



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.56

2005年4月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

ペプチド科学と私—過去・現在・未来—

昨年のペプチド討論会において、編集委員の方から PNJ の女性特集号に原稿を書いてくださいという依頼を受けたが、その時には私がペプチドに関わり始めたいきさつなら書けるかなあと思い、お引き受けしたものの雑務に追われ、締切の直前になってしまった。やっと時間ができたので、さあ書こうと以前のファイルなどを眺めていると、なんと、PNJ 2000年1月号に「2000年の抱負—女性科学者の立場から—」というタイトルで原稿を書いているではないか！依頼を受けた時、私が書こうと思っていた内容がほとんど書かれているので、そちらも参考にしていただきたい。今回は、「2000年以降の私の研究および2000年から5年が経過して、女性研究者の立場は変わったのか？」について記したいと思う。



赤松 美紀

以前に述べたように、私の主要な研究テーマは医薬品の構造活性相関であるが、ペプチドとの関わりは、「オリゴペプチドの構造と疎水性との関係」から始まった。その後、今より10年前になるが、現東京薬科大学の野水基義先生の御紹介で、NIH, NCIに1年間、留学させていただく機会を得、Dr. Peter Rollerの元でシグナル伝達機構の阻害剤開発プロジェクト研究に携わった。当時、野水先生もNIHの別の研究室におられたので、いろいろと教えていただきながら、主にペプチド合成を行ったが、1年間の研究にしては興味深い結果が得られ、ファーストオーサーで論文も出させていただいた。帰国後、留学先で行っていた研究が継続できれば良かったのだが、私の所属は農学部であるため、あまり薬学に偏った研究はそぐわない。どのような研究を行おうかと思案していたところ、薬学部で環状ペプチドのCaco-2細胞透過性に関する講演を拝聴する機会があった。Caco-2細胞は一種のガン細胞であるが、ヒト小腸モデル細胞として、非常によく使用さ

れている。かつて、ペプチドの疎水性研究を行っていたことから、これはおもしろいと思い、オリゴペプチドの構造と細胞透過性研究に着手することにした。このテーマなら、ペプチドの吸収という点で、農学部の食品関係の人にも興味を持ってもらえるはずである。幸い、農学部内でCaco-2細胞を使用していた先生がおられ、共同研究をさせていただくことができた。細胞をそれまで扱ったことがなかったので、最初はいろいろとトラブルも起こり苦労したが、何とか安定したデータが得られるようになってきた。しかし、研究を継続していくうちに、細胞の維持には時間と手間がかかり、そのわりには大量のデータが得られず、細胞透過性のデータのみでは、構造活性相関的に解釈することが困難であることに気付いた。そこで、新たに人工膜透過性実験系を立ち上げた。この系を用いるとハイスループットスクリーニングが可能だけでなく、無細胞系であるので、非常に再現性のあるデータを得ることができる。得られたペプチド関連化合物の人工膜透過性係数を構造活性相関解析し、人工膜透過性係数とCaco-2細胞透過性係数との相関を見ることによって、受動的に透過する化合物、ペプチドトランスポーターなどにより能動的に透過する化合物、P-糖タンパク質により排出される化合物を分類することが可能となった。近年、医薬開発の初期段階で化合物のADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) を予測してドラッグデザインを行うことが重要視されていることから、偶然とは言え、このテーマを選択したことは時代の波に乗ったと言えるかもしれない。現在は、ペプチドに限らず、排出ポンプであるP-糖タンパク質の基質について、構造活性相関を行うための研究を続けているところである。

さて、私が2000年の抱負について原稿を書いた時点から5年間に、女性研究者の立場は変わったのだろうか？以前の原稿を読み返してみても、驚くほど大きな変化は起こっていない。しかし、私の所属する農学研究科においても、2000年には女性教授が1人も存在しなかったと思うが、今は3名になっている。教授

以外の女性教員の数も少しずつではあるが増加している。また、最近では、学術委員会や省庁の委員会に女性委員を加えなければならないことから、そのような委員の依頼がたまに私のところにも回ってくる。「加えなければならない」というのは逆差別にもなりかねないが、改革の途中段階ではそれも致し方ないことであろう。大学の教授会も含め、重要な決定を下す会議の委員がこれまで男性ばかりであったことを考えると、そのような公の会議で、女性の意見を述べる機会が得られたというのは非常に喜ばしいことである。その分、女性も頑張らなければならないのだが。

考えてみれば、私自身、研究分野において、普段はあまり女性であることを意識していないように思う。知人友人も男性研究者の方が圧倒的に多い。しかし、ここで女性であることの不利な点、利点を考えてみると、不利な点もちろんあるが、特に理系分野においては女性研究者が少ないため、学会に参加した時、他の研究者の方々に名前と顔をすぐに覚えてもらえるという利点がある。特に国際学会ではそうである。私も、ヨーロッパペプチドシンポジウムに数回参加し、ポスター発表を行ったおかげで、国外よりむしろ国内の多数の先生方と顔見知りになり、私がどのような研究を行っているかを知っていただく機会に恵まれた。(少々古い写真で恐縮だが、関連写真を掲載している。失礼ながら、先生方のお名前をすべて記していないが、もちろん、皆さん、御存知の方ばかりである。写真に写っているのはテーブルの半分で、もっと多くの先生方がこの夕食会に参加しておられた。) 国内のペプチドシンポジウムでは、先生方は、通常、学生さん・卒業生・企業の人々に囲まれ、お忙しいのでなかなかお話しする機会がないが、外国では日本人参加者があまり多くないため、気さくに声をかけてくださる。一旦顔見知りになると、国内でお会いした時でも挨拶を交わしていただけるのである。研究を行う上で、さまざまな分野に多数の知人を持つということは一つの財産である。どんな時に共同研究などでお世話にならないものとも限らない。ペプチド分野の方に限らず、大勢の方々に助けていただいたおかげでここまで研究を続けてこられたことを心から感謝している。

最後に少しばかりペプチド科学について触れたい。現在は、ゲノムの時代である。ゲノムの解読が進み、遺伝子情報に基づいて、多数のタンパク質構造が解明されてきている。「ゲノム」というが、実はこれはアミノ酸配列情報である。タンパク質であり、ペプチドである。すなわち、ペプチド科学の時代であるということである。コンビナトリアルケミストリーの発展で

進化を遂げたペプチド科学研究が、また、新たな飛躍を遂げようとしている。私自身もペプチド科学研究の一端を担う者として、ほんの少しでも社会に貢献できるような成果を示すことができればと願っている。

最後になりましたが、将来にわたってペプチド学会のますますの発展を祈念致しますとともに、今後とも皆様よりいっそうの御指導・御鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。



25th European Peptide Symposium, Budapest, Hungary (1998) にて。

日本の先生方との夕食会。一番奥に座っておられるのがペプチド学会現会長の木曾先生。右から2番目が筆者。

あかまつ みき
京都大学大学院農学研究科
akamatsu@kais.kyoto-u.ac.jp

神経系におけるペプチドの働きを パッチクランプ法で調べる

細胞膜にはイオンチャネル、受容体、トランスポーターなど様々なタンパク質が存在しており、これらが機能することで細胞内外への物質の移動や細胞外から細胞内への情報伝達が行われます。これらのタンパク質の機能や作用機構を調べる研究方法には様々なものがありますが、筆者は現在、電気生理学的手法のひとつであるホールセル・パッチクランプ法を用い、脊髄後角における痛覚情報伝達の制御機構について研究しています。その内容を簡単に紹介させていただきます。



藤田 亜美

皮膚に与えられた痛み刺激の情報は、細胞膜を挟んで存在する電位の正負の一過性逆転（活動電位）とし

て一次求心性感覚神経を通して脊髄後角第II層（膠様質）まで伝えられます。その後、シナプス前末端からシナプス後細胞へとグルタミン酸が放出されることでシナプス後細胞の膜において Na^+ イオン電流が発生し、その結果シナプス後細胞が興奮して痛覚情報が伝達されます（図1）。さらに、この痛み情報は別の神経に伝えられて脳に至り痛みとして感じられます。その膠様質における神経と神経の継ぎ目であるシナプスは、種々の内因性および外因性鎮痛物質の作用部位であり、痛覚情報伝達制御の要になります。筆者らの研究室では膠様質におけるシナプス伝達に対して、どのような物質や受容体が、また、どのような作用機構が関与しているのかについてパッチクランプ法を用いて解明しようとしています。パッチクランプ法は細胞膜に存在するイオンチャネルの活動を調べる方法であり、チャネルが開口し、イオンがそのチャネルを通過することで生じるイオン電流を記録します。¹⁾ ホールセル・パッチクランプ法では、先端の径が1～2 μm 程度のパッチ（ガラス）電極が神経細胞にわずかに触れることで生じる電気応答の変化を手がかりに、電極の先端を神経細胞の膜に密着（ギガオームの抵抗を持つシールの形成）させます。この後、電極内部に陰圧をかけて電極と接した細胞膜（パッチ膜）を破り、電極と細胞質が導通した状態で細胞の電気応答を記録します。^{2,3)}

筆者らの研究室では、ラット脊髄のスライス標本を用いて脊髄後角における膠様質細胞から膜電流・膜電位を記録し、この標本に種々の薬物を灌流投与した時に現われる応答を調べています（図1）。^{4,5)} 筆者は特に膠様質における μ -オピオイド受容体のアゴニスト

ペプチドであるエンドモルフィン（エンドモルフィン-1およびエンドモルフィン-2；EMs）の作用を調べています。膠様質細胞の膜電位を-70 mVに固定した条件下（Voltage-clampモード）でEMsを灌流投与すると、図2 Aに示すように上向きに変化する（膜を通して細胞内から外に流れる）膜電流を記録できます。これはシナプス後細胞に存在する μ -オピオイド受容体がEMsによって活性化される結果、細胞膜に存在する K^+ チャネルが開口し濃度差・電位差に従って細胞内から細胞外へ K^+ が流出するために生じるものです。これは膜の分極状態を大きくする（過分極を起こす）結果となり、そのため細胞の膜興奮性は低下し、末梢からの痛覚情報の伝達が起こりにくくなります。また、EMsはシナプス前末端に存在する μ -オピオイド受容体を活性化し、膜興奮性作用を持つグルタミン酸の放出量を減少し、膜の興奮性を低下させる作用もあります。これは図2 Bに示すようにシナプス後細胞で下向きに記録される Na^+ イオン電流の出現頻度の減少から知ることができます。これらの結果から、EMsは膠様質において μ -オピオイド受容体を活性化し末梢から中枢への痛覚情報の伝達を抑制して鎮痛作用に寄与することが示唆されます。現在筆者らの研究室では、種々の鎮痛物質や受容体についてそれらの脊髄後角レベルにおける痛覚情報伝達の制御機構を明らかにしようとしています。これら一連の研究結果から、新しい鎮痛薬の開発に役立つ情報が得られることが期待されます。

筆者は平成13年に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（下東研究室）から佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野（熊本研究室）に赴任致しました。下東研ではアミノ酸やペプチ

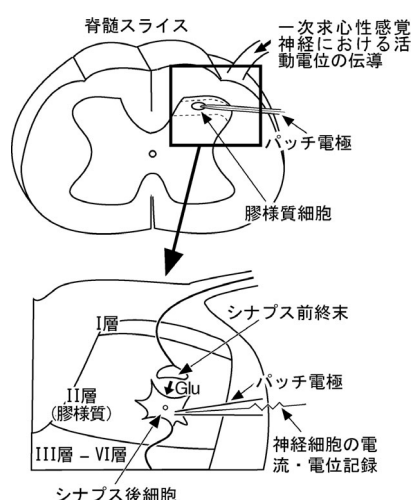


図1 脊髄スライスにおける膠様質細胞からの電流・電位記録。

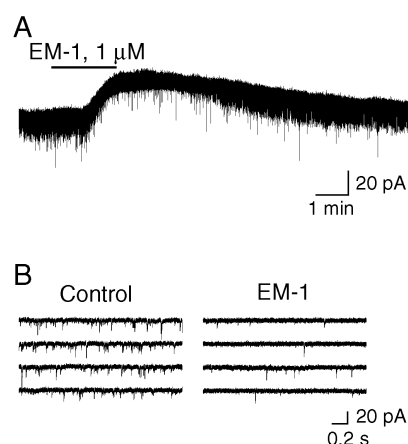


図2 脊髄膠様質における痛覚情報伝達のエンドモルフィン-1(EM-1)による抑制。シナプス後細胞(A)とシナプス前終末(B)に対する作用。

ドの合成および受容体発現系を用いたアッセイなどの生化学的な手法を用いて受容体の構造と機能の相関を明らかにしようとしておりましたが、熊本研ではパッチクランプ法という電気生理学の手法を用いて脊髄後角レベルにおける痛覚情報伝達制御におけるペプチドの働きの解析を行なっています。研究室名に同じ「構造機能」という言葉が含まれているとはいえ、全く異なる分野の研究に携わる機会を得ることができました。アプローチに用いる手法は違いますが研究対象としているものは一貫してペプチドと受容体の機能であり、研究のスタート地点である学部4年生の時にまず「ペプチド科学」を学び、その後に続く研究の基礎とできたことは筆者にとりとても幸運なことであったと思います。物質の機能を明らかにしようとした時に「ペプチド科学」的な事柄はいつもなにかしら関連していますし、また、これを基礎として持っているからこそ、何かユニークな発想ができるのではないかと思います。今後とも日々研究に精進していきたいと思うので、これからもご指導ご鞭撻のほどよろしくお願い申し上げます。

最後になりましたが、九州大学の下東康幸先生、野瀬健先生、佐賀大学の熊本栄一先生、その他多数の方々にご指導やご協力を頂きました。紙面をお借りして心よりお礼申し上げます。



【参考文献】

1. E. Neher and B. Sakmann, Nature, 260, 799-802 (1976).
2. O.P. Hamill, et al., Pflügers Arch., 391, 85-100 (1981).
3. B. Sakmann and E. Neher, Single Channel Recording, 2nd Ed.; Plenum Press, New York (1995).
4. K. Yang, et al., Brain Res. Protoc., 7, 235-240 (2001).
5. T. Liu, et al., Brain Res. Bull., 64, 75-83 (2004).

ふじた つぐみ
佐賀大学医学部生体構造機能学講座
神経生理学分野
e-mail: fujitat@cc.saga-u.ac.jp

明石海峡大橋の見える研究室より

今回、PNJ 編集委員の前田衣織先生より「女性研究者特集」への記事を依頼されました。何について書いてもいいとのことでしたので、研究室の体制、研究内容について紹介したいと思います。さて、当研究室（神戸学院大学薬学部第一研究室）



北條 恵子

は、スタッフ構成員（5＋1名）のうち4名が女性であり、数の上（それ以外も？）で女性優位となっている珍しい合成系の研究室です。薬学部が元来数の上で女性優位であることもあり、当研究室では毎年たくさんの神戸ジェンヌ達がペプチド化学の一端をかじって卒業していきます。華やかなジェンヌ達に混じって研究室に配属された数少ない男子学生は大学院へと進学し、川崎、岡田両先生に鍛えられペプチド化学を基礎とした研究者となって巣立っています。神戸学院大学薬学部の特色は、高い薬剤師国家試験合格率（昨年度は全国一位）であることから、学生のほとんどが薬剤師の道を選択し、科学者を目指す者はほんの一握りの学生です。そのような中、川崎、岡田両先生の神戸学院をペプチド化学のメッカにしようという合言葉のもとに、現在、当研究室では博士課程2名、修士課程2名の院生が、女性スタッフに囲まれながら共に、日々研究に取り組んでいます。

神戸学院大学ハイテクリサーチセンター

平成12年度より、神戸学院大では理系学部（薬学部、栄養学部）の研究の活性化と相互協力による研究の発展を目指して、薬学研究科と栄養学研究科で構成する食品薬学総合科学研究科を組織母体とした神戸学院大学ハイテクリサーチセンター（HRC）が立ち上げられました。HRCは、「癌治療薬開発部門」と「生活習慣病対策部門」の2つの部門で研究を展開し、「高齢化社会における加齢性疾患の予防・治療薬の開発研究」と題したプロジェクトを推進しています。薬学部であることを活かし、薬の合成設計、合成技術、その生物活性の測定、機構解明から薬剤開発まで統合したトータルな治療薬開発が推進され、6年目を迎えて着実な成果が挙っています。我々の研究室は、「癌治療薬開発部門」に所属し、川崎先生を中心とする研究グループと岡田先生、津田先生を中心とする研究グループに分かれて、それぞれ「癌転移抑制剤の開発—高分子架橋ペプチドの合成と応用—」、「酵素阻害剤およびアゴニスト、アンタゴニストのデザインと医薬品への

応用に関する研究」をテーマとしています。

川崎研究グループ（第一研究室（1））

川崎先生を中心とする研究グループ（川崎，前田，北條）では，HRCのテーマのもとに①小分子生理活性ペプチドと高分子とのハイブリッド体の合成，②次世代アデノウイルスベクター（Adベクター）の創製，③グリーンケミストリーを指向したペプチド合成を中心に研究を進めています。①の小分子生理活性ペプチドと高分子とのハイブリッド体の研究は，高分子によって小分子の生理活性は失われてしまうであろうとの推測からほとんど研究がなされていませんでした。しかし，当研究グループで合成した細胞接着分子の活性配列（RGD，YIGSR）と高分子ポリエチレングリコール（PEG）とのハイブリッド体に強い癌転移抑制作用が認められ，現在では，多機能型すなわちいくつかの生理活性ペプチドを組み合わせたドラッグデリバリーシステム（DDS）を指向した高分子ハイブリッド体の合成研究¹⁾へと発展しています。②ではAdベクターの表面タンパク質に，生理活性をもつペプチドやそのPEGハイブリッド体を組み込むことで，新しい機能を付与したベクターの開発に取り組んでいます。すでに，RGD-PEGを付与したAdベクターが高い標的性と遺伝子導入率を持つことを見だし報告しています。²⁾③では，環境にやさしいペプチド合成をめざして，有機溶媒を用いない水中での固相合成について検討を行い，成果³⁾を挙げています。HRCにおいて，ハイブリッド体，水中合成をキーワードに研究を展開し，いずれも国内外の共同研究者の協力を得て，ペプチド討論会をはじめ，様々な国際シンポジウム場で発表するに至っています。

岡田・津田研究グループ（第一研究室（2））

岡田先生，津田先生を中心とする研究グループ（岡田，津田，宮崎）は，従来より酵素活性中心や受容体における分子認識に基づく阻害剤やリガンドの分子設計を行っています。HRCの研究では，2',6'-dimethyl-L-tyrosine（Dmt）を中心にオピオイドリガンドの開発を推進し，①経口投与可能なオピオイドミメティクスの開発，②小分子オピオイドリガンドの開発，③抗腫瘍活性を有する化合物の探索を行っています。①では，ピラジノン環をスペーサとしたDmt二量体が，経口投与によっても鎮痛効果を示すことを発見し，ピラジノン環に脳-血液関門を通過させるキャリアーとしての可能性を見いだしました。⁴⁾その機構の詳細，最適化について現在検討中です。②では，Dmtがオピオイド受容体における新しいファーマコフォアになり得るとして着目し，Dmt誘導体，Dmt類似体の合成を行

い，それらのオピオイドリガンドとしての可能性を報告してきました。⁵⁾また③では，ソマトスタチンアナログTT-232の構造をもとに環状ペプチドミメティクスを開発し，それらに腫瘍細胞に対する強いアポトーシス活性を見いだすなど成果⁶⁾を挙げています。これらHRCで行ったいずれの成果も，ペプチド討論会や，APS，EPSで内外に発表し，国内はもとよりアメリカ，ハンガリー，オーストラリアと広く国際的な共同研究へと発展しています。

おわりに

来春（平成18年度）より薬学部は6年制へと移行します。また，平成19年度には，明石海峡の見えるこの高台からポートアイランドへと一部キャンパスを移転します。現在，神戸学院大学はその体制の移行，世代交代が重なり，大学改革，学部内改革の嵐の真っただ中にあります。HRCや講座を中心とした研究体制も，これまでとは違った体制へと変化していくかもしれません。川崎，岡田両先生によって始まった神戸学院大学でのペプチドをキーワードとした研究は，ペプチド合成を機軸として，DDS，遺伝子デリバリー，受容体と低分子リガンドの構造活性相関解析へと，HRC，国内外との異なる分野の研究者の方々との継続的な共同研究を通して進展してきました。今後，我々4名の女性スタッフと巣立っていった大学院生が受け継ぎ，発展できるように研究に精進していきたいと思っています。



文献

1. Hojo, K., *et al.* A bivalent poly (ethylene glycol) hybrids containing an active site (RGD) and its synergistic site (PHSRN) of Fibronectin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 1423-1429 (2001).
2. Maeda, M., *et al.* Design and synthesis of a peptide-PEG transporter tool for carrying adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 621-624 (2005).
3. Hojo, K., *et al.* Solid-phase peptide synthesis in water. III. A water-soluble *N*-protecting group, 2-[phenyl(methyl)sulfonio]ethoxycarbonyl tetrafluoroborate, and its applica-

tion to peptide synthesis. Tetrahedron, 60, 1875-1866 (2004).

4. Jinsmaa, Y., *et al.* Oral bioavailability of a new class of μ -opioid receptor agonists containing 3,6-bis[Dmt-NH(CH₂)_n]-2(1*H*)-pyrazinone with central-mediated analgesia. J. Med. Chem., 47, 2599-2610 (2004).
5. Fujita, Y., *et al.* Studies on the structure-activity relationship of 2',6'-Dimethyl-L-tyrosine (Dmt) derivatives: bioactivity profiles of H-Dmt-NH-CH₃. Bioorg. Med. Chem. Lett., 15, 599-602 (2005).
6. Miyazaki, A., *et al.* Design and synthesis of novel type somatostatin analogs with antiproliferative activities on A 431 tumor cells. Tetrahedron Lett., 45, 6323-6327 (2004).

ほうじょう けいこ
神戸学院大学薬学部第一研究室
e-mail: hojo@pharm.kobegakuin.ac.jp

第5回ペプチドフォーラム (日本海ペプチドフォーラム) 報告

今回のPNJは女性特集号との事で、原稿依頼が私のところにまで来てしまいました。折り良く締め切り直前に、熱気溢れたペプチドフォーラムの開催に携わる機会を得ましたので、その報告を記載いたします。

「日本海ペプチドフォーラムーペプチドサイエンスに産学連携を探るー」と称して北陸地方で初めて開催された第5回ペプチドフォーラムは、2005年1月29日に、富山国際会議場にて小野 慎先生（富山大工）にお世話いただき開催されました。北陸地方は現在ペプチド研究分野の過疎地域にあたり、また富山県には伝統ある売薬との関連により製薬会社などの医薬分野関連企業などが多数存在します。そのため、フォーラム開催により、北陸地方ははじめ全国からご参加いただける大学および企業の皆様へのペプチド関連研究分野の拡張および産学連携の推進を目指しました。

フォーラムには79名の参加者が全国から集い、当初準備した椅子が不足して追加が必要な大盛況でした。参加者所属は大学関連（58名）、企業および研究所等（19名）、地元新聞社（2名）など多方面におよびました。また、非学会員の方にも多数ご参加いただくことができました。さらに、フォーラム開催以前に大学へ電話で、「共催学会誌に掲載してある案内をみたのですが、フォーラム会場には本当に誰でも無料で、事前



興村 桂子

登録無しに、人数制限無く入ることができるのですか？」という問い合わせをいただいた方もあり、手応えを感じていました。なお、帰り際に大変興味深く面白かった、と言ってくださった参加者もあり、大変嬉しく思いました。また、参加者のうち女性は8名のみ（報道機関所属を除く）であり、まだまだ理科系分野の研究所や大学（学生を含む）における女性の割合の低さを感じました。社会全体としては、以前に比べて格段に女性も研究を続けられる環境が整いつつあるので、今後さらなる女性研究者の増加および躍進を期待しています。

また、今回のフォーラムにおいては「パンフレット」を作成しました。内容としては、日時、会場、プログラム、主催：ペプチド学会（ホームページアドレスも記載）、共催学会、後援などの他に、参加者の紹介として講演者、座長、ペプチドサロン（ポスター発表）展示者および討論参加者の合計20名の氏名、所属、専門分野、現在のテーマを記載しました。これまで他分野の先生方からペプチド学会ではペプチド合成についての専門的な「ペプチド化学（Chemistry）」を扱っていて特殊で近寄り難い、と言われたりしていましたが、この記載内容は「ペプチド化学」だけでは納まりきれない現在の「ペプチド科学（Science）」の幅広い研究分野を示唆するものとなり、以前よりは親しみを感じたところのご意見を伺うことができました。また、このパンフレットは、まず、昨年秋に福岡で開催されたAPIPS-JPS 会場の片隅に（仮作成品でしたが）100部置かせていただき、宣伝に努めました。そこで皆様から得たご意見を参考にバージョンアップし、業者に依頼して印刷した大変美しいカラー印刷のペプチド学会ロゴマーク入りパンフレットとしました。その一部を用いて予めいくつかの（主として北陸地方の）大学研究室や企業に参加の依頼をし、残りは当日の参加者に配布しました。

さて、今回のご講演では、松田恒平先生（富山大理）は「動物の行動を支配するペプチドー脳ペプチドとペプチド性フェロモンー」というタイトルで、金魚へのペプチド脳内投与による摂食作用の検討およびイモリのフェロモンについて、芳坂貴弘先生（北陸先端大）「遺伝暗号を拡張した人工タンパク質合成システムの開発とその応用」は、4塩基または5塩基コドンを用いての非天然アミノ酸の導入による人工タンパク質の合成について、向井秀仁先生（三菱化学生命研）「ペプチド研究の新たな進展ー事業化を見据えた基礎研究についてー」は、近年提唱されているクリプティック機能ペプチドについて、石田 斉先生（北

里大理)「非天然アミノ酸を用いた光機能性人工蛋白質の分子設計と合成」は、ルテニウム錯体を用いての光機能性人工タンパク質合成について、林 良雄先生(京都薬大)「 α -ヒドロキシ- β -アミノ酸を基盤とした有機化学・創薬化学研究」は、 α -ヒドロキシ- β -アミノ酸を用いる難溶性ペプチドや医薬品の水溶性前駆体合成についてなどをお話いただきました。これらは全てペプチド化学合成のみには縛られず、ペプチドをツールとして用いるご研究や、今回のフォーラムの副題にもある「産学連携」を見据えてのペプチド研究を視野にいられたものなど、ペプチド科学分野のこれからの広がりを感じることができ大変興味深くかつ魅力ある内容のものばかりでした。そのため質疑応答が白熱し、軒並み時間超過が相次ぎました。また、ペプチドサロンと称するポスターセッションを部屋後部入口付近に設け、向井秀仁先生(三菱化学生命研)、平野義明先生(大阪工大)、川上 徹先生(阪大蛋白研)、坂本 寛先生(久留米大医)、小川智久先生(東北大院生命科学)、小暮健太郎先生(CREST・JST、北大院薬)、小野 慎先生(富山大工)および興村桂子(北陸大薬)のポスターを終日掲示しました。今回、このような活気溢れるフォーラム開催の一端を担うことができたことを大変嬉しくかつ光栄に思っております。

今回のフォーラムは、冬の北陸という、気候、地理共に不便な地域での開催であったにもかかわらず、ペプチド学会会員に加えて非会員も全国から多数ご参加いただくことができましたので、ペプチド最先端研究の一端を示すことにより講演内容だけでなくペプチド学会自体のPRにもなったと思います。従来から研究対象とされてきた生理活性ペプチド、抗菌ペプチド、ペプチド性医薬品などに加えて、近年、機能性食品としてなど、新たな各種機能性ペプチドも急速に注目を集めつつあります。また、ペプチドを部分的に用いて新たな機能を構築するような研究なども進みつつあり、これからのペプチド研究の方向性はますます多様化し、境界領域での研究なども含めてますます幅広く進んでいくのでは、と、今後のペプチド研究領域の更なる発



ペプチドフォーラム終了後に会場前にて撮影

展を楽しみにしておりますと共に、私も何とか取り残されないように頑張らなくては、とも思っております。

最後に、日本ペプチド学会はじめご助成およびご協力いただいた皆様に厚く御礼申し上げます。

おきむら けいこ
北陸大学薬学部
k-okimura@hokuriku-u.ac.jp

平成16年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

この度は、大変栄誉ある日本ペプチド学会奨励賞をいただき大変恐縮に感じており

ります。学会長の木曾良明先生をはじめ、理事、幹事、評議員、選考委員の先生方のみならず、様々な機会においてご指導いただきました日本ペプチド学会会員の先生方、夏の勉強会参加者の皆様に紙面



佐藤 孝

をお借りして改めて御礼申し上げますとともに、今後活躍できるよう頑張らねばと身の引き締まる思いです。

私はかねてよりペプチドや蛋白質の機能発現の基本となる立体構造がどのようにして機能に関わっているのかという問題に強い興味をもっており、現在もそのスタンスから研究を行なっています。立体構造と機能発現の相関を考えた場合、たとえば抗原提示蛋白質のように、その全体構造が機能を説明するのに十分なインパクトを有する場合がありますが、その様な例はむしろ少なく、殆どの場合は構造機能相関の研究を進めることによって、徐々に分子の性質や機能発現構造が見えてくる場合が多いと思います。私は、このような構造機能相関研究において、置換の結果生じた分子構造全体への影響をつぶさに評価できれば、置換による活性や機能の変化を clear-cut に評価できると共に、何か新しい事実が見えてくるのではないかと考えていました。

大学卒業後、蛋白質研究所の下西康嗣先生の研究室で修士・博士課程の学生として実験する機会に恵まれました。そのころ毒素原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシン(ST)の詳細な構造活性相関の研究がなされており、様々な種間に保存された配列である -Asn-Pro-Ala- 配列の中でも、特に Ala 残基の置換によって毒素活性が劇的に変化する事が見出されていました。ST は、分子内に3組のジスルフィド結合を有するペプチドであり、また先ほどの Ala 残基を含む三つの SS 結合を有する13残基からなるコア構造(構成

アミノ酸の約半分がSS結合！)が、天然毒素と同等の活性を有することから、系統的な立体構造機能関連研究を進めるうえで格好の材料と考え研究に着手しました。

折りしも NMR によるペプチド・蛋白質の立体構造解析が次々と進められていた時期であり、下西研究室の方々のみならず、蛋白質研究所小林祐二先生や研究室の大学院生の方々にお世話になりながら、活性型コアペプチドと、Ala 残基を置換することによって毒素活性、及び ST 受容体結合能の消失したアナログの測定を進めました。その結果、これらが、おおよそ同様の立体構造を有するという情報を得ることが出来ましたが、詳細な置換残基による構造の差異を説明しうる構造を得るには到りませんでした¹⁾。

NMR による構造解析と並行して、X 線結晶構造解析によってもこれらアナログの立体構造解析を行いました。本題から少しそれてしましますが、ペプチドの X 線解析については、しばしば質問を受ける事があるので、この場を借りて私の経験を元にご紹介させていただきます。当初は私が無知であったのですが、調べて見ると分子量千〜数千程度の化合物については、以下の2つの点において原理的に解析が困難であることを知ると同時に、当時報告されていた同様の分子量を有するペプチドの解析結果は、これらの問題を試料の構造特殊性において解決していることを知り愕然としました。簡単に触れると、一つ目は結晶化の問題、すなわち有機化合物の結晶化法の利用では結晶化が困難であり、また蛋白質の結晶化で用いる沈殿剤を利用する方法では、目的分子と沈殿剤が拮抗し、これが結晶化を妨げる不純物として振舞う事、二つ目は構造解析法の問題で、有機化合物で用いられる直接法や重原子法では対象分子が大きすぎ解析が困難であり、また蛋白質の解析に用いられる重原子同形置換法を用いるには結晶がタイトであることから同形置換が困難と言う点です。ところが、シートやヘリカルな規則構造を有するペプチドはこれらのいずれの問題においても都合がよく、ゆえに解析結果の報告があることを悟りました。イオンチャンネルを形成する Gramicidin A や平面環状構造を有するイオノホアなどは、構造面のみならず解析の目印となる重原子を本質的に包含するので、さらに都合の良いサンプルとなります。1986年に Hruby らによって発表された Oxytocin の構造は例外的成果に近く、当時としては合成と構造解析の両面において手の込んだものだと思います。これは、最初の回折データの報告より最終結果の報告まで20年の歳月を経ている事からも、断続的に続けていたにしろその様子が伺えます。

途方に暮れていても仕方が無いので、まずは活性型のコアペプチドを大量に合成しいろいろ試してみました。沈殿剤を用いる方法を試してもやはり見込みが無かったので、正攻法?で純度を可能な限り高めた試料を大量に得る事から始めて、最終的には、シリコンの結晶化に用いられるブリッジマン法にヒントを得て、加温溶液からの徐冷中の液面中心に磨いた金属芯で「冷点」を作りこれを徐々に引き上げる事により解析に適した結晶を得る事が出来ました。形振り構わずいろいろ試していたので、通りかかった人から「いったい何してるの?」とよく訝られました。また、SS結合の架橋も結局 hi-dilution での架橋後、この溶液を直接 HPLC で濃縮・精製するのが、良い結晶を得るためには適した方法であったことから、バケツで攪拌されている云々 L の空気酸化反応液を全部 HPLC に導入する²⁾など行いましたが、これも傍目には相当変だったと思います。それらを許可し支援して頂いた研究室の環境に本当に感謝しています。この際、普通に HPLC で精製したペプチドも多量に injection すると結構な不純物が見えてくる事や、きれいに分離しようとして少しずつ精製を繰り返すとカラムからの不純物の蓄積によってかえって結晶化が上手くいかない(見かけの結晶は出来ても回折斑点が乱れる)サンプルが取れるなど、本当に細かい点ですがいろいろ know-how を蓄積して実験の再現性を高めました。

いよいよ予備的な回折データを収集する段階となりその結果を見たときは、かなり喜びました。結晶はその対称性より230種の空間群に分類できますが、得られた結晶の空間群は一目で $P2_12_12_1$ で、これはすべての軸の位相が総当りで推定可能な必勝パターンであり、解析の困難さは分子量数百から五百程度の分子と同等に下がります。また、回折斑点も高分解能側まで伸び、さらに3組のSS結合の硫黄原子の電子密度の高さにも助けられて、程なくその構造を明らかにすることが出来ました。装置の都合で、公称分解能は $0.89 \text{ \AA}$ にとどまりましたが、条件の良い結晶を多数用いて繰り返しデータを蓄積する事により、最終的に数十分の一 $\text{\AA}$ の構造の差異の議論にも十分耐えうる結果を得る事が出来ました(1 ETL, 1 ETM, 1 ETN)。現在では、波長自在な放射光装置が利用できる所以で状況は随分異なりますが、先の結果は、分子シミュレーションのモデルペプチド等としても利用されている様です。その後、様々な毒素活性・受容体結合活性を有するアナログの構造解析を試み、最終的に5種類のペプチドについて、詳細な構造活性相関の検討が可能な最終構造を得ることが出来ました。これらの結果は、

解析法の改良とプログラム開発を続けると同時に、最初に得た構造を上手く利用した結果得たもので、また実験の順に少しずつ解析の難しい結晶を得る事が出来たと言う偶然に恵まれたことも大きく関与していると思います。

このようにして得た構造を元に、毒素活性、受容体蛋白質結合特性との相関を調べました^{3,4)}。特に13位 Ala の Gly, Leu への置換がそれぞれ活性・受容体結合能の低下及び消失を招くことから、これら3種の結晶構造を明らかにしたところ、分子を構成する3つのセグメント構造そのものには、置換による構造変化が見られないという結果を得ました。全体の重ね合わせにおいては最大で0.5 Å 程度の構造のずれが見られましたが、これは、それぞれのセグメント構造間の相対位置が変化している為である事が解りました。このペプチドは配列のおよそ半分を SS 結合が占めますが、このような分子においてもある程度のフレキシビリティが保たれている事は興味深いと思います。それぞれのセグメントに光アフィニティー基を導入したアナログを用いた受容体結合・修飾実験の結果、先の NPA 配列を有する中央セグメントのみに、受容体蛋白質との相互作用が確認された事から⁵⁾ 受容体によるこの Ala 残基の構造認識は厳密であり、同じメチル基一つの増減においてもでも、除去された場合は失われた側鎖部分の相互作用のみが消失するのに対し、追加された場合には (2-aminobutyl) acid アナログ) 構造相補性の崩れにより多くの相互作用が失われる事が示唆され、またこの受容体への結合には疎水性相互作用をはじめとする相補的な近距離相互作用が重要であることが示唆されました。さらに詳細に調べる為にこの Ala¹³ に隣接し中央セグメント β ターン構造の i + 2 となる Pro¹² についてもメチレンを減算してゆく形で受容体相互作用の変化を調べたところ⁶⁾、Ala¹³ における実験結果と含めて、結合定数より算出される見かけの結合エネルギー変化が、置換によって失われる疎水性分子表面積にほぼ比例することを見出すと同時に、この Pro-Ala 側鎖における相互作用が結合エネルギーのかなりの部分を占めるという興味深い可能性が示唆されました。

ところで、上記の構造解析に用いたペプチドは結晶化を容易にするために N 末端をデアミノ体としていたのですが、最終的にはアミノ基を有する物についても構造解析を行いました。メタノールを主とした溶媒から得た結晶を解析したところ、ST は疎水性条件下においては環状6量体を形成する事が見出されました⁷⁾。仮説を証明する実験は未だ出来ていませんが、この多

量体構造は、受容体活性化メカニズムや過去に示唆されているカルシウムイオノホア様の活性を示す事実を解釈する上で非常に興味深いものと考えています。

現在奉職中の佐賀大学においては、ST の研究で得た知見を基に POI という38残基のペプチドと、関連蛋白質の研究を進めています⁸⁾。POI は、昆虫フェノールオキシダーゼ阻害因子で、ターゲット酵素は昆虫の生育に必須であることから、これらの阻害因子を用いた害虫防除法への応用を視野において研究を続けています。POI は、強力な阻害能を有するだけでなく高い種選択性を持つことから、その親和性及び選択性の要因を明らかにし、その機能と立体構造との相関をもとに、実用化可能な分子と利用方法のデザインを進めて行きたいと考えています。自分の中での位置付けとしては、ST と同じ3組の SS 結合で固定されたペプチドでも、より大きくフレキシビリティに富んだ分子へのステップアップと捉え、静的構造だけでなく、その自由度と結合特性や阻害特性との相関を研究し、分子デザインに役立つ様な一般則が見出せればと鋭意研究を進めています。また、現在佐賀県に放射光設備が設置されまもなく稼動を始める状況ですが、此処においても ST での経験を生かして含硫蛋白質の新規解析法等で何らかの寄与ができればと考えています。今後とも先生方の御指導・御鞭撻のほどよろしく御願い致します。

最後になりましたが、以上の研究は蛋白質研究所 (現長浜バイオ大学) 下西康嗣先生の指導の下で行なったものであり、多くのご指導ご協力を頂きました研究室の皆様にご礼申し上げます。ペプチド合成に関しては相本先生、北條先生にお世話になりました。NMR を用いた構造解析には、小林先生、玉置先生をはじめとする研究室の皆様、また X 線結晶構造解析は、勝部先生、畑先生、山口先生を始め多くの皆様にご指導いただきました。生物活性測定は、竹田先生、山崎先生、伊藤先生にお世話になりました。さらに、PNJ 編集委員の三原先生・前田先生には入稿に関してお世話になりました。本当にありがとうございました。

参考文献

- 1) Yamasaki, S et al, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 2063-2070, 1990
- 2) Sato, T et al, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 938-940, 1992
- 3) Ozaki, H. et al, *J. Biol. Chem.*, **266**, 5934-5941, 1991
- 4) Sato, T. et al, *Biochemistry*, **33**, 8641-8650, 1994
- 5) Hasegawa, M., et al, *Letters in Peptide Science*, **4**, 1-11, 1997
- 6) Okumura, T. et al, *Peptide Chemistry 1993*, 217-220,

1994

7) Sato, T. and Shimonishi, Y., *J. Peptide Res.*, **63**, 200-206, 2004

8) Daquinag, A. et al, *Biochemistry*, **38**, 2179-2188, 1999

さとう たかし
佐賀大学農学部生化学教室
sugartap@cc.saga-u.ac.jp

【学会より】

第42回ペプチド討論会

平成17年10月27日（木）～29日（土）

千里ライフサイエンスセンター（大阪）

発表申込締切：8月31日（必着）

世話人：近畿大学理工学部 若宮建昭

www.chem.kindai.ac.jp/jps42

www.peptide-soc.jp

6th Australian Peptide Conference

October 9-14, 2005, Hamilton Island, Queensland

www.peptideoz.org

第19回アメリカペプチドシンポジウムへの

若手研究者の参加支援（JPS Travel Award）について

第19回アメリカペプチドシンポジウムに参加し、研究発表する2005年4月1日現在で35歳以下の若手研究者5名程度に参加支援金5万円/人を支給します。希望者は、2005年5月1日までに、必要事項（氏名、会員番号、所属および身分、生年月日、提出したアブストラクト、受理通知先電話番号あるいはメールアドレス、推薦者の名前、会員番号、所属および連絡先）を書き、e-mail（shimoscc@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp, RTFファイルとして提出したアブストラクトを添付）で庶務担当下東康幸理事に申し込んでください。やむを得ない場合は郵送でも結構です。選考は学会賞等選考委員会で行い、5月中旬に結果をお知らせします。

なお、旅費の支援が決定された後、参加を取りやめた場合には支援金を返却していただきます。また、APSからの助成金との重複受領はできません。

第38回若手ペプチド夏の勉強会

若手ペプチド夏の勉強会は、ペプチド科学およびその周辺領域に関連する研究を行っている学生や研究者（大学、大学院、研究所、企業等）を対象として、自由な討論や活発な意見交換を通して相互の親睦を図るために、毎年夏開かれています。本年からは、日本ペプチド学会主催で開催され、信州大学農学部応用生命科学科生物資源化学講座の担当で下記の要領で開催を予

定しております。参加ご希望、お問い合わせは世話人までご連絡ください。多数のご参加をお待ちしております。

日時：平成17年8月3日（水）～5日（金）（2泊3日）
＋8月6日（土）（基本的に2泊3日のスケジュールで行います。8月6日にも催しを企画いたしますので、ご希望の方は3泊4日となります。）

場所：大芝荘（長野県上伊那郡南箕輪村大芝2358-5）

<http://www.valley.ne.jp/~oshiba/>

世話人：中村浩蔵

〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村8304

信州大学農学部応用生命科学科生物資源化学講座

Phone & Fax: 0265-77-1638

e-mail: knakamu@shinshu-u.ac.jp

編集後記

今回は、ペプチド学会で御活躍の女性の先生方に日頃の御研究、学会活動についてご執筆いただきました。ペプチド学会は、女子学生の会員は比較的多いのですが、正会員の中に占める女性の割合は非常に少ないのが現状です。これは、学術的な研究を続けていくということが、女性にとってやはり厳しい状況にあるということを示しているものと思われます。ペプチド学会をさらに発展させるために、会員（特に女性？）の勧誘を勧めて頂くことをお願いすると共に、益々魅力的な学会となるよう皆様と一緒に盛り上げていくことができればと思います。年度末のお忙しい中ご執筆頂いた先生方、誠にありがとうございました。

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

野水 基義（東京薬科大学薬学部）

TEL 0426-76-5662, FAX 0426-76-5662

e-mail: nomizu@ps.toyaku.ac.jp

（本号編集担当：前田 衣織）