



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.59

2006年1月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

男女共同参画

多様性を認める社会に期待

男女共同参画と云われるようになって女性研究者の数はなかなか増えないので、各学会で話題になっている。ペプチド学会からの何か書くようにという依頼は参考になるようなことを期待されていると思うが、時代が変わっているので、この文章が役に立つかどうか至って心許ない。多様性を認める社会にならなければ男女共同参画実現は難しいと思うので時間がかかるのかもしれないが、心配なことは社会が進歩していないのではないかと思えることである。若い人の意識が進歩していないとすれば、その年代を育てた前の世代の責任が大きいのではないかと思う。古いことからの話で申し訳ないが、半世紀の記録でお茶を濁そうと思う。



大塚 栄子

北海道大学医学部薬学科

1954年に北大に入学した年に医学部薬学科が創設され、入学定員が40人増えたことが後でわかった。女子学生の比率は新入生全体の3%であったが、1年半経って学部移行した時に薬学科では30%であった。薬学に行くのなら大学に行っても良いと親に云われて受験した女子学生もいた。当時北海道には薬学専攻の大学はなかったので、薬業界からは北大に薬学が出来ることに大きな期待があったと思われる。しかし、歴史的に旧帝国大学の薬学は医学部化学科のようなところで、ドイツの有機化学を学んだ伝統があり、実務に就く人は少数派であった。昭和40年に薬学部となり、定員が80人となってからも約30人が薬剤師の資格を活用し、残りは大学、研究機関、企業で働いている。学部移行の説明会では学科長の赤木満州男教授が新しい学科での研究者養成というようなことを熱っぽく語られ、それにつられて来たという学生もいた。一期生と

というのは概して元気がよいと云われるようであるが、確かに元気が良すぎてアメリカの大学にポスドクで行った後、就職してしまって未だに教えている清水譲さんや退職しても帰って来ない渡辺恭一さんがいた。

学年進行で作られた大学院に進学したのは7名で、博士課程に進学したのは6名だった。そのうちの2名はアメリカの大学と研究所の教授、1名は私立薬科大学の教授、1名は工業技術院の研究所長になった。女子学生は2名で最後は日本で国立大学薬学部の教授になったので、研究者養成という目的は達成されたことになる。2人とも順調というわけではないが、教授になったということは運が良かったのかもしれないが、北大の薬学という新しい環境が幸いしたことは確かである。

先日、文部科学省の河村科学技術・学術総括官が来学した時に女性研究者との意見交換会が開かれ、後の雑談で、北大はよその大学よりは雰囲気が良いと云っていた女性研究者がいた。新しく開けた土地に出来た大学は多様性を認める意識が進んでいると期待したい。北大のモットーのおかげかもしれない。

薬学の大学院に在学していた頃は就職事情も悪く、先の心配をしても仕方がないという雰囲気が全体にあって、先のことは考えなかったというのが本音である。同期の中川昌子さんは途中でアメリカの大学院に留学して、看護婦宿舎に住んでいたことが思い出される。私は博士課程を終えると直ぐに留学したので、中川さんをメリーランド大学医学部に訪ねた記憶がある。

ウイスコンシン大学酵素研究所

1963年に留学したその秋にケネディー大統領が暗殺され、アメリカに暗い影が漂いはじめたような気がするが、NIHの研究費で大勢の日本人ポスドクが雇われていた。1ドルは360円、助手の初任給は1万円に満たない時代であったが、ポスドクの給料は月500ドル程度であったので、楽な気持ちで暮らすことができた。ウイスコンシン大学酵素研究所は同大学のビタミン

ンDの特許収入で創設された研究所であるらしく、合成ビタミンDをミルクに添加することによってくる病が激減したことを記念する壁画が大学にあった。留学先のコロナ研究室は3番目に出来たラボで、3人の教授はコディレクターと呼ばれていた。コロナ博士はインド人で、イギリスで学位を取得した後、カナダでコエンザイムの合成とポリヌクレオチドの合成を勢力的に行き、ウイスコンシン大学に招聘された。私達が大学院の頃は毎月のようにアメリカ化学会誌に発表される論文を読んで、研究成果に圧倒されていた。私は博士課程では筋収縮実験に必要なATPアナログを合成していたが、ポリヌクレオチドの合成をしたくてコロナ研でのポストドクを希望した。運良く研究費が取れたという返事をもらったが、コロナ博士にとっては最初の日本人ポストドクで、女性ということは手紙で知るだけだったので、お互いに緊張した初対面だった。コロナ博士は核酸有機化学でノーベル賞を受賞したトッド博士のポストドク時代にカルボジミドの研究をした経験からカナダではポリペプチド合成を目指していたが、ポリヌクレオチド合成に成功する。トッド博士からはポリペプチド合成をするようにと云われていたが、良い結果が得られなかったのが転換の理由であると云われたが、その後の進展を見ると転換は興味の間

題ではなかったかと推測される。コロナ博士はインドから留学するとき心細い思いをしたそうで、ハードワーカーと恐れられていたが、外国人ポストドクには親切だった。

1963年頃には遺伝暗号が解明されつつあり、ポリヌクレチドフォスホリラーゼで合成されたホモポリマーをメッセンジャーRNAとしてアミノ酸の取り込み実験が行われていた。遺伝学の実験からも3個のヌクレオチドが1個のアミノ酸に対応するということが推察されていた。ウイスコンシンでの最初のテーマは繰り返しのある短いDNA断片を合成することだった。2-4個のユニットをカルボジミドで重合させ、陰イオン交換クロマトで分離精製するというジェステル法と呼ばれる方法であった。その後核酸合成は大きく変わり、現在の3価のリンを使う非水系の方法が開発され、機械化された。DNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼが発見され、十数個の長さのDNAを延長させ、RNAに転写することが可能になったので、モデルメッセンジャーRNAとすることができた。ニレンバーグ博士はリボトリマーが対応するtRNAとリボソーム上で複合体を形成することを発見し、酵母アラニンtRNAの構造決定をしたホーリー博士とコロナ博士の3人は1968年に遺伝暗号解読の功績でノーベル生



「1955年10月医学部薬学科に移行時の写真」

男子学生が全員学生服を着ている。酔って、創成川に飛び込んで、服が乾くまで、他に着る物がないため、講義に来られなかった学生がいた。

理・医学賞を受賞した。コロナ博士はその後 DNA リガーゼの発見に助けられて、DNA 断片を結合する遺伝子合成に成功したので、その功績で受賞したと考える人が多い。私が帰国した翌年、1967年に東京で国際生化学会が開催され、コロナ博士は遺伝暗号決定の実験と遺伝子合成の構想を発表し、日本でも高い評価を得ていた。

北大薬学部

私が北大に帰る前年、1965年に薬学科は学部として独立し、7講座から13講座となった。高度成長時代のおかげで就職できたわけであるが、女子学生の多い薬学でも女性教員は少ない。私の場合はコロナ研の知名度のおかげもあったと思う。大阪大学に研究室ごと移った時には学部全体で女性の助手が2名いたことを記憶している。北大に教授として赴任したのは1984年で創立30周年であったが、卒業生としては最初の教授であり、国立大学の薬学部では第一号の女性教授と云われた。北大薬学部では一時期3名の女性教授がいたが、その後は続いていない。助教授として採用される時に大きな壁があるが、大講座制や準教授の制度が定着すると改善の可能性もあるのではないかと思う。ある程度の強制的なやり方も女性教員の数が少し増えるまでは必要である。その制度で採用されたと云われても憤慨しないことである。

おおつか えいこ
国立大学法人北海道大学
監事
ohtsuka@pharm.hokudai.ac.jp

ペプチド大好き

現在、ペプチドニューズレターの編集委員として、微力ながら学会活動をお手伝いしております。いつもは皆様に原稿の依頼をする立場で「いつか、私も執筆することができたら」と思っていました。まさかこのような形で原稿依頼が来るとは！男女共同参画社会というテーマは、未だに自分自身が仕事のやり方を悩んでいるところですので、皆さんに意見を述べることなど到底できないのですが、一人の女性研究者の眩きとしてお聞きいただければ幸いです。



前田 衣織

私自身、あまり女性ということを意識したことはなく、これまで一人の研究者として過ごしてきました。学生の頃は恩師の下東康幸先生（九州大学教授）に鍛えて頂きました。先生に感謝していることは、女性だからという甘えを許さず、一人の学生としてご指導頂いたことです。実験系の研究室は比較的女子学生の数が少なく、優しくされることもあります。私もそれほど自立していたわけではありませんでした。現在、大学教官として学生を指導していますが、しっかりした女子学生を見ると、甘えていた当時の自分が少し恥ずかしくなります（もちろん、決して学生にはそのような過去を言いません）。学生時代はジペプチド性のキモトリプシンインヒビターの合成研究を行いました。来る日も来る日もカップリングを繰り返し、何故だか分かりませんが、とにかくペプチド合成が楽しかった！不純物ができて上手くいかなくても、カラムで精製するのがまた楽しい（学年が進むにつれ、その回数は一応減っていきました）。合成したペプチドを使って阻害活性を測定し、同時にNMRで構造解析を行い、その強さと構造との相関を調べていることは、謎を解いていくような楽しさがありました。「今回の合成物の阻害能は強いだろうか？ものすごく強い阻害剤ができちゃったら、どうしよう！」などと夢見ながら測定を繰り返していました。実際のところは、まあまあだったでしょうか。また、NMRの測定では河野敬一先生（現・北海道大学教授）にご指導頂き、新しい知識や技術を習得することができて、未知の世界を覗くような楽しみがありました。タンパク質の精製や遺伝子クローニングなども行い、学生時代に広く様々な分野を学習できたことを幸運に思います。

その後、大阪大学蛋白質研究所の相本三郎先生の研究室で、チオエステル法を用いた長鎖ペプチドの合成研究を行いました。タンパク質サイズのペプチドを合成できる楽しさと、ペプチド合成にはスピードが非常に重要であることを学びました。ただ、相本先生を始め研究室の皆さんに大変お世話になったにも拘わらず、満足のいく研究結果を出すことができなかったことは申し訳なく、大きな心残りとなっています。現在は、九州工業大学・岡元孝二教授の研究室でエラスチンの研究を行っています。（エラスチンについての詳細はPNJ 57号をご参照下さい）

大学内においては、お陰様で「女性だから不利だなあ」と思うことはなく、女性教官として割り当てられる委員（セクシュアルハラスメント防止委員など）以外は、特に女性を意識することはありません。このような委員は確かに大変ですが、問題の性格上どうして

も女性からの視点が必要となります。また、上層部の方と一緒に仕事をさせて頂くのは色々と勉強になることも多く、大学の運営についても深く考えるようになり、ためになっていると思います。

研究はどれも魅力的で、女性研究者の皆さんは「できればずっと続けていきたい」と考えていると思います。しかし女性、特に実験系の場合においては結婚、子育てと様々な要素が絡んできて、時間的に厳しく思うようにならないのも事実です。遅い時間に疲れて帰宅する夫に「家事を手伝って」とは言えず、かといって家事には多くの時間を取られ悩んでいらっしゃる方も多いのではないのでしょうか。私自身、家事と仕事を両立させようと『時間を2倍うまく使う方法』や『家庭も仕事も上手にやりくりする法』など色々な本を何冊も買って研究していますが、うまくいったためしがありません（これらの本について詳しく知りたい方は、学会で声をかけて下さい）。職場では、皆さんと同様日々の難題と学生達の訳の分からない主張との間に挟まれ、どうしてよいか分からず、まさに毎日が戦いのようです。「仕事を辞めてしまいたい」と思うこともあります。その度に「でも、いくら何でも家ではペプチド合成できないなー」と思い留まっています。それを考えると、これから先のことはまだ分かりませんが、今まで仕事を続けることができたのは、他の何より研究すること、ペプチドに触れていることが好きだからだと思います。また、主人も同じ研究者ですので、色々な悩みを聞いてもらい、精神的にサポートしてもらえることも大きいのだと思います。

そんな毎日ですので、意見を述べるなどというのはおこがましいと思いますが、一つだけ感じることは、女性は子育てなどの理由でどうしても研究活動を中断しなくてはならない時期があるということです。現在の社会ではそのような女性研究者が不利になることが多いと聞いています。そこで、これまでのような通り一辺倒の評価ではなく、過去の業績や本人自身を正當に評価していくことのできるシステムがあれば、さらに多くの女性が研究活動に従事できるのではないのでしょうか。若い女性研究者の皆さん（自分も若いつもり）にも、好きな道を見つけて頑張りたいと願っています。まずは続けていくということが一つの進歩へ繋がっていくのではないかと思います。

今回のテーマにつきましては「私は、活躍している女性研究者というわけではありませんので」と一度辞退させていただいたのですが、編集委員の坂口和靖先生より暖かい励ましを頂き、執筆することができました。心より厚く御礼申し上げます。次回は、皆さんに

面白い研究成果を報告できることを目標に頑張って参ります。

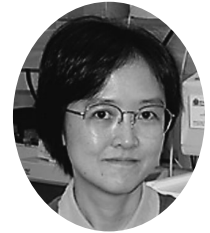
まえだ いおり
九州工業大学情報工学部
iori@bio.kyutech.ac.jp

アルドール反応を触媒する低分子ペプチドの創製

1. はじめに

天然に存在する酵素のように、水性緩衝液中穏和な条件下、目的とする反応を加速できる触媒分子を創製できると、これらの触媒分子を用いて、生体内あるいは生きた細胞内で、天然に存在する酵素とは異なる基質特異性により、目的の化学反応を行うことができるようになると期待される。例えば、ある機能に関わる蛋白質について、細胞内での動き、あるいは他の蛋白質との相互作用を調べる時に、生きた細胞内で目的蛋白質のみを選択的に修飾する反応を行う触媒が利用できれば非常に都合良いと考えられる。また、生体内で有毒化合物を分解し無毒化する触媒、生理活性物質を細胞内に取り込ませるために修飾し、細胞内でその修飾を脱保護する反応を行う触媒などは、基礎研究から病気の治療までの幅広い領域において役立つと考えられる。特に、DNAでコードできるアミノ酸を素材とする蛋白質性およびペプチド性触媒は、対応するDNAから生きた細胞内で産生することができるので、生体内あるいは生きた細胞内での反応を行うために有用であると考えられる。

比較的高分子の人工的な蛋白質性触媒は、例えば、天然酵素の基質特異性の改変、既知の蛋白質の形を利用して反応触媒機能を付加する、抗体の抗原結合部位に反応触媒機能を付加する等によって得られている。一方、低分子のペプチド性触媒の創製については例が少ない。一般的に、低分子のペプチドの方が、高分子蛋白質よりも解析が容易で、化学合成も簡単に行うことができる。低分子ペプチド性触媒は、高分子の蛋白質に触媒活性タグとして付加して利用することも可能である。いかにして高い機能を持つ低分子ペプチド性触媒を創製するかという点が課題である。本稿では、エナミン機構によりアルドール反応を触媒する低分子ペプチドの創製について、この点に関する私たちの試みを紹介する。



田中富士枝

2. 酵素におけるエナミンを生成するアミノ基と 1,3-ジケトン化合物

エナミン中間体は、有機合成化学においても酵素反応においても、炭素-炭素結合形成反応をはじめとする反応に用いられる重要なカルバニオン等価体である。通常、リジン残基の側鎖アミノ基やN末端のアミノ基は中性緩衝液中ではプロトン化されていて、求核的に反応することはできない。ところが、アルドラーゼ酵素の活性部位のエナミンを形成するリジンのアミノ基は、特別に低いpKa値を持ち、中性緩衝液中、アルデヒドやケトンのカルボニル基に求核的に反応することができる。そして、生成したエナミンがもう一分子のアルデヒドと反応し、アルドール生成体を生ずる(図1a)。蛋白質性触媒の求核的に反応できるアミノ基は、アミノ基が疎水性環境下に存在する場合、あるいは、アミノ基が近傍にある正に荷電した残基(リジンあるいはアルギニン)と静電的相互作用する場合に認められる。アルドラーゼ酵素だけでなく、デカルボキシラーゼなどの酵素も求核的に反応するリジン側鎖アミノ基を持ち、イミンおよびイミニウム塩を生成する。1,3-ジケトン化合物はこれらの酵素の求核的に反応するアミノ基の機能の研究に用いられてきた。通常のエナミンの生成と分解が平衡にあるのに対し、1,3-ジケトンを用いると、安定なエナミンを生成する(図1b)。このエナミンは特徴的なUV吸収(316-318nm)を有するので、UV測定によりエナミンの生成を検出することができる。すなわち、1,3-ジケトンとのエナミン生成を指標に、エナミンやイミン、イミニウム塩を生成することのできる求核性のアミノ基の存在を確認できる。また、固相上に1,3-ジケトン誘導体を固定化しておくこと、エナミン生成に基づいて、求核性のアミノ基を持つ蛋白質性触媒を、その固相上にトラップすることができる。また、私たちは、1,3-ジケトンとの反応によって得ら

れた一連のアルドラーゼ抗体(アルドール反応およびレトロアルドール反応を触媒する抗体)において、ジケトンとの反応性と触媒活性との間に正の相関が認められることを確認している¹⁾。

3. 反応に基づく選択を利用した低分子ペプチド性触媒の高活性化

近年、一定の構造を持つ低分子のペプチドが設計されてきているが、高い触媒機能の設計となるとまだまだ困難である。ライブラリーの中から触媒活性に基づいて触媒を選択することができれば、高活性化のためのペプチドの構造を設計することなく、より高活性のペプチド性触媒に到達することができる。そこで、私たちは、アルドール反応およびレトロアルドール反応をより高い活性で触媒するペプチドを得るために、触媒候補のペプチドのファージライブラリーを用い、1,3-ジケトン化合物との結合(望ましくはエナミン生成)を指標に選択を行なった²⁾。この選択方法では、より反応性の高いペプチドは、限られた反応時間内にエナミンを生成し固相上にトラップされるのに対し、ジケトンと反応しなかったペプチドは洗い流される。固相上にトラップされたファージペプチドを回収し、増殖後、さらにジケトンとの反応による選択を繰り返すことにより、ライブラリー中の高活性触媒の含有率を上昇させることができる。

すなわち、リジン残基を含むアミノ酸18残基から成る α -ヘリックスペプチドのC末端に、アミノ酸6残基の、天然20種のアミノ酸から構成されるライブラリーを付加し、ファージディスプレイシステムにより、ジケトン誘導体との結合を指標に選択を行なった。得られたペプチド(24残基)を化学的に合成し、もとの18残基のペプチドと比較すると、エナミンの生成速度が向上し、また、アルドール反応活性およびレトロアルドール反応活性が向上していた。CDスペクトル測定から、得られたペプチドではヘリックス含量が向上していることがわかり、ライブラリーから選択されたのC末端6残基中にリジンが含まれていないことから、活性向上はヘリックス構造形成能の向上に由来すると考えられた。これらのペプチドは、一定の構造をとらない場合には触媒活性を示さないのに対し、ヘリックス構造形成により、静電的な相互作用の生成や疎水性環境の構築が可能となり、アミノ基が求核的に反応できるようになり、触媒活性を獲得すると考えられた。

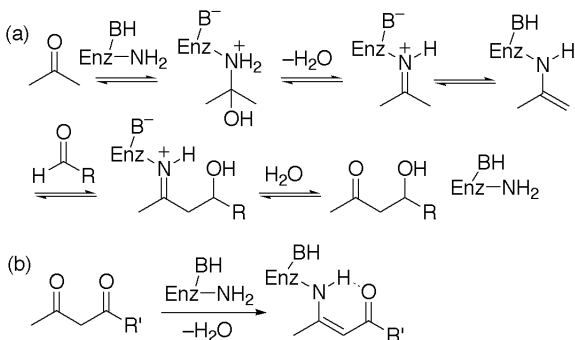


図1. エナミン機構によるアルドール反応とエナミン生成

4. 低分子ペプチド性触媒の基質特異性の向上

上述の24残基のペプチドは触媒活性が向上しているものの、レトロアルドール反応ではもとの18残基のペプチドと同程度の mM 領域の K_m 値を与え、基質の認識能力には乏しかった。そこで、ペプチド性触媒の低分子基質に対する特異性向上のために、modular assembly strategy という戦略を考案した³⁾。この戦略では、基質の認識に関わるドメインを触媒ドメインと共有結合的につないで基質特異性を示すペプチドを作製する。基質認識ドメインが基質に対して平衡で結合と解離を繰り返すと、その近傍では部分的に基質濃度が高くなり、触媒活性ドメインはこの部分的に高い基質濃度の恩恵によって、全体では基質濃度は低くても、高い基質濃度を用いた場合に匹敵する反応速度を得ることができると考えられる。この方法によると、触媒ペプチドの活性部位を個々の基質に応じて作りかえることなく、基質認識ドメインを取り換えることにより種々の基質特異性を示すペプチドを簡単に作製できると考えられる。

基質認識ドメインとして、ファージディスプレイによって選択されたフルオレセインに結合するペプチド、触媒ドメインとして上述の24残基のペプチドを用い、これらを結合した35残基のペプチドを化学的に合成した。この35残基のペプチドは、フルオレセインの部分構造を含まない基質の反応では、約 1 mM の K_m 値を示したのに対し、フルオレセインの部分構造を含むアルドール体を基質とするレトロアルドール反応においては 8 μ M の K_m 値を示し、基質特異性の向上が確認された。いずれの基質の場合にも k_{cat} は同等であったことから、基質認識ドメインの付加は、触媒活性にほとんど影響せずに基質特異性の向上に寄与したと判断できた。この35残基のペプチドのアミノ酸一残基あたりの catalytic proficiency ($(k_{cat}/K_m)/k_{uncat/residue}$) は、天然の酵素の場合の下限値に匹敵する値であった²⁾。

5. アルドール反応簡易検出法の開発

化学反応の進行を迅速簡単に検出する方法は、ライブラリーからの高活性触媒の効率的検索、触媒間の活性の比較等に有用である。そこで、反応すると蛍光強度が増加するマレイミド誘導体を用いて、エナミン機構による炭素-炭素結合形成反応の進行を蛍光の増加により検出する方法を開発した⁴⁾。この方法を利用することにより、触媒のエナミン生成能を迅速に評価できた。さらに、反応すると蛍光強度が増加するアルデヒドを開発し、このアルデヒドを反応に用いて、アルドール反応の進行を蛍光の増加により検出する方法を

開発した⁵⁾(図2)。これらの反応検出法は、今後の触媒の開発に役立つと考えられる。

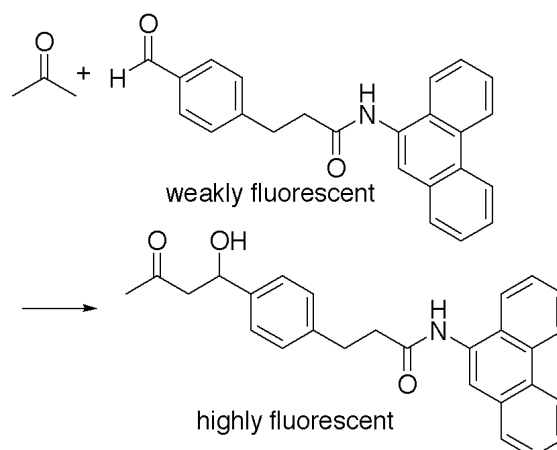


図2. 蛍光の増加によりアルドール反応の進行を検出する方法の反応例

6. おわりに

反応性に基づいて触媒を選択する戦略と設計の工夫により、35残基という低分子のペプチドでも高分子蛋白質性触媒分子で得られるのに近い触媒機能を発現することが可能となった。さらなる工夫により、例えば、turn over 不要の選択的修飾反応等において、実用に耐え得るペプチド性および蛋白質性触媒の創製が可能になると考える⁶⁾。

なお、スクリプス研究所については、http://www.scripps.edu/i_index.html をご覧ください。

7. 文献

- 1) Tanaka, F.; Fuller, R.; Shim, H.; Lerner, R.A.; Barbas, C.F., III. Evolution of aldolase antibodies in vitro: correlation of catalytic activity and reaction-based selection. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 1007-1018.
- 2) Tanaka, F.; Fuller, R.; Barbas, C.F., III. Development of small designer aldolase enzymes: Catalytic activity, folding, and substrate specificity. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7583-7592.
- 3) Tanaka, F.; Barbas, C.F., III. A modular assembly strategy for improving the substrate specificity of small catalytic peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3510-3511.
- 4) Tanaka, F.; Thayumanavan, R.; Barbas, C.F., III. Fluorescent detection of carbon-carbon bond formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8523-8528.
- 5) Tanaka, F.; Mase, N.; Barbas, C.F., III. Design and use of fluorogenic aldehydes for monitoring the progress of aldehyde transformations. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*,

- 6) Tanaka, F. Development of protein, peptide, and small molecule catalysts using catalysis-based selection strategies. *The Chemical Record* **2005**, *5*, 276-285.

たなか ふじえ
Fujie Tanaka
Department of Molecular Biology
The Scripps Research Institute
ftanaka@scripps.edu

翻訳後修飾の網羅的解析を目指して

2005年10月27~29日の3日間、大阪・豊中市で行われた第42回ペプチド討論会に参加し、ポスター発表を行う機会に恵まれました。セッションでは多くの先生方から有益なご指摘と助言を多数いただくことができ、大変感謝しております。そして、大変光栄なことに、宮下正弘さん（京都大学大学院農学研究科）、池田恵介さん（京都大学大学院薬学研究科）、柏田歩さん（日本大学生産工学部）と共にポスター賞を受賞することができました。今回は、ポスター発表をさせていただいた私の研究内容について紹介させていただきます。



飯塚可奈子

私の所属する坂口研究室は、教員4名、外国人研究員1名、学生12名（博士課程2名、修士課程5名、学部生5名）の計17名で構成されています。がん抑制タンパク質 p53 の構造と機能制御に関する研究をメインテーマに、個々人がそれぞれ1個または数個のテーマをもって研究しています。私は、リン酸化モチーフ抗体を用いてタンパク質のリン酸化・脱リン酸化を高感度に解析する方法を確立することを目標に研究を行っています。

タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は、様々な生命現象のあらゆる局面においてタンパク質機能の主な制御機構であり、それぞれプロテインキナーゼおよびプロテインホスファターゼによって協同的・可逆的に調節を受けています。細胞内におけるタンパク質リン酸化の解析は、タンパク質機能の制御機構を解明するために重要ですが、その解析には膨大な時間と費用を要するため簡便かつ迅速な解析法の開発が期待されています。

タンパク質リン酸化の解析にはリン酸化部位を認識

する抗体が必須であり、現在この抗体には2種類あります（Fig. 1A, B）。例えばリン酸化されるアミノ酸がセリンの場合、ひとつは抗リン酸化セリン抗体です。この抗体は特異性が低くタンパク質中の全てのリン酸化セリン残基を認識してしまいます。もうひとつは抗リン酸化ペプチド抗体で、リン酸化セリン残基を含んだ8残基程度のアミノ酸配列を認識します。この抗体は特異性は高いのですが、ひとつのリン酸化部位に対してひとつの抗体が必要となるため、全てのリン酸化部位を解析するには膨大な数の抗体が必要になってしまいます。

このような既存の抗体の欠点を解消するために我々は『リン酸化モチーフ』という概念を導入しました（Fig. 1C）。それぞれのキナーゼはリン酸化するセリン周辺のアミノ酸配列に対して特異性を有しており、その特定の配列をもつ部位のみを認識しリン酸化することが知られています。例えば、PI-3キナーゼファミリーに属するATM/ATRやDNA-PKは遺伝毒性のDNA損傷によって活性化され、Ser-Gln配列を認識してリン酸化します。我々はそのリン酸化された Ser(P)-Gln 配列 (Ser(P) はリン酸化セリンを表します) をリン酸化モチーフと定義しました。

リン酸化モチーフ特異的認識抗体は抗リン酸化セリン抗体より特異性が高く、抗リン酸化ペプチド抗体ほどの種類は不要で、全てのタンパク質で利用できます。また、抗体の認識部位とキナーゼの認識部位が同じなので、細胞内で活性化されているキナーゼを推定することも可能になります。本研究ではこれまでにATM/ATRのリン酸化モチーフである Ser(P)-Glnモチーフを特異的に認識するモノクローナル抗体3G9-H11の作製に成功しました。そこで、この抗体の特異性を確認するため、ATM/ATRによりリン酸化される

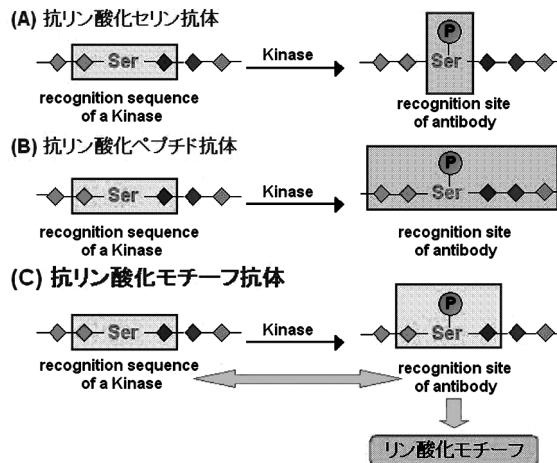


Fig. 1 リン酸化モチーフ

p53, Chk1, Brca1のリン酸化ペプチドや他のリン酸化モチーフをもつ p53由来の様々なリン酸化ペプチドを Fmoc 固相合成法により化学合成し, 3G9-H11を用いて ELISA 法により解析しました。その結果, 3G9-H11 はこれらのペプチドに含まれる Ser(P)-Gln 配列のみを認識し, リン酸化されていないペプチドや他のリン酸化モチーフを含むペプチドは認識しないことが明らかになりました。このことより, 3G9-H11はタンパク質の種類によらず, Ser(P)-Gln 配列のみを特異的に認識することが確認できました。

続いて, 3G9-H11をホスファターゼの活性測定に応用しました。ビオチン化した Brca1リン酸化ペプチドを PPM1D ホスファターゼで処理し, アビジンコーティングした ELISA プレートに添加しました (Fig. 2)。3G9-H11で検出したところ, リン酸化ペプチドの脱リン酸化反応を高感度に検出することができました。この方法は, 酵素・基質反応溶液をそのまま ELISA プレートに添加できる点で簡便かつ有効な手法であり, 3G9-H11が UV 刺激や発がん物質などによって活性化・不活性化されるキナーゼやホスファターゼの活性測定に応用できると考えられます。

さらに, 3G9-H11を用いて細胞内でのタンパク質リン酸化の検出を試みました。ヒト肺がんの培養細胞に EGFP-p53R273H 変異体を強制発現させた細胞を用いて, UV 照射前と照射後におけるリン酸化の変化を Western blot で観察したところ, EGFP-p53R273H は UV 照射後に特異的なバンドが検出されました。さらに, 47 kDa 付近にも UV 特異的なバンドが観察されました。これらの結果は, 3G9-H11が UV 照射などの遺伝毒性ストレスにより生じる既知タンパク質のリン酸化だけではなく, 未知のタンパク質のリン酸化の検出にも有用であることを示唆していると考えられます。

今回の研究により, モノクローナル抗体3G9-H11は Ser(P)-Gln 配列に対して高い特異性を有しており, *in vitro* でのキナーゼ・ホスファターゼ活性測定や細胞内でのタンパク質リン酸化の検出に有用であること

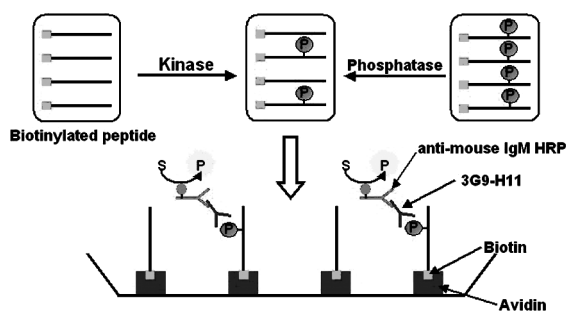


Fig. 2 Kinase/Phosphatase 活性測定法

がわかりました。今後は, 他のリン酸化モチーフ認識抗体を作製し, タンパク質リン酸化を網羅的に解析できるハイスループットな系の確立を目指していく予定です。

今回のペプチド討論会では, 先日参加させていただいた若手ペプチド夏の勉強会で知り合った友人も多く発表しており, 彼らの発表を聞いて自分もまた奮起させられました。また女性の発表者も多く, 研究に携わっている女性は予想以上に多いという印象を受けました。このことは一女性として非常にうれしく, 今後さらに女性研究者が増え互いに切磋琢磨できたらと期待しています。今回の学会参加で得たことを今後の研究活動に活かしていきたいと考えています。最後になりましたが, 今回のペプチド討論会をお世話してくださいました近畿大学の若宮建昭先生, 日高雄二先生に心からお礼申し上げます。

いいづか かなこ
北海道大学大学院理学研究科化学専攻
k-iizuk@sci.hokudai.ac.jp

6th Australian Peptide Conference への参加報告

まず最初に, 私を APC 参加支援金支給対象に採用して下さいました日本ペプチド学会の関係者の皆様に, 厚く御礼申し上げます。私は, 昨年度から本年にかけて, 28th European Peptide Symposium (EPS), 19th American Peptide Symposium (APS), そして今回の6th APC と計三度の国際学会に参加することができました。



塩谷 公隆

The 6th Australia Peptide Conference (APC) は, 2005年10月9日から14日の6日間, オーストラリアのクイーンズランド州ハミルトンアイランドにおいて開催されました。ConferenceのCo-Chairmanは, Monash大学のProf. Ian SmithとHoward Florey InstituteのAssoc. Prof. John Wadeでした。学会の参加総数は, 189名, 内日本人が18名, 内学生はオーストラリアやアメリカ等から15名と日本からが3名でした。開催地であるハミルトンアイランドは, オーストラリアでもゴールドコーストと並びリゾート地で, 日本からの観光客も多く, 日本語も結構通じ, 家族連れや, 取り分け新婚旅行等のカップルが多かった様に思

います。また、日差しはきつかったのですが、緯度の割には、過ごし易い様に思いました。ホテルの外に出ると、野生のインコやカラスの鳴き声がよく聞こえてきたことを除けば、リゾート地ということもあって緊張感に乏しく、日本にいたのとあまり変わらない様な環境の中で過ごすことが出来ました。

今回参加した APC の会議様式に驚きました。学会は早朝 8 時 30 分に始まり、夜 10 時半に終わります。しかし、この間 1 時から 5 時まで自由時間があり、自由にリゾート地で楽しんで下さいというものでした。長い会議の途中でリフレッシュし、又、会議を始めるというユニークなものでした。

APC 学会の内容については、ポスター発表 (101 演題) だけを見れば、EPS が最もポスター量も多く、内容も濃かった様に思います。次に、APS、最後に今回の APC の順にポスター数が減っておりました。それもその筈で、APC において、ポスター発表が始まったのが、今回が初めてであり、そのことがポスターの数が少ない原因であると思いました。発表の内容も合成よりも活性やデータを評価、検討している発表形式のポスターが多く、カラー印刷で一枚もののポスターが多かったように思いました。データは少なくとも、いろいろそのデータについて考察しているようなポスターも幾つかあり、私の今後の発表での参考になりそうな発表が多くあり、とても勉強になりました。また、ポスター発表は、夕食が終わってから、20時に始まるので、皆お腹もいっぱい、また、アルコールも入っている、ポスター会場は、なんとも言えない熱気があったように感じました。皆、ワイングラスを片手にデザートを摘みながら、ポスターを前に討論を行っていました。口頭発表 (一般講演 : 55 + 特別講演 : 6)

については、EPS のときは、私が初めての海外旅行で、英語に耳も慣れておらず、スライドを眺めて理解しようとしていた程度で、その他はチェコの町を観光したことしか記憶に残っていませんが、APS と APC は、口頭発表のレベルは、ほぼ同じ位の内容に感じました。また、要旨集のページの曜日ごとに企業のカラー広告が折り込まれており、口頭発表も企業が後援してプレゼンテーションが行われているところが特徴的で日本や他の国の学会とは一味違いました。今回の口頭発表の中で、特に、0-17 Motonari Uesugi 氏の Chemical Biology of Gene Expression and Cell Differentiation が 3 つの関係の無さそうなデータを見事に関連付けて発表していたと周りの人達が口々に賞賛していました。ちなみにそのセッションの Chairman は、木曾先生でした。

次回の APC は、2007年10月にケアンズで、第 4 回 International Peptide Symposium として、又、第 2 回 Asia-Pacific International Peptide Symposium として開催される予定です。詳細は、www.peptideoz.org をご覧下さい。今回の学会に参加して、世界の多くのペプチド研究者と知り合いになり、オーストラリアの学生とも仲良くなれたのは、大きな収穫でした。最後に、会議中から帰国するまで多くの方々に御世話になりましたことに対しまして、この場をお借りして御礼申し上げます。

しおたに きみたか
神戸学院大学食品薬品総合科学研究科
shiotani@pharm.kobegakuin.ac.jp



学会より

第43回ペプチド討論会 (PEM4 合同国際会議)

43 JPS は、ペプチド工学国際会議 (PEM) と合同で国際シンポジウムとして、横浜で開催されます。詳細は、学会ホームページを参照ください。



International Conference of 43rd
Japanese Peptide Symposium/
4th Peptide Engineering Meeting
(43JPS/PEM4)

“Peptide Science and Engineering
in Chemical Biology”

2006年11月5日～8日 横浜

世話人代表：東京工業大学大学院
生命理工学研究科 三原久和

<http://peptide-soc.jp/43JPS4PEM.html>

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

協賛シンポジウム

COE 海外拠点室開設記念合同国際会議：統合創薬科学
国際シンポジウム - 伝承から構造生物学まで / 難治性
疾患を標的とした創薬科学研究発表会

日 時 平成18年3月5日(日)～平成18年3月6日
(月)

会 場 京都薬科大学 愛学館 (京都市山科区御陵中
内町5)

主 催 京都薬科大学 21世紀 COE プログラム
「伝承からプロテオームまでの統合創薬の開
拓」

協 賛 日本ペプチド学会ほか

招待講演者 Jean Martinez (モンペリエ大), Ernesto
Freire (ジョンズ ホプキンス大), Chunfu Wu (瀋陽
薬大), Maosheng Cheng (瀋陽薬大), Lijun Wu (瀋陽
薬大), Famei Li (瀋陽薬大), Song You (瀋陽薬大),
Chi Hin Cho (香港大), Toshiyuki Mori (米国 NCI),
磯部 稔 (名大), 今西 武 (阪大), 高橋孝志 (東工
大), 乾 賢一 (京大), 谷口隆之 (京都薬大), 竹内孝
治 (京都薬大), 廣田 俊 (京都薬大), 松田久司 (京
都薬大), 山本 昌 (京都薬大)

一般演題・ポスター演題を募集いたしますので、お申
込みください。

問合先

〒607-8412 京都市山科区御陵四丁野町 1

京都薬科大学創薬科学フロンティア研究センター内

COE 海外拠点室開設記念合同国際会議事務局

TEL : 075-595-4636 FAX : 075-595-4787

E-mail: coejoint@mb.kyoto-phu.ac.jp

参加申込およびプログラム等の詳細はホームページ

<http://www.kyoto-phu.ac.jp/coe/> をご参照ください。

編集後記

今回の PNJ は、女性研究者 4 名に執筆していただき
ました。自然科学、特に生命科学の領域において、私
が10年間おりましたアメリカの NIH をはじめ欧米の
大学では、多くの優秀な女性研究者が活躍されてお
ります。日本でも、「男女共同参画」の推進が始まって
いますが、まだこの取り組みはその端緒に着いたばかり
です。今後、ペプチド学会において素晴らしい研究
をされる女性研究者がますます多くなり、ひいては学
会が大いに発展するよう、男女共同で精励していき
たいと思います。

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

(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)

TEL 088-633-7283, FAX 088-633-9505

e-mail: aotaka@ph.tokushima-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：坂口 和靖)