては
研究者の腕や種差、もろもろの実験条件を疑うのでは
なく、合成した海外の会社に疑いの目を向けたくなつ
てしまいます。電気製品や精密機械などでよく体験す
ることですが、この分野でも日本製の質が高いのかと
想像していた次第です。最近、ペプチド研究所でも市

販されるようになりこれが海外でも購入可能になりましたので、私としては皆さんが高品質の日本製を購入されることをすすめることにより、正確な研究結果を出して頂きたいと願っています。

サリューションはデータベース上の cDNA 情報の構造解析から存在が推定される内因性ペプチド配列を合成して培養血管平滑筋細胞にふりかけて、細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇するものを探すことによって発見したわけですが、自分でどうしてそのような方法を用いるに至ったのかを今になって思い起こしてみますと、内因性に発現している可能性の高いペプチドを次から次へと合成してふりかけていると、そのうちにエンドセリンよりも強力に細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇する物質が見つかるに違いないという気がして、どうしてもそのことを試したくなったように記憶しています。企業の御協力を頂いた後も自分の研究費が続く限り、有用な因子を探し続けようと密かに決意していたのかもしれませんが。ところが本当に驚いたことには、最初に合成していただいた3つのペプチド全てが細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇反応を示し、4番目にポジティブコントロールとしてエンドセリンをかけることにより、かつて観察したエンドセリンによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を確認した経緯があります。3つの未知ペプチドは当然のことながら名前もついていなかったため、実験を手伝ってくれた2人のテクニシャンと私の間では、4番目が「エンドセリン」であったため、とりあえず最初の物質を「アンドセリン」、2番目にかけたサリューション- α のことを「インドセリン」、3番目にかけたサリューション- β のことを「ウンドセリン」と呼ぶことにし、以降、2002年の春にサリューションと命名してから論文が出版されるまで、ラボの中では「インドセリン」「ウンドセリン」という呼称で呼んでおりました。これらのペプチドの命名には実に苦労しましたが、ある日、サリューションという名前をつけたことを皆に公表したところ、テクニシャンや院生らの若者達はあまりにも普通の響きをもった命名に驚きを隠せない様子でした。おそらく真摯そのものの態度で研究をされておられるであろうペプチド科学の分野の研究者の先生方には考えられない実験室風景でしょうが、私は若者達が自由で開放的な気分で、少し遊びの要素を漂わせた雰囲気の中で実験してくれるのは、思った以上に生産的だと感じています。

「バイオインフォマティクス解析」といえば聞こえはいいのですが、実際はコンピューターの前に張り付いてひたすら配列を検索する、実に単調な作業の連続から始まります。といってもうまく生理活性候補因子

に出会った場合はサリューションの例が示しますように従来の方法よりも圧倒的に時間と経費と労力の節減につながります。かつての日々、聴診器を片手にポケットベルでいつ呼ばれるかもしれない病院の業務をしながら、ある程度の研究業績を挙げなければならない必要性に迫られながら改良してきた方法ですが、ゲノム情報科学の専門家が開発した見事な配列解析のソフトウェアがネット上で多数公開されている現在、アイデア次第でゲノム資源を自分の研究目的に用いることが可能で、使えば使うほどいろいろな応用を試したくなります。私の場合は実験するマンパワーが限られているために、スクリーニングの段階でゲノム・cDNA情報が細胞や組織における作用点にできるだけ近い形の蛋白やペプチド情報に置き換えることを目的として活用しています。最初は、全長 cDNA ライブラリーを頂戴して遺伝子導入実験から始めたのですが、だんだん手を抜く方法ばかり工夫し始めて、現在では構造上分泌蛋白である可能性が高いペプチド配列を合成して生理機能の有無をスクリーニングしています。そんな方法で生理活性を有するものを見つけるまでやっていたら研究費を使い果たして失敗するに違いないというご指摘を様々な方々からいただいていたことがきっかけとなって、より有用な物質をより高い確率で見いだすための工夫ができることになり、新規生理活性因子を見いだすことが可能な状況になりつつあります。多くの因子の中から生理活性を持つものをスクリーニングするときには簡単に活性を検討できる方法がいいのは明らかで、ここでは細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 濃度にせよ、増殖シグナルにせよ簡単な「ふりかけ実験」が実に役立っています。あまり手の込んだ手技ばかりを専門にしていたら、おそらくこのような方法で生理活性ペプチドを見つけるのは困難であつたろうと思っています。

私は米国の Yale 大学の分子生物物理、生化学に留学していましたが、このときに分子生物学、分子遺伝学、相同的組換えなどの手ほどきを受けたことが内分泌・高血圧・腎臓研究に分子生物学的な手法を取り入れるきっかけになりました。臨床医学系の研究者にとってはこのような留学体験自体はごくありふれた経歴といえます。しかし、ここ5〜6年力を入れているペプチド研究にあつては、バイオインフォマティクスやペプチド科学に造詣の深い方々に巡り会うことができ、そうした方々と時々お話し合いをもってお知恵を拝借しながら研究を進められたことは、私にとっては実に楽しかっただけでなく、この上ないありがたい体験の連続でした。一般にはお忙しい他の分野の専門家から知識や技術、蓄積されたノウハウを学ぶことは容

易なことではありません。ですから、お互いにメリットを共有できる関係をうまく築くことができなければ、継続的に共同研究を進めて行くこともできないと思います。しかし、学際的な研究分野の進展が著しくなった今日この頃、同じ専門分野のものだけが集まって研究を進めていくだけでは発展性がますます乏しくなる傾向がさらに強くなっていくものと考えられ、積極的に異なる分野の方々とうまく共同研究を進めることがどれほど大切かということを痛感させられています。今後、ペプチド科学の分野の方々とも御一緒に新たな物質を探索し続けることができればという夢を、今も持ち続けています。

【参考文献】

- 1) Shichiri M, Ishimaru S, Ota T, Nishikawa T, Isogai T, Hirata Y: Salusins: newly identified bioactive peptides with hemodynamic and mitogenic activities. Nat. Med., 9, 1166-1172 (2003).

しちり まさよし
東京医科歯科大学医学部附属病院
医療福祉支援センター・内分泌代謝内科
e-mail: mshichiri.dgm@tmd.ac.jp

遺伝子デリバリーの世界におけるペプチドの役割

遺伝子を薬として利用する遺伝子治療が多くの難治疾患を克服する新しい治療法として注目されています。しかし、遺伝子(核酸)の酸性高分子としての性質のため細胞内へ容易に入らないのはもちろんのこと、体内で容易に分解されるため、治療用遺伝子をコードしたプラスミド DNA 単独での経口投与や血管内投与では効果は期待出来ません。そこで、遺伝子を目的組織に効率よく集積させ、細胞内へ取り込ませ、さらに遺伝子発現をも調節できるといった総合的な技術が開発されれば、遺伝子治療が一気に現実的なものになるのです。¹⁾ これまで、主に臨床の世界ではウイルスを運び屋として使ってきました。ウイルスに治療用遺伝子を組み込んで、その感染経路に乗せることで細胞内へ送り届けようという作戦です。しかし、良好な治療結果を得た例もありますが、一方で、過剰な免疫応答やウイルスが感染することによる新たな発がんといった問題も表面化してきました。そ



新留 琢郎

こでウイルスを使わない安全な遺伝子デリバリー技術が必要とされています。

細胞内に遺伝子を入れる方法としては、昔からリン酸カルシウム法や塩基性脂質を使った方法がよく使われてきました。これはプラスミド DNA と複合体を形成させ、細胞内へエンドサイトーシスで取り込ませるというものです。そして、現在ではトランスフェクション試薬として様々な化合物が開発されました。では、これら多くの化合物は細胞内へどのような旅をするのでしょうか？ これら塩基性化合物と DNA との複合体はその表面が正電荷になっており、負電荷になっている細胞表面に吸着します。そして、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれます(図1)。エンドソーム内に取り込まれた複合体はそのままと分解されるので、細胞質に出なければいけません。そのしくみとして、塩基性脂質の場合ではエンドソーム膜との融合、あるいは、ポリエチレンジアミンといったポリアミンの場合ではプロトンスポンジ効果という、エンドソームのバーストが起こるためと考えられています。

²⁾ 細胞質へ運良く脱出できた DNA は次に核へ移行しないと発現しません。分子量数百万という巨大なプラスミド DNA が核膜孔をどうやって通過出来るのか何もわかっていませんが、培養細胞の場合は細胞分裂のどさくさに紛れて核内に入るという説が有力ながら、分裂していない細胞でも遺伝子発現が認められ、その理解はなかなか進みません。また、顕微鏡下でのマイクロインジェクションの実験から、細胞質へインジェクションした DNA 複合体の数パーセントしか核へ移行しないことがわかり³⁾、極めて効率が悪いといえます。さらに、複合体の解離も遺伝子発現には必要ですが、

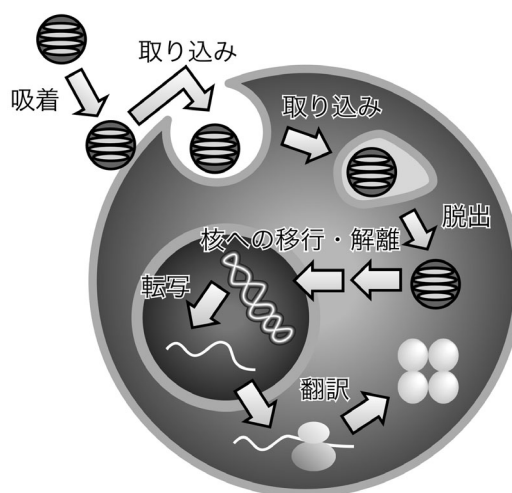


図1 遺伝子導入と発現のメカニズム

いつどこで起こるのかもよくわかっていません。しかし、この解離の制御は遺伝子発現の制御にもつながり、後述するように多くの工夫がされはじめています。

さて、培養細胞を対象にした遺伝子デリバリーに関する研究成果をすぐに遺伝子治療に適用できるかというところ簡単にはいきません。北海道大学で行われた ADA 欠損症の遺伝子治療のように、一度患者さんから細胞を取り出し、それに遺伝子を入れて再び戻すという手法に適用できる可能性はあるものの、それでもエンドサイトーシスが活発ではない細胞にはなかなか入らず、ウイルスを使う手法や電圧ポレーションのような物理的な刺激による過酷な入れ方しかありません。さらに、直接体内へ投与する方法においても、体内でどこに分布するかわからない、細胞内へ取り込まれない、遺伝子発現の制御ができないなど、いろいろな問題が残されています。そこで、遺伝子治療への適用に向けて現在、いろいろな努力が続けられています。大きく分類してみると、表1のようにまとめられるでしょう。そして、それぞれの課題でペプチドの利用が期待されています。そこで本稿では遺伝子デリバリーシステム開発に期待されるペプチドの利用について紹介したいと思います。

表1 遺伝子デリバリーに関する研究の各課題と工夫

検討課題	具体的な工夫
血中あるいは組織中での DNA の安定性向上	PEG 修飾, 酸性ポリマー修飾
標的組織への集積, 細胞内への取り込み効率向上	リガンド修飾
エンドソームから細胞質への移行促進	膜破壊ペプチド修飾・添加
複合体の解離制御	光, 熱刺激応答性キャリアー, 細胞内シグナル応答性キャリアー
核への移行促進	核移行シグナル修飾
発現調節	特異的プロモーターや複製可能な DNA, トランスポゾン利用

細胞認識を可能にするペプチド性リガンドの利用

遺伝子キャリアー分子のリガンド修飾は DNA 複合体を選択的に標的部位に集積させるために行われます。現在、多く報告されているものは細胞表面のインテグリンに結合する RGD ペプチドです。いくつかのインテグリンが腫瘍の血管新生や転移に関わっていることから、このペプチドは腫瘍選択的なリガンドとして注目されています。最近では環状 RGD ペプチドを ^{18}F でラベルし、PET (positron emission tomography; 陽電子放射断層法) での腫瘍のイメージングに利用できると報告されました (図2)。⁴⁾ 遺伝子デリバリーシステムへの適用では、リポソームあるいはポリエチレ

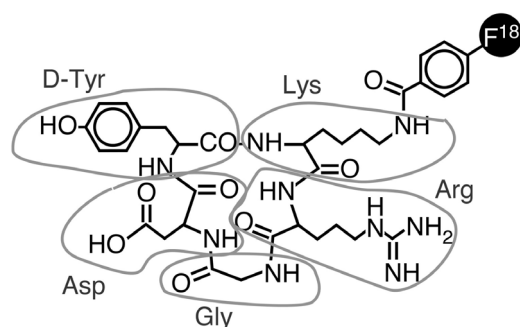


図2 ^{18}F ラベルした RGD ペプチド

ンイミンにポリエチレングリコール鎖を介して、RGD モチーフをもつ直鎖状ペプチドの有効性が報告されています。^{5,6)} このとき、ポリエチレングリコール鎖は塩基性の遺伝子キャリアー部分とのスペーサーとなり、インテグリンによる認識を高める効果とさらには血中あるいは組織中でのステルス性を与えると期待されます。また、RGD ペプチドは細胞側のエンドサイトーシスを誘導するともいわれています。RGD ペプチドはウイルス法にも利用されています。アデノウイルス表面タンパク質に RGD 配列を組み込み、天然型では感染できない細胞にも遺伝子を運ぶことができるようになりました。⁷⁾ また、私たちは酸性のポリマーにこれら RGD ペプチドを修飾し、この酸性ポリマーで塩基性の DNA 複合体をコーティングすることで、血中安定性と腫瘍へのターゲティングを実現する分子を構築しています。一方、RGD ペプチド以外にもファージディスプレイライブラリーから様々な部位に選択的に結合するペプチドが報告されており、将来、体内遺伝子デリバリーの対象範囲がさらに広がることが期待されます。

エンドソームから細胞質への移行を促進するペプチド

エンドサイトーシスで取り込まれた DNA-遺伝子キャリアー複合体は、細胞の胃袋となるエンドソームから脱出しなければいけません。この過程を促進するペプチドとしてインフルエンザウイルスのヘマグルチニンからあるペプチドが見つかりました。インフルエンザウイルスが細胞にエンドサイトーシスで取り込まれ、エンドソームの酸性化に伴い、膜破壊作用を示す部分のペプチドです。このペプチドには酸性アミノ酸が含まれ、弱酸性条件下で α ヘリックス構造を形成し、膜破壊能を示します。このペプチドを DNA-遺伝子キャリアー複合体に添加することにより、遺伝子の発現効率が数十倍にも向上しています。⁸⁾

エンドソームをバーストさせるペプチドも報告されています。オリゴリジンにヒスチジン残基を加えたペプチドを遺伝子キャリアーとして用います。⁹⁾ エンドソームに取り込まれたこのペプチドはエンドソームのV-ATPaseで汲まれたプロトンを次々に吸収します。したがって、このヒスチジンのバッファー効果でプロトンが入ってきてもpHが下がらず、次々にプロトンが流入します。これに伴い水も入ってくるため、最終的にエンドソームがバーストするという仕組みです。

DNA 複合体の解離を制御するペプチド

DNA-遺伝子キャリアー複合体の解離制御は遺伝子発現の制御につながる重要なテーマです。オリゴリジンにシステインを導入し、ジスルフィド結合で安定化したDNA複合体を細胞内へ取り込ませます。その後、細胞質へ移行した際、その還元的雰囲気下でジスルフィド結合が解け、複合体も同時に解離するという工夫です。^{9, 10)} これは複合体が細胞質へ入ると自動的にDNAが遊離するシステムですが、さらに高度なテクニックも報告されています。それは、細胞内のシグナル伝達に応答する遺伝子キャリアーです。例えばポリアクリルアミドのポリマーにプロテインキナーゼAの基質となるペプチドをつなぎます。そのペプチドは塩基性で通常はDNAと複合体を形成できるのですが、プロテインキナーゼAがこのペプチド部分をリン酸化することによりペプチドの塩基性が低下し、DNAを遊離するというシステムです。これを使ってForskolin（プロテインキナーゼAの活性化剤）刺激による遺伝子発現の制御が可能になります。同様にカスパーゼ3に応答するポリマーも構築されています。¹¹⁾ このようなペプチドを細胞内をセンシングする素子として利用する方法はこれからも広がっていくと思います。

核への輸送を促進するペプチド

核へのタンパク質輸送には核局在化シグナル配列が重要な役割を担っていることは、多くの研究者が知るところです。代表的な配列はSV40 T抗原の「KKKRK」という塩基性の特徴的な配列です。このペプチドで運びたいものを修飾するわけですが、プラスミドDNA自身を直接このペプチドで修飾し、遺伝子発現を向上させた論文が報告されました。¹²⁾ しかし、この修飾DNAは核酸合成とペプチド合成、さらに、リガーゼによる遺伝子部分との結合といった複雑な過程が必要で、一般的な手法には至っていません。一方、遺伝子キャリアー分子側をシグナルペプチドで修飾するとい

う手段も報告されていますが、核内までDNA-遺伝子キャリアー複合体が移行するというシナリオになり、核膜孔を通過できるのかなど、作戦として適切かどうかわかりません。特にキャリアー側の塩基性ペプチド修飾ということで、DNA複合体自体の物性を変化させていることも考えられ、注意が必要と筆者は考えています。

遺伝子キャリアーとしてのデンドリティックポリリジン

ここまでペプチドをリガンドとして、膜破壊ペプチドとして、細胞内酵素の基質として、あるいは、局在化シグナルペプチドとしての利用を例に挙げてきました。このような生化学的なエッセンスを含んだ使い方とは別にもっと材料的な使い方もあります。以前、私たちはシンプルな塩基性 α ヘリックスペプチドを遺伝子キャリアー分子として利用できることを発見しました。¹³⁾ このペプチドの両親媒性構造がDNAとの複合体形成や、エンドソーム膜破壊に重要な役割を果たしていることもわかりました。次いで、デンドリティックポリリジンも遺伝子キャリアーとして非常に優れた性質を持っていることを明らかにしました。¹⁴⁾ その特徴として細胞に対して毒性が低く、高い遺伝子発現が認められ、また、その再現性も非常によいという点が挙げられます。さらに、培養細胞に対してのトランスフェクション能だけではなく、このデンドリマーのDNA複合体をマウスの尾静脈から投与すると、血中を30分以上安定に循環していることがわかりました。この高い血中滞留性はPEG修飾した分子を除いて、塩基性キャリアー分子としては現在唯一のものであります。おそらくこのDNA複合体の表面電荷がほぼゼロに近く、血清成分との非特異的な相互作用が少ないためではないかと考えています。このステルス性の高いデンドリマーにリガンド修飾を行うことにより、効果的な標的部位へのターゲティングが期待されます。

おわりに

ペプチドの遺伝子デリバリーシステムへの利用は、遺伝子キャリアーの機能化という点で非常に重要なポジションにあります。今後のペプチドの生理的な作用、物理化学的な性質、さらに、新しい構造とその合成手法に関する研究がこの領域の研究を支えていくのだらうと感じています。ペプチド学会というペプチドに関わる広大な領域をカバーするこの学会から、新しい遺伝子デリバリー技術の種が芽生えることを確信して、これからも研究に精進していきたいと思っております。

文献

1. Niidome T, Huang L, Gene therapy progress and prospects: Nonviral vectors, *Gene Ther* 9, 1647-1652 (2002)
2. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP, A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7297-7301 (1995)
3. Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, Escande D., Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells, *J Biol Chem* 273, 7507-7511 (1998)
4. Chen X, Park R, Tohme M, Shahinian AH, Bading JR, Conti PS, MicroPET and autoradiographic imaging of breast cancer alpha v-integrin expression using ^{18}F - and ^{64}Cu -labeled RGD peptide, *Bioconjug Chem* 15, 41-49 (2004)
5. Kunath K, Merdan T, Hegener O, Haberland H, Kissel T., Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer, *J Gene Med* 5, 588-599 (2003)
6. Harvie P, Dutzar B, Galbraith T, Cudmore S, O'Mahony D, Anklesaria P, Paul R., Targeting of lipid-protamine-DNA (LPD) lipopolyplexes using RGD motifs, *J Liposome Res* 13, 231-247 (2003)
7. Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Ishii-Watabe A, Uchida E, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T, CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber-modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice, *Gene Ther* 9, 769-776 (2002)
8. Ohmori N, Niidome T, Wada A, Hirayama T, Hatakeyama T, Aoyagi H, The enhancing effect of anionic α -helical peptide on cationic peptide-mediating transfection systems, *Biochem Biophys Res Commun* 235, 726-729 (1997)
9. McKenzie DL, Smiley E, Kwok KY, Rice KG, Low molecular weight disulfide cross-linking peptides as nonviral gene delivery carriers, *Bioconjug Chem* 11, 901-909 (2000)
10. McKenzie DL, Kwok KY, Rice KG. A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents, *J Biol Chem* 275, 9970-9977 (2000)
11. Katayama Y, Fujii K, Ito E, Sakakihara S, Sonoda T, Murata M, Maeda M, Intracellular signal-responsive artificial gene regulation for novel gene delivery, *Biomacromolecules* 3, 905-909 (2002)
12. Zanta MA, Belguise-Valladier P, Behr JP, Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus, *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 91-96 (1999)
13. Niidome T, Ohmori N, Ichinose A, Wada A, Mihara H, Hirayama T, Aoyagi H, Binding of cationic α -helical peptides to plasmid DNA and their gene transfer abilities into cells, *J Biol Chem* 272, 15307-15312 (1997)
14. Ohsaki M, Okuda T, Wada A, Hirayama T, Niidome T, Aoyagi H, In vitro gene transfection using dendritic poly (L-lysine), *Bioconjug Chem* 13, 510-517 (2002)

にいどめ たくろう

九州大学大学院工学研究院応用化学部門

e-mail: niidome-tcm@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

URL: <http://www.cstm.kyushu-u.ac.jp/katayama/>

自己のペプチド配列を認識することで 感染微生物の襲来を知る受容体

このたび、日本ペプチド学会
ニュースレターへの執筆依頼を
受けましたので、私たちのカブ
トガニを用いた自然免疫研究の
中から、ペプチド科学を専門と
される研究者に興味を持ってい
ただけると思われる話題を提供
してみたい。なお、研究の詳細
は原著論文を参照されたい。¹⁾



川畑俊一郎

哺乳類の生体防御機構は、獲得免疫と自然免疫のふたつのシステムで成り立っている。T細胞やB細胞が中心的な役割を果たす獲得免疫系は、遺伝子再構成によって生み出されるタンパク質の構造多様性にもとづいており、感染微生物に特異的に対応できる。一方、自然免疫系を担うタンパク質は、感染の有無にかかわらず準備されている。そのため、自然免疫系の役割は、感染初期の生体防御反応としての機能、すなわち、食作用や補体活性化が強調されてきた。しかし、T細胞やB細胞が活性化するためには、自然免疫系の活性化が不可欠であることが判明し、自然免疫系の生体防御における重要性が広く認識されるに至っている。²⁾

自然免疫系の異物認識タンパク質は、感染微生物の細胞壁成分、たとえば、グラム陰性菌のリポ多糖(LPS)や、グラム陽性菌のペプチドグリカン、あるいはカビ類の β -1,3-グルカンなどがつくりだす分子パターンを認識すると考えられている(パターン認識説)。^{2,3)}これらの物質は細胞壁成分として感染微生物にとっても重要であり、容易に構造変化させることはできない。したがって、自然免疫系の異物認識がこれらの物質を標的としていることは、大変優れた戦略と

いえる。無脊椎動物には獲得免疫系は存在しないにもかかわらず、カブトガニの寿命は20年にもおよぶことから、洗練された自然免疫機構が備わっているはずである。

1. カブトガニ血球の LPS に対する生体防御反応

多細胞生物の体液には何種類もの血球細胞が含まれている場合がほとんどであるが、カブトガニの血球の99%は1種類の顆粒細胞で占められている。この顆粒細胞の細胞質は大、小2種類の顆粒で満たされ、顆粒内には体液凝固因子をはじめ、レクチン、抗菌性タンパク質などの生体防御タンパク質が選択的に貯蔵されている。⁴⁾ 顆粒細胞は、極めて低濃度の LPS に対して鋭敏に反応し、顆粒内成分を放出する（開口放出とよばれる現象）。その結果、顆粒内に貯蔵されていた生体防御タンパク質が体液中に分泌され、体液凝固をはじめとする生体防御反応が開始される。体液凝固反応により、体液の流出が防止されるとともに、感染菌の体内拡散が阻止される。同時に、感染菌はレクチンにより凝集され、抗菌ペプチドで殺菌される。また、分泌された生体防御因子による創傷治癒のメカニズムも明らかになりつつある。⁵⁾ このように、顆粒細胞の開口放出は、カブトガニの生体防御反応の引き金ともいえる重要な反応である。最近、開口放出によって分泌される生体防御タンパク質を ELISA 法により定量することで、顆粒細胞の LPS で誘起される開口放出を定量する測定系を構築した。本定量法を用いて開口放出を解析すると、種々の感染微生物の細胞壁成分のうち、LPS に対して特異的に反応することが確認された。¹⁾ 海中の主要な微生物は、ビブリオなどのグラム陰性菌であることから、グラム陰性菌の感染は不可避である。そのため、カブトガニはグラム陰性菌の侵入を認識するためのシステムを高度に進化させたのであろう。

2. 体液凝固反応

カブトガニの体液凝固反応は、LPS と β -1,3-グルカンにより活性化されるプロテアーゼカスケードからなる⁴⁾。カブトガニの体液凝固因子は、顆粒細胞の大顆粒内に貯蔵されており、LPS により誘導される開口放出によって体液中に分泌される。分泌されたセリンプロテアーゼ前駆体の C 因子が LPS に結合して活性型 C 因子となり、そのプロテアーゼ活性により B 因子を活性化し、ついで活性型 B 因子が凝固酵素前駆体を凝固酵素に変換する。最終的には凝固酵素がコアグュロゲンをコアグュリンに変換し、コアグュリンが重合することにより不溶性のゲルが形成される。また、

別のセリンプロテアーゼ前駆体の G 因子は β -1,3-グルカンによって活性化され、カスケードを起動する。つまり、カブトガニの体液凝固カスケードは、感染微生物の表面に濃縮された凝固因子により引き起こされる急激な固相上の反応であり、哺乳類の血液凝固カスケードが、リン脂質上にカルシウムを介して濃縮された凝固因子の固相上の反応であることを思い起こせば、両カスケードは戦略的には類似のシステムであることに気づく。カブトガニの体液凝固反応は LPS に対する感度が非常に高く、LPS の検出に応用されている。この感度の高さは、C 因子と LPS との親和性の強さによると考えられ、表面プラズモン共鳴センサーを用いた解析では、C 因子と LPS との結合の解離定数は 7.56×10^{-10} M である。¹⁾ C 因子のように、LPS と直接結合するプロテアーゼ前駆体の報告はなく、C 因子の LPS 認識機構の解析は、自然免疫系における異物認識の分子基盤を解明する大きな手がかりとなることが期待される。

3. 黄色ショウジョウバエと哺乳類の異物認識機構

黄色ショウジョウバエにおいて、Toll 受容体がカビ類の感染（ β -1,3-グルカン）に対する免疫応答に関与することが明らかとなつて以来、哺乳類においても Toll 様受容体が発見され、これらが異物認識に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。^{6,7)} Toll は、黄色ショウジョウバエの初期胚における背腹軸決定に関与する膜貫通型のタンパク質として同定され、発生段階の初期には一連のプロテアーゼカスケードにより産生されるリガンドを認識し、腹側形成のスイッチを入れる働きをする。⁸⁾ 一方で、成体では、真菌の細胞壁成分である β -1,3-グルカンやグラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンによる刺激を細胞内へ伝達し、抗真菌タンパク質や抗菌タンパク質などの生体防御に関与する遺伝子の発現を促進する。現在では、様々な動物種において Toll 様受容体が発見されており、ヒトにおいては10種類の Toll 様受容体と同定されている。ノックアウトマウスを用いた解析から、それぞれの Toll 様受容体が微生物由来の成分を特異的に認識し、その情報を細胞内へ伝えていることが明らかとなつてきている。黄色ショウジョウバエの Toll 受容体は、直接異物を認識しているのではなく、プロテアーゼカスケードや他のパターン認識タンパク質の存在が不可欠である。⁹⁾ しかし、これらのプロテアーゼカスケードを形成しているプロテアーゼや、パターン認識タンパク質が Toll 様受容体に刺激を伝えるメカニズムに関しては、不明な点が多い。なお、カブ

トガニ顆粒細胞にも Toll 受容体が発現しているが、LPS 認識には関与していないようである。¹⁰⁾

4. カプトガニ顆粒細胞の LPS 認識メカニズム

カプトガニの顆粒細胞の開口放出における LPS 刺激の伝達には、三量体 G タンパク質が関与していることが報告されていた。¹¹⁾ 前述した開口放出定量法を用いて詳細な解析を行ったところ、顆粒細胞を百日咳毒素や細胞内イノシトール代謝の阻害剤で処理すると、LPS による開口放出が阻害された。¹⁾ また、カルシウム ATPase の阻害剤であるサプシガルギンや、カルシウムイオノフォアで顆粒細胞を処理すると LPS 非存在下においても開口放出が誘導された。したがって、LPS 刺激の伝達には三量体 G タンパク質が関与しており、最終的には、細胞質内カルシウムイオン濃度が上昇し、開口放出が引き起こされると推定される。さらに、顆粒細胞表面にも前述のセリンプロテアーゼ前駆体の C 因子が存在しており、顆粒細胞の高い LPS 親和性は、細胞膜表面の C 因子に依存していることが判明した。¹⁾ 興味深いことに、C 因子のプロテアーゼ活性が LPS 刺激の伝達に必須であった。すなわち、プロテアーゼによって活性化される G タンパク質共役受容体 (protease-activated G protein-coupled receptor; PAR と呼ばれる) の存在が示唆されたのである。

現在までに判明した PAR は 4 種類あって、すべて哺乳類由来である。^{12,13)} 無脊椎動物での PAR の報告はない。最初に判明した PAR は、ヒト血小板のトロンビン受容体 (PAR-1) である。血小板の活性化には、トロンビンのプロテアーゼ活性が必須であり、PAR-1 の活性化の分子機構は、それまで知られていた 7 回膜貫通ドメインをもつ G タンパク質共役受容体に比べて、非常にユニークであった。¹²⁾ PAR-1 のアミノ末端側にはトロンビンにより、特異的に切断されると思われる Arg⁴¹がある。切断位置前後の配列は、-Asp-Pro-Arg⁴¹-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn- であり、この Arg⁴¹のカルボキシ末端側での切断が血小板活性化に必須であることは、Arg⁴¹の Ala 置換受容体で証明されている。さらに重要なことは、新しくアミノ末端となった Ser から始まるオリゴペプチドが、PAR-1 のアゴニストとして機能する点にある。100 μ M 程度のヘキサペプチド (Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn) が、PAR-1 を介してトロンビンと同等の血小板活性化を引き起こすことが知られている。この現象は、他の 3 種類の PAR でも確認されており、受容体自身にリガンドが付き留

められていることから、そのオリゴペプチド配列は tethered ligand と呼ばれる。

そこで、カプトガニ顆粒細胞に対する PAR の tethered ligand の効果を調べてみると、LPS 非存在下で、ヒト PAR-1 やマウス PAR-2 (Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu) のヘキサペプチドで濃度依存的に開口放出が誘導され、500 μ M で LPS 刺激と同等の分泌量が測定された。一方、マウス PAR-4 (Gly-Tyr-Pro-Gly-Lys-Phe) のヘキサペプチドでは、顆粒細胞の開口放出がほとんど観察されず、受容体がりガンド特異的に反応していることをうかがわせる。トロンビンと C 因子のペプチド基質に対する特異性は酷似しており、カプトガニにも PAR が存在することが証明できれば、凝固や生体防御に関わる顆粒細胞と血小板の機能類似性がさらに明確なものになり、進化的にも興味深い。想像たくましくすれば、LPS を顆粒細胞表面の C 因子が察知して活性型プロテアーゼとなり、近傍にある PAR を切断することで PAR は新たに生じた自己のアミノ末端ペプチド配列を認識し、感染微生物の襲来という情報を細胞内に伝えるわけである。

現在、カプトガニ PAR 遺伝子の同定を進めている最中である。PAR と遊離のヘキサペプチドとの親和性はそれほど高くなく、数十から数百 μ M 程度と推定されるが、これらのヘキサペプチドで細胞表面の受容体の特異的にラベルできないものであろうか。例えば、親和性を低下させることなく、ビオチン化したヘキサペプチドに、受容体と共有結合しうる官能基を持たせることはできないのだろうか、素人のつたない望みをいだいている。

さまざまな生物のゲノムに関する情報が蓄積するにつれて、カプトガニの生体防御因子はけっしてカプトガニに特有のものではないことが確認され、カプトガニ由来のタンパク質を用いても普遍的な生物学的現象を分子レベルで討論できるようになってきた。カプトガニは、感染微生物の有無に関わらず顆粒細胞に十分量の自然免疫関連因子を貯蔵することで、即時対応型のすぐれた自然免疫機構を備えている。最近になって、これらの自然免疫関連因子は、感染局所において協調的に機能していることを示唆する結果が得られてきた。¹⁴⁻¹⁷⁾ 今後は、これら自然免疫関連因子の機能的ネットワークを明確にすることが必要であろう。さらに、異物の排除、創傷治癒などに関する分子機構はいまだ手つかずの問題である。これらの解明は、自然免疫の分子基盤を理解する上で重要な情報となるであろう。

文献

- 1) Ariki, S., Koori, K., Osaki, T., Motoyama, K., Inamori, K., and Kawabata, S.: A serine protease zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 953-958 (2004).
- 2) Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., and Janeway, C.A. Jr., and Ezekowitz, R.A.B.: Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 288, 1313-1318 (1999).
- 3) Janeway, C.A. Jr. : Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 54, 1-13 (1989).
- 4) Iwanaga, S., Kawabata, S., and Muta, T.: New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J. Biochem.* 123, 1-15 (1998).
- 5) Osaki, T., Okino, N., Tokunaga, F. Iwanaga, S., and Kawabata, S.: Proline-rich cell surface antigens of horseshoe crab hemocytes are substrates for protein cross-linking with a clotting protein coagulin. *J. Biol. Chem.*, 277, 40084-40090 (2002).
- 6) Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A.: The dorsoventral regulatory gene cassette *spaetzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973-983 (1996).
- 7) Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. Jr.: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394-397 (1997).
- 8) Anderson, K. V. and Nusslein-Volhard, C.: Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature*, 311, 223-227 (1984).
- 9) Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M.: Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, 297, 114-116 (2002).
- 10) Inamori, K., Ariki, S., and Kawabata, S.: A toll-like receptor in horseshoe crabs. *Immunol. Rev.*, 198, 106-115 (2004).
- 11) Solon, E., Gupta, A.P., and Gaugler, R.: Signal transduction during exocytosis in *Limulus polyphemus* granulocytes. *Dev. Comp. Immunol.*, 20, 307-321, (1996).
- 12) Vu, T.K., Hung, D.T., Wheaton, V.I., and Coughlin, S.R.: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64, 1057-1068 (1991).
- 13) Coughlin, S.R.: How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11023-11027 (2000).
- 14) Kawabata, S. and Tsuda, R.: Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab tachylectins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1572, 414-421 (2002).
- 15) Nagai, T. and Kawabata, S.: A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J. Biol. Chem.*, 275, 29264-29267 (2000).
- 16) Nagai, T., Osaki, T., and Kawabata, S.: Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.*, 276, 27166-27170 (2001).
- 17) Osaki, T. and Kawabata, S.: Structure and function of coagulogen, a clottable protein in horseshoe crabs. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, (2004) in press.

かわばた しゅんいちろう
九州大学大学院理学研究院生物科学部門
e-mail: skawascb@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp
URL: www.biology.kyushu-u.ac.jp/~kawabata/

質量分析計を用いた ペプチド性腫瘍マーカー探索の試み

佐々木一樹

ペプチド学会の会員ではありませんが、ニュースレターは過去何回か拝見しておりました。今回、ニュースレターへの寄稿依頼をいただきましたが、貴学会はペプチド合成をはじめとする化学・薬学系の先生方が多数いらっしゃるとうかがっています。門外漢の立場として、ペプチドとの個人的な関わりや、表題に記しましたここ数年の仕事などを綴らせていただきますので御容赦願います。

大学生の頃、松尾壽之先生が雑誌に寄せられた「ストックホルムへの道」を拝読する機会がありました。視床下部ホルモンの一次構造決定までの熾烈な競争に感銘をうけると同時に、「いくつかの残基が修飾を受けているとはいえ、少数のアミノ酸がつながっているにすぎないペプチドが、なぜ生理作用の調整役としてふるまえるのだろうか」と大変不思議に思い、魅了されました。また、生化学系の授業では様々な場面にインスリンの事例が必ず登場し、京大の沼正作先生グループによる一連のペプチドホルモン前駆体遺伝子のクローニングのお話なども、ペプチドということで印象深くおりました。病棟実習が始まりますと、様々な内分泌疾患の患者さんや、ごくまれですが異所性ホルモン産生症候群の方をお見かけするようになり、非常に印象づけられました。私事ですが、身内が国立がんセンター病院にお世話になり、見舞いの私に

病棟主治医としてお声をかけてくださったのが、当時の研究所内内分泌部室長で病院併任でもいらした山口建先生（現静岡がんセンター総長）でした。その内分泌部では、各種の神経内分泌腫瘍が産生するペプチドを「網羅的」にRIAで測定していました。即ち、ペプチドホルモン30種類ほどについて矢内原昇先生に抗原用ペプチドを合成いただき、RIA系を組んでいました。神経内分泌腫瘍は非常に症例が少なく、全国の病院に検体のご協力を仰いでいました。大学の夏休みを利用して、私は研究部にお邪魔して培養やRIAの実際を体験させていただきました。卒業研究がありませんので貴重な経験でした。RIAは既知物質の測定ですので、私には若干不満な点もありました。「新しいペプチドを発見するような仕事がしたい」と思っていたところに、松尾先生のグループの数々の生理活性ペプチド発見のお仕事を知り、その気持ちが強くなりましたが、専門家不在の環境で独力で開始するのは困難であろうと観念していました。

一方、研究部では「網羅的な」RIAの結果、ガストリン放出ペプチド（GRP）が肺小細胞癌で高頻度に産生されることを明らかにしていました。¹⁾ 肺小細胞癌は神経内分泌腫瘍の一種で、喫煙との関連が強く示唆されており米国では非常に多い肺癌です。山口先生によりますと、GRP自身を対象にしたRIAでは血中での半減期の関係で安定した測定が困難だったそうで、GRPのプロ体部分を測定対象とすることで肺小細胞癌の腫瘍マーカーとしての開発にこぎつけたそうです。腫瘍マーカーとは、検診を受けられた方は御承知のように、採血などでがんの存在を推定し、また実際にがんであった場合に治療経過のフォローアップで目安として使用されるものです。それも一段落した頃、もはや新しい生理活性ペプチドは発見されないであろうという意見が研究部では強くなり、RIAの実験設備も撤去するに至りました。

1997年頃より、ゲルから蛋白質のバンドを切り出して質量分析法で同定する手法が欧米のライフサイエンスの一流雑誌に掲載されるようになりました。しかしながら質量分析は私には遠い世界のお話で、薬学部との合同授業で聞いた高速原子衝撃という難しそうな言葉を思い出すにすぎませんでした。省みると、このようなチャンスを活用できるか否かでその後の展開が違って来るようです。

1999年の学会で、「初心者でも使用可能な質量分析計」として表面改良型レーザー脱離イオン化法（SELDI）に基づく装置を知りました。各ピークを数値で区別できるという質量分析の直截的な恩恵に、素

人も与える期待がありました。これを応用すれば、医学的にも意味のあるペプチド、例えば腫瘍マーカーとなるペプチドが探索可能でないかと考えました。現在臨床に供されている腫瘍マーカーの多くは糖鎖抗原です（培養細胞をマウスに移植した場合、マウスの抗体が認識する抗原本体は殆どが糖鎖であることが知られています）から、糖鎖ではなくペプチドから何か新しい腫瘍マーカーを探索することを考えました。トリシンPAGEは時間もかかるし、分離もよいとはいえませんが、質量分析なら低分子量領域で高感度であろうし、多数のピークの比較検討によってがんの特異的なペプチドを見い出すのは容易であろうという、今考えると非常に単純な発想でした。「無知なるは幸いなるかな」という言葉通りであったと思います。

紆余曲折を経てようやく自分自身で質量分析計に触れるようになりました。腫瘍マーカーとして、癌細胞の分泌物を対象にするのが自然な流れですが、血液や培養液をHPLCで分離する経験が多少はあった私は、精製のことを考えると血液はハードルが高すぎると思いました。そこで、実用化されている腫瘍マーカーは培養細胞でも産生されるという現象を思い出し、培養細胞も意味があると判断したのです。私の方法はシンプルで、様々な細胞を培養し、培養に用いる血清成分を極力除去した後に、無血清培養上清として回収するものでした。SELDIはイオン化の原理はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法（MALDI）と同様で、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）よりは初心者向けであるとされていますが、確立したプロトコールは皆無でしたので手探りの状態でした。培養上清ですら難攻不落であって、手術材料や血液からのマーカー探索などは途方もないように思えました。その頃から、大学と同様に、勤務する研究所でも評価委員会が開催されました。委員の方々はMDですので、目新しさは評価いただけたのですが、「腫瘍マーカーが培養細胞から見つかるはずがない。なぜ血液や手術材料から始めないのか」「質量分析などでアミノ酸配列が本当にわかるのか」という医学系ならではの理不尽な批判もありました。しかし、研究所の性質上、「早期発見に使えるマーカーが見つからない限り無意味だ」とみなされるのはやむをえないところです。自分の名前で研究費をいただけるようになってからも、「肺小細胞癌の診断で有効性が確立したProGRPは、培養細胞からも放出されている」という点のみがよりどころでした。無血清条件下での培養でもっとも困難な点は、培養液中に放出されるペプチド量を増やそうと培養時間を長くしても、結局のところ目的物は分解してしま

い、無血清条件のストレスで死滅した細胞から、細胞骨格成分由来の断片ペプチドが沢山検出されることです。その加減は細胞によって様々ですので、すべて自分の目で確認する必要があります。

その後、2001年の3月になって、ようやく膵癌の培養細胞のみで見い出されるペプチドの同定に至りました。²⁾ 完全に丸腰の状態、分子量が大きなペプチドのタンデム質量分析による同定にはずいぶん時間がかかったことを思い出します。それは実際のがん組織にも存在し、膵液にも存在することを質量分析で確認できた為、第一関門通過で多少は安堵いたしました。その後、蛋白質やペプチドの質量分析で磁場型の時代より日本をリードされてきた阪大蛋白質研究所の高尾敏文教授に御指導いただけるようになって、「無知なるはやはり不幸なことだ」と痛感した次第です。臨床検査は、現在 non-RI が主流になっており、通常採血レベルで簡単に定量できるような系の構築を検討しています。腫瘍マーカーは偽陽性が常に問題になりますが、複数のマーカーの同時測定でその問題を少しでも解決することが現場では求められています。また、糖鎖抗原の腫瘍マーカーには、血液型糖鎖と構造を共有するものがあり、血液型によっては癌になってもマーカーが上昇しない場合があります。ペプチドをマーカーとして用いることでこの点が回避されることを期待しています。

いろいろなペプチドの合成を外注でお願いしている昨今ですが、ペプチド合成が今でも一筋縄でいかないのは門外漢にも推し量れます。直鎖の30残基ほどのペプチドでも、いくつかの業者をお願いして「合成できませんでした」と言われたものが、ペプチド研ではすぐに合成くださいました。合成してみたいペプチドはいくつか出てまいります、今でもオリゴヌクレオチドの外注に比較しますと時間も経費もかかります。ペプチド合成が大変な作業であるのは私なりに理解いたしました。研究者・ユーザー人口の問題もあるかと思いますが、基礎検討などではペプチドが少量でもよいので、もう少し手ごろな合成価格であれば望ましいと思います。蛋白質の機能ドメインをペプチドとして合成し、中和目的やデコイとして細胞内に導入する実験は、他の分野でこれから一般的になってくるように感じますので、需要は減る事はないと思われます。また、生理活性ペプチド探索は糖鎖関連遺伝子のクローニングと並び本邦が大きく貢献している領域なのは周知のことです。糖鎖の分野では国内で横断的な協力体制がとられつつあるようですが、ペプチドでもそのような体制で、各研究者のプライオリティを尊重しつ

つ、国際的な競争を勝ち抜けていけたらと願います。

創薬のターゲットとして生理活性ペプチドの将来性は今後も不動と思いますが、その他にも機能性ペプチドが医療の領域に活路を見出せる可能性は大きいと思います。とりとめもなく勝手なことを書かせていただきましたが、先生方の御指導をいただきながら、医療に貢献できるペプチドの一つでも見い出せればと思っています。

参考文献

1. Y. Miyake, et al. Pro-gastrin-releasing peptide (31-98) is a specific tumor marker in patients with small cell lung carcinoma. *Cancer Res.*, 54, 2136-2140 (1994)
2. K. Sasaki, et al. Peptidomics-based approach reveals the secretion of the 29-residue COOH-terminal fragment of the putative tumor suppressor protein DMBT1 from pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.*, 62, 4894-4898 (2002)

ささき かずき
国立がんセンター研究所細胞増殖因子研究部
e-mail: ksasaki@ncc.go.jp

第1回アジア-太平洋国際ペプチドシンポジウム 第41回ペプチド討論会

主 催 日本ペプチド学会

共 催 日本化学会、日本薬学会、日本農芸化学会、
九州大学大学院理学研究院（化学部門）

会 場 福岡国際会議場（福岡市）

会 期 10月31日（日）～ 11月3日（水）

発表申込締切 8月31日（火）

アブストラクト締切 8月31日（火）

事前参加登録締切 10月1日（金）

討論主題

- 1) コアプログラム「ゲノムペプチド、ペプチドーム先導研究」、「生理活性ペプチドの機能発現」、「ペプチドの機能構造構築原理の分子基盤」。
- 2) 若手先導シンポジウム：新進若手研究者（30代前半まで）の新規開拓分野での研究成果を特集。
- 3) シンポジウムセッション「ペプチド合成科学」「ペプチド分析科学」「ペプチド免疫科学」「ペプチド機能科学」「ペプチド構造活性相関科学」「ペプチド創薬科学」「ペプチド材料科学」「ペプチドホルモン科学」「ペプチド立体構造科学」の各主要分野の最先端テーマの講演。次の分野ごとに講演を募集します：

(1) Analysis, (2) Biofunctions, (3) Computations, (4) Diseases, (5) Hormones, (6) Immunology, (7) Materials and nanosciences, (8) Pharmaceuticals, (9) Structure, (10) Structure-activity relationships, (11) Synthesis, (12) Others.

招待講演 国内外の優れた研究者に交渉中です。

発表形式 講演発表は英語による一般講演（討論を含めて20分、プロジェクター使用）、またはポスター発表とします。プログラム編成により、発表形式の変更をお願いすることがあります。

事前参加登録料 10月1日まで（一般参加料にはプロシーディング代を含む）

一般：（学会員）4,000円、（共催学会員）8,000円
（非会員）10,000円

学生：（学会員）1,000円、（共催学会員）3,000円
（非会員）4,000円
プロシーディング代 2,000円。

懇親会 ホテル海の中道。

参加費：一般 8,000円、学生 4,000円

発表・参加申込方法 討論会ホームページより入力フォームをダウンロードし、FAX もしくは電子メール（apipscc@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp）にて送信して下さい。その他の情報は、ホームページを参照下さい。

市民フォーラム 10月31日（日）に同会場にて「生命（いのち）を守り、健康をつくるアミノ酸・ペプチド」と題して4つの講演と、展示実験を行います。詳細は世話人までお問合せ下さい。

連絡先 〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1
九州大学大学院理学研究院化学部門構造機能生化学研究室 APIPS-JPS 2004
代表世話人 下東康幸
TEL&FAX 092-642-2584
E-mail: apipscc@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp（学会用）
ホームページ：http://APIPS.scc.kyushu-u.ac.jp/

学会等案内

第37回 若手ペプチド夏の勉強会

平成16年8月8日（日）～ 10日（火）

京都府立ゼミナールハウス <http://www.kyosemi.or.jp/>
玉村啓和（京都大学） tamamura@pharm.kyoto-u.ac.jp

The 3rd International and 28th European Peptide Symposium Prague, Czech Republic, September 5-10, 2004

<http://www.28eps.com/>

編集後記

本号はペプチドの新しい探索法や利用法といった面から、最新の研究動向や成果、それらを踏まえたペプチド研究に関する意見などを、ペプチド学会会員以外の2名の先生にもお願いし自由を書いて頂きました。ペプチドの概念やそれをキーワードとする研究も日々拡大を続けております。各先生のこれまでの研究経験や実績に基づいた内容は、学会の皆様にも新しい視点を提供し、研究展開への手掛かりを与えてくれるのではないかと期待しております。本号の内容や今後の企画に関するご意見がありましたら、編集委員までお願いいたします。

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-8686 箕面市稲4-1-2

（財）蛋白質研究奨励会内

編集委員

三原 久和（担当理事）

（東京工業大学大学院生命理工学研究科）

TEL 045-924-5756, FAX 045-924-5833

e-mail: hmihara@bio.titech.ac.jp

大高 章（京都大学大学院薬学研究科）

TEL 075-753-4571, FAX 075-753-4570

e-mail: aotaka@pharm.kyoto-u.ac.jp

坂口 和靖（北海道大学大学院理学研究科）

TEL 011-706-2698, FAX 011-736-2074

e-mail: kazuyasu@sci.hokudai.ac.jp

前田 衣織（九州工業大学情報工学部）

TEL 0948-29-7830, FAX 0948-29-7801

e-mail: iori@bse.kyutech.ac.jp

南野 直人（国立循環器病センター研究所）

TEL 06-6833-5004 内線2507,

FAX 06-6835-5349

e-mail: minamino@ri.ncvc.go.jp

（本号編集担当：南野 直人）