



# PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.60

2006年4月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

## 日本ペプチド学会に期待すること

昨秋、しばらくぶりにペプチド討論会に出席して、ペプチド科学の領域の広がりを実感した。プログラムを見ても、もっぱら合成に関するものは20%弱にすぎず、他はペプチドを対象とする生命科学の極めて多くの分野にかかわる研究に関するものであった。ペプチドを対象に、構造活性相関、分子生物学、分子動力学等々、誠に多彩な研究成果が発表されていた。講演会もポスター会場も熱心な研究者にあふれ、日本ペプチド学会の隆盛振りを目の当りにし真に心強く感じた次第である。

21世紀は、バイオの時代、生命科学の時代といわれ、人々の安全と安心を守る技術開発の基礎としての生命科学、生物科学に期待が集まっている。ペプチド討論会の姿からは、ペプチド科学は、「ペプチドの化学」を核として、あるいは研究の基盤としての生命科学であるということが出来るのではなかろうか。日本ペプチド学会が、広大な生命科学の分野で、「ペプチドの化学」という核を持ってその地盤を確立し、学会活動を展開していかれることを期待したのである。「生命」という大きな課題には、確固とした方法論をもって挑まねば大きな成果は望むべくもないであろう。「化学」という方法論を持ったペプチド科学の研究者に、生命科学に挑戦して新しい境地を開拓して欲しいというのは、決して過大な期待ではないと思う。これからのペプチド科学は、即ち「ペプチド生命科学」でもあると。

ところで、今日、若者の理科離れがいわれており、我が国の科学研究の将来が気遣われる。日本ペプチド学会でも、市民を対象とする講演会等で、この分野に対する社会の関心を高める努力をつづけており、時宜にかなったことと思う。一般社会人にとっても、タンパクという言葉は、食や健康との関係でかなりなじみ



鈴木 昭憲

深い言葉になっているように思われる。ただ、タンパク質の物質としての本質が理解されているかとなると疑問である。ペプチドは、如何。最近では、ペプチドという用語が、「健康飲料」等で、かなり一般に使用されるようになってきたが、その本質が理解されて使用されているとは思われない。日本ペプチド学会の社会に対する働きかけに期待するところ大である。ペプチド科学に対する正しい知識の普及を通じて、多くの優れた若者が、ペプチド科学の分野を目指すきっかけを作っていただきたい。私自身は、研究のプレイヤーと言うよりはサポーターの一人として、この分野の研究を見守っていきたいと思っている。

日本ペプチド学会の益々の発展を、心から期待しています。

すずき あきのり

秋田県立大学

[akinori.suzuki@akita-pu.ac.jp](mailto:akinori.suzuki@akita-pu.ac.jp)

## 日本ペプチド学会と私

このたびは名誉会員にご推挙頂き、大変光栄に存じます。

本学会の前身であるペプチド化学討論会時代も含めて、私の研究歴の中で常に特別な存在であった学会ですから、このたびの栄誉をお受して、その感慨はひとしおのものがあります。

大学院時代、私はペプチドとは無関係と思われるモルフィン系アルカロイドの合成研究に携わっていました。

出発原料に光学活性アミノ酸を選び、その不斉環境を利用して、立体特異的に天然アルカロイドに導こうとするものです。アミノ酸のラセミ化を起こさない条件下で反応を行うのが必須なのですが、その条件を見つけるのに大変苦労しました。その後、理化学研究所



松尾 壽之

に移ったのを契機に、私は 位水素の同位体置換法を用いてアミノ酸のラセミ化を追跡する仕事を始めました。こうして生まれたのが、ラセミ化機構を利用したペプチド C-末端残基のトリチウム標識法で、私のペプチド研究における処女作でした。この仕事を大阪大学旧蛋白質研究所で行われたペプチド・シンポジウムで発表しました。1965年の事だったと思います。大阪・中之島蛋白研 2F 講堂は折りたたみのいすを並べただけのそっけない大部屋でしたが、ペプチド研究のメッカにふさわしい熱気に満ちていました。これが、私のペプチド学会との最初の出会いでした。以来、私を刺激し、励まし、育ててくれたこのシンポジウムは ペプチド化学討論会に、そして現在の日本ペプチド学会へと大きく発展して、わが国のペプチド研究の基盤を支えています。ペプチド学会設立を始め、学会運営などに何のお手伝いもしなかった私が、名誉会員をおうけすることに、心苦しい思いもありますが、一方、とてもありがたい事と感謝しています。

その後、私は1970年の LH-RH 研究以来、本格的にペプチド・ホルモンの検索研究に入りました。オピオイド・ペプチド、ニューロメジン類、ナトリウム利尿ペプチド・ファミリーなどなど、見つけ出したペプチド類の生理作用について新しく勉強する事ばかりで、関係する学会も、薬理学会、内分泌学会、循環器学会、高血圧学会と多岐にわたり、心ならずも日本ペプチド学会への足が遠のいていました。一昨年、厚生労働省関係の各種疾患に関連するたんぱく質解析プロジェクトに携わる事になり、大阪の地に設けられたプロテオーム・ファクトリー施設で仕事をしています。

ナノ LC と MS-MS/MS,そして IT と、古典的ペプチド化学者には、すぐには信じがたい環境の中で、カルチャー・ショックの毎日を送っています。しかし、遺伝子解析、そして IT の激しい流れの中で、生体で現実に機能している表現型 (pheno-type) の研究の大切さが改めて問われているのを痛感しています。巨大な質量分析器とコンピューターの谷間から、生命の現実に立ち向かう新しいペプチド科学者を育てる事がいかに大切かをひしひしと感じています。これを機会に、私の原点である日本ペプチド学会に出席し、初心に帰って勉強させていただきたいと思ひます。

まつお ひさゆき  
(財)ヒューマンサイエンス振興財団  
創薬プロテオームファクトリー  
hmatsuo@proteomefactory.jp

## フォトクロミズムはキナーゼ活性検出法の救世主となるか？

現在、私は東京工業大学大学院生命理工学研究科21世紀 COE プログラム「生命工学フロンティアシステム」の助手 (COE 21) として三原研究室にて研究・教育に従事しております。この度はニュースレターへの寄稿の機会を与えて頂きまし



富崎 欣也

て、編集委員の方々に御礼申し上げます。今回は、私の研究テーマであるフォトクロミズムを用いるプロテインキナーゼ活性検出法に関して紹介するとともに、汎用的なキナーゼ活性検出法開発の難しさを少しでもご理解頂ければ幸いに思います。

プロテインキナーゼ (以下キナーゼ) は細胞内シグナル伝達を担う酵素群であり、抗癌剤などの薬物開発において重要な標的となっています。キナーゼ活性検出法には2種類のフォーマット、ヘテロジニアス法とホモジニアス法があります。ヘテロジニアス法としては、<sup>32</sup>P-ATP の放射活性を用いる方法、蛍光あるいは酵素標識した抗リン酸化アミノ酸 (ペプチド) 抗体を用いる方法、または SPR イメージング法が挙げられます。また、ホモジニアス法としては、蛍光標識化キナーゼ基質ペプチドを用いる蛍光偏光変化あるいは蛍光強度変化を測定する方法が挙げられます。後者の検出法は、キナーゼ基質の反応溶液からの単離・精製を必要としないため、反応性・再現性・定量性に関してヘテロジニアス法より有利と考えられます。しかし、未反応の基質とリン酸基が付加した生成物とを過剰の ATP 存在下に区別するのは非常に困難であり、これがホモジニアスキナーゼアッセイ法開発における高いハードルとなっています。そこで以下に、私が開発中の「フォトクロミズム」という色素分子の物理化学的特性を利用したユニークなホモジニアスキナーゼアッセイ法について紹介します。

「フォトクロミズム」とは、「単一の化学種が、可逆的に且つ分子量を変えることなく、吸収スペクトルの異なる2状態間を異性化する現象のうち、少なくとも1方向が光によって制御される現象」であり、スピロピラン類やジアリルエテン類が分子メモリやスイッチとして研究されています。私はその中でもスピロピランに着目し研究を進めています。スピロピランは溶液中にて、無色無蛍光性のスピロピラン型と桃色蛍光性のメロシアニン型の平衡状態にあります。その平衡定

数は溶液の誘電率に敏感でベンゼンなどの有機溶媒中ではスピロピラン型が圧倒的優位ですが、誘電率が高い水溶液中では溶媒和によってメロシアン型が安定化されます (Tomizaki et al. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2732-2740)。つまり、「無色透明の溶液を、リン酸基付加反応をトリガーとして桃色の溶液に変えればいい」ということになります。これは蛍光偏光検出や蛍光強度変化検出といった既存方法とは一線を画す検出原理であり、蛍光検出のみならず目視によるキナーゼ活性評価が可能になると期待されます。私が研究を開始する前に描いた青写真としては、

- (1) キナーゼ基質とスピロピランを結合する
- (2) キナーゼでリン酸化させる
- (3) 光で無色溶液にする
- (4) 暗所でインキュベートする、
- (5) 一定時間経過後、蛍光測定する

でした。その中で、(3)と(4)の操作はスピロピラン型からメロシアン型への異性化着色反応であり、アミノ酸側鎖のリン酸化情報を何らかの形で分子内のスピロピランへ伝達する必要があります。

まず、何も考えずにプロテインキナーゼA (以下PKA) を用いたリン酸化反応を行ってみました。しかし、PKAの有無でスピロピラン型からメロシアン型への異性化着色速度に変化はありませんでした。当然と言えば当然で、リン酸化を受けるアミノ酸から7残基離れた位置にあるスピロピランへはリン酸基付加情報は伝わらなかったのです。それらの距離が近ければよいかという訳でもなくて、キナーゼ活性の阻害や基質選択性の低下を招くので、プローブとリン酸化を受けるアミノ酸との距離は遠い方がよいというのが私の考えです。では何か、リン酸基付加をプローブへ伝える方法はないかと考えていると、ありました。単純ですが、ポリイオンの添加です。

ペプチドの総電荷がプラスならポリアニオンと、マイナスならポリカチオンと強く相互作用すると予想されるので、キナーゼ検出に適用可能であろうと考えました。実は「リン酸基付加=ジアニオン付加」で、基質ペプチドの総電荷がリン酸化反応の前後で-2増えます。従って、+2の総電荷を有する基質ペプチドを用いればリン酸化付加によって±0へと変化するので、ポリアニオンは非リン酸化ペプチドと強く結合し、一方リン酸化ペプチドとは電荷反発によって相互作用は弱くなると予想できます。そのため、スピロピラン環周囲の環境が変化し、スピロピラン型からメロシアン型への異性化着色速度が影響を受けるはずで、測定の結果、PKAによるリン酸化はスピロピラン

型からメロシアン型への異性化着色速度を約1.5倍に加速しました。これは、非リン酸化ペプチド(総電荷+2)とポリアニオンが相互作用することで、スピロピラン環周囲のポリアニオンがメロシアン型を不安定化させたためと考えられます。この(フォト)クロミズムを利用するアッセイ(chromism-based assay)法をCHROBA法と名付け、フォトクロミズムがホモジニアスキナーゼ活性検出法として利用可能であることを提案しました (Tomizaki et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1731-1735)。

現在では、PKAを含め数種類のキナーゼ活性のCHROBA法によるマイクロプレート検出が可能となっており、ハイスループット化への足がかりを得ていますし、さらにこれまで困難であったホモジニアス系でのキナーゼ活性目視検出(naked-eye detection)にも成功しています(論文作成中)。このようにフォトクロミック化合物の利用は、生化学的イベントを蛍光変化のみならず色変化による評価を可能にし、また「異性化」という大きな化学構造変化を伴うシグナル発生原理は、過剰のATPや金属イオンの影響を受けず、擬陽性や擬陰性を著しく排除できるであろうと期待されます。本検出原理はキナーゼ以外の酵素活性検出にも適用可能であり、用途拡大を目指して研究中です。

とみざき きんや  
東京工業大学大学院生命理工学研究科  
生物プロセス専攻  
kytomiza@bio.titech.ac.jp

## やれるかどうかではなく“やる”

何かに取り組む時にそれができるかできないか悩むのではなく「やる、自分ならできる」という強い意志を持って物事に取り組む、これは僕が日頃研究する上でいつも心がけていることです。今回、PNJへの寄稿というチャンスをいただいて、ペプチド科学初心者の僕が書かせていただくのは、研究者としても、人間としても未熟な若手研究者が改めて思うことについてです。



鳴海 哲夫

時が経つのは早いもので一から科学を学び直すことを決意して、2005年4月に藤井信孝教授(京都大学大学院薬学研究科)のもとに移ってからもう一年が経と



うとしています。早稲田大学の修士課程に在籍していた当時、自分のような若輩者が藤井信孝先生のようなありとあらゆる意味での『大教授』のもとで勉強できるとは全く考えておらず、日々平穏な研究生活を送っていました。そんな僕が自分の研究の何かのきっかけになればと思い、3年前六甲で行われた夏の勉強会(世話人:小出隆規先生,北條恵子先生)に参加させていただきました。それまで主に有機合成化学,有機金属化学の研究に携わってきた僕にとって,新規反応や新規合成法の開発が最も優先度の高いものでしたが,本勉強会をきっかけに自分の合成した化合物の応用について興味を持ち,合成するだけでなく評価することも含めて研究したいという考え方に変わりました。そこで,ペプチドイソスターをはじめとするペプチド類縁体合成,及びその応用研究において活躍されている藤井先生の門を叩くことに決めました。

藤井信孝先生のお名前はご存知の方も多いと思いますが,僕なりの印象を述べさせていただきますと,一度会ったら絶対忘れないほどパンチの効いた先生です。未だに研究室で先生とすれ違うときに,あまりの雰囲気は一瞬後ずさりすることもあります。若いときは相当モテたそうですが(藤井先生談),僕としては今の先生の方が独特の雰囲気に加え,渋みも入って今流行の“ちょい悪オヤジ”として尊敬しています。そんなインパクトの強い藤井先生は,研究のこととなると自分の周りにあるあらゆるものを研究に応用しようと常に狙っており,先生の科学に対する姿勢にはただただ頭が下がります。

そんな藤井先生のもとで「蛋白質の機能発現を制御するペプチド性リガンドの非ペプチド化によるゲノム創薬研究」という題材を頂き,生き生きと実験する日々を過ごしています。一日のほとんどを有機化学という化学物質との対話に費やしていますが,僕の場合は彼らとなかなかコミュニケーションをとれないことが多く,一年の大半は凹んで帰る日々が続いています。特に自分の不注意が原因の時はとてもやりきれない気持ちになります。

そんな僕でも昨秋,大阪で開催された第42回ペプチド討論会(世話人:若宮建昭先生,日高雄二先生)で「Endeavors for Highly Stereoselective Synthesis of Functionalized Fluoroalkene Dipeptide Isosteres」というタイトルで口頭発表するチャンスをいただき,色々な質問と貴重なアドバイスを頂くことができました。これまでとは違い今回はほとんどが英語発表ということで,スライドやプロシーディングの準備に加え,英語の原稿作成,及び発表練習といった難関があり,学

会前の数週間は同研究室の太田悠介君(当時M1)と日々英語をばやきながら研究する日々が続きました。それまでの英語発表と言えば国際会議でのポスター発表のみであった僕にとって,英語での口頭発表は非常に労力を必要としましたが,英語ならではの言い回しや科学英語を勉強する非常にいい機会をいただけたことを幸運に思います。今後このような機会を見つけ,是非とも挑戦していきたいです。

さて,この記事を書いていて自分の研究に対する姿勢や考えた方などを改めて見直したときに一つの疑問と一つの答えが見えてきました。それは「自分が現状に甘えているのではないか」という疑問と,「自分の存在意義」に対する答えです。まず前者についてですが,たとえば時間がないから,手が足りないからなどを理由に新しいアイデアを試さない,ある反応の収率が低いのに検討する時間がないからとベンディングしたままにする,終夜攪拌実験なのにきついからと先延ばしにするなど,最近自分が現状に甘えているのではないかということが見えてきました。これらは僕のような若手研究者によくありがちなことだと思います。これまでに僕は「やれるかどうかではなく“やる”」という言葉のように,自分にとって高い目標を設定し,その目標に向かって全力で努力し,その目標を達成することで自信をつけてきました。つまり先に述べた「現状に甘える僕」は自分の限界を自分で設定し,自分自身に妥協しているということであり,「今の僕」は自分自身が求める自分でないことに気づきました。このことに気づいた今日この時を境に新たな気持ちで研究に取り組みたいと思います。

そして「自分の存在意義」についてですが,研究者を志す僕にとって自分の存在意義を最も自覚するのは,やはり自分の研究が評価されたときです。評価される研究とは自分の出来ることをやるのではなく, something new に挑戦し, something new を生み出していくことであり,それは研究者の創意工夫と情熱によって達成されるものであると思います。そして,その様な研究をするために僕らのような若手研究者は一つ一つの実験を大切に,得られたデータを詳細に解析することで,自分なりの考え方やアイデアなど研究者としてのスタイルを確立していき,さらに研究に取り組む必要があると思います。決して容易な道ではありませんが,自分自身ともいえる自らのプロジェクトに対して積極的に取り組み,その努力の積み重ねが結果として現れたときこそ,研究者としての,自らの存在意義を自覚する瞬間が訪れるものだと思います。

この一瞬のために僕は研究を続けていきたいと思います。

最後になりましたが、行き場を無くしていた私を快く受け入れ、最高の研究環境を提供していただいた藤井信孝教授に厚く御礼申し上げます。また、日々熱い議論のために時間を割いていただいている研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

なるみ てつお  
京都大学大学院薬学研究科  
薬品有機製造学分野  
albert-m@amon.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

## ペプチド科学から遺伝子改変マウスの解析へ

私は6年前に信州大学理学部生物科学科を卒業し、その後当時の北海道大学大学院地球環境科学研究科・野水基義助教授（現東京薬科大学薬学部教授）の研究室で大学院生として約5年間研究を行い、昨年4月より米国国立保健衛生研究所（NIH）歯学頭蓋学研究所（NIDCR）の山田吉彦博士の研究室で博士研究員として研究活動を行っています。学部4年生の時には信州大学理学部・伊藤建夫教授の研究室にてプラスミドの複製調節機構の解析を行いながら基本的な分子生物学的手法を学び、大学院の5年間は野水研究室にて、合成ペプチドや組換えタンパク質、培養細胞を用いた *in vitro* の系での細胞外マトリックスタンパク質・ラミニンの生物活性部位の解析を行いました。現在の所属研究室では、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いた *in vivo* での解析を中心に、ラミニンをはじめとする様々な細胞外マトリックスタンパク質を対象とした研究にチャレンジしています。

私が大学院生の時所属していた野水研究室では、研究内容によりグループが大きく2つに分けられていて、多数の合成ペプチドと組換えタンパク質を用いて多機能タンパク質・ラミニンの生物活性部位を同定し活性シークエンスとしてペプチドレベルまで還元する「分子解剖」のグループと、それら種々の活性ペプチドを付加した機能性高分子を用いて組織工学や医薬分野への応用を目指す「再構築・応用」のグループで研究が進められていました。私は前者の「分子解剖」グループの一員としてラミニンの機能部位の解析を行っ



鈴木 喜晴

てきました。ラミニンは基底膜という膜状の細胞外マトリックスの主要構成タンパク質です。基底膜は、組織学的には各組織間の境界として存在していますが、生理学的には接着する細胞の細胞表面レセプターとの相互作用を通して様々な生物学的機能を呈し、正常な発生期の形態形成や成体組織の維持だけでなく、創傷治癒やがんの増殖・転移などの過程で重要な働きを担っています。この基底膜と細胞との相互作用に関して最も重要な働きをしていると考えられている基底膜分子がラミニンです。ラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$  のサブユニットから成るヘテロ三量体分子で、分子量が数十万 kD に及ぶ巨大分子です。現在までに同定されている5種類の鎖、3種類の鎖、3種類の鎖の様々な組み合わせにより、15種類のアイソフォーム（同族体）が知られています。これらのアイソフォームは発生期特異的あるいは組織特異的に発現・局在することが知られており、各々のアイソフォームの特異的な機能が注目されています。一方、ラミニンと相互作用する細胞表面のレセプターとして、最も代表的な細胞外マトリックスレセプターであるインテグリンや  $\alpha$ -マンノシル型糖鎖を持ち筋ジストロフィーとの関与が知られているジストログリカン、細胞膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカンなどが知られています。野水研究室でのラミニン分子からの生物活性ペプチドの同定法は、まず、1) 各々のラミニンアイソフォームのドメインごとの組換えタンパク質を作成して、それらの細胞接着活性、レセプター結合を測定し、次に、2) 活性を有する組換えタンパク質（活性ドメイン）のアミノ酸配列を網羅する多数の合成ペプチド（各々約12残基）を用いて、組換えタンパク質の活性に対する競合阻害効果を調べるといったスクリーニングを行い、さらに、3) 阻害効果を示した活性ペプチドのより詳細な活性評価を行うというものでした。



写真1 共同研究者と野水研究室のメンバー - 洞爺湖畔にて

このような一連のシステムティックな手法によりいくつかの重要な活性を有する機能ペプチドを同定してきました。これまでに、シンデカン結合ペプチド (AG73: RKRLQVQLSIRT; A3G75: KNSFMALYLSKG; A4G82: TLFLAHGRLVFM) やインテグリン 2 1 結合ペプチド (EF-1: DYATLQLQEGRLHFMDLG) に加え<sup>1,2)</sup>、現在進行中の解析によりジストログリカン結合ペプチドも同定されつつあります。そして野水研究室では、これらのレセプター特異的な活性を有するペプチドを付加した機能性高分子の応用研究も成されており、それらの解析により非常に興味深い結果が得られています<sup>3)</sup>。これらの研究成果を私自身としては第38回ペプチド討論会(長崎)にて口頭発表で報告させて頂き、また、共同研究者として毎年の同討論会にて報告させて頂いております。このように野水研究室での約5年間の研究期間は、ラミニン分子を通してペプチド科学のみならず、生化学、分子生物学的研究に触れることのできる大変貴重な時間でした。また、それらの専門分野のエキスパートの方々や多くの学生の方々とともに研究のことにとどまらない様々な話をする機会を持つことができたとても有意義な時間でした。

次に、私が現在所属する米国国立保健衛生研究所 (NIH) 歯学頭蓋学研究所 (NIDCR) の研究室を簡単ながら紹介させて頂きます。私が現在研究活動を行っている NIH/NIDCR の山田吉彦博士の研究室は、約20年間ラミニンをはじめとする基底膜タンパク質の機能を解析している研究室です。上記で紹介したような組換えタンパク質、合成ペプチド、培養細胞等を用いた *in vitro* での解析だけでなく、それら基底膜分子(ラ

ミニン、パールカン、IV型コラーゲン等)をターゲットとした遺伝子操作されたマウスの解析も精力的に行っています。また、以前より、軟骨プロテオグリカンであるアグリカン等の基底膜分子以外の細胞外マトリックスタンパク質の解析も行っていますが、近年ではそれら細胞外マトリックスタンパク質にとどまらず様々な手法により同定された新規遺伝子の機能解析も行っています。NIH/NIDCR内の同じ部署には、山田吉彦博士の研究室の他に Dr. Hynda K. Kleinman と Dr. Kenneth M. Yamada の研究室があります。Dr. Hynda K. Kleinman は、2006年1月をもって NIH を退職され、ジョージワシントン大学に異動されましたが、30年間この部署で研究活動を行ってきた方です。Dr. Kleinman も山田博士同様ラミニンをはじめとする基底膜研究に従事されてきた方で、現在世界中で使用されている基底膜主要成分から成る高機能性培養ゲル「マトリゲル」の発明者です。マトリゲル発明後も合成ペプチドを用いて主にはがんの増殖・転移、血管新生、神経網再生などの研究に従事されてきました。Dr. Kenneth M. Yamada は、最も詳細に機能解析が成された細胞外マトリックス分子であるフィブロネクチンの研究と、細胞外マトリックスレセプターとして最もよく知られているインテグリンの研究の権威です。また、山田吉彦博士と Dr. Hynda K. Kleinman は、YIGSR ペプチド、Dr. Kenneth M. Yamada は GRGDS ペプチドを以前発見し、様々なペプチド関連の研究を行ってきたこともあり、ペプチドに対する理解の深い方々です。このように現在私が所属している NIH/NIDCR の研究室は、これまで私が行ってきた研究をさらに発展させるべく、また、私にとって全く新たな研究にチャレンジするのに非常に良い環境の研究室です。まだここで研究を始めて10ヶ月足らずですが、毎日非常に良い刺激を受けつつ研究活動に取り組んでいます。現在の研究内容や今後の方向性としてはペプチド科学からは少々かけ離れてしまうことと思いますが、ペプチドを用いた研究の経験は今でも随時生かされており、今後もこの経験を生かして新たな分野の研究にチャレンジしていきたいと思っております。

最後になりましたが、本稿の執筆の機会を与えて下さった東京薬科大学の野水教授をはじめ編集委員の皆様深く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Suzuki, N., Yokoyama, F., and Nomizu, M. (2005) Functional Sites in the Laminin Alpha Chains. *Connect. Tissue Res.*, **46**, 142-152.



写真2 Dr. Hynda K. Kleinman 退職記念パーティーにて左より (Dr. Kenneth M. Yamada, Dr. Hynda K. Kleinman の夫, Dr. Hynda K. Kleinman, Dr. Matthew P. Hoffman, 山田吉彦博士, 野水基義教授)



2. Suzuki, N., Nakatsuka, H., Mochizuki, M., Nishi, N., Kadoya, Y., Utani, A., Ohishi, Fujii, N., Kleinman, H. K., and Nomizu, M. (2003) Biological activities of homologue loop regions in the laminin chain G domains. *J. Biol. Chem.*, **278**, 45697-45705.
3. 望月麻友美, 門谷裕一, 野水基義 (2005)「人工基底膜の創製-ラミニン活性ペプチドの新たなチャレンジ」蛋白質核酸酵素, 第50巻, 374-382.

すずき のぶはる  
 米国国立保健衛生研究所 (NIH)  
 歯学頭蓋学研究所 (NIDCR)  
 nsuzuki@mail.nih.gov

## 北の大学から - 06 情熱 -

### <はじめに>

北海道大学大学院理学研究科化学専攻生物化学研究室の坂口教授のもとに助手として着任して早いもので、2年が経ちました。今回PNJ編集委員であり、かつ著者の九州大学下東研究室在籍時の先輩でもある前田衣織先生から「若手特集」ということで執筆の依頼をうけましたので、坂口研究室の簡単なご紹介と現在の研究について述べさせていただきたいと思います。



中馬 吉郎

### <北海道大学坂口研究室>

北海道大学坂口研究室は、観光地としても有名な「ポプラ並木」の正面にそびえ立つ11階建ての理学部6号館5階にあります。現在ラボのメンバーは坂口教授をはじめとするスタッフ4人と博士課程2名、修士課程5名、3, 4年生各5名および外国人研究生1人の計22名で構成されています。特に今年度からは中国からの留学生が加わった事で日常的に英語に接する機会が増え、研究室の学生の英語に対するモチベーションを維持することに一役かっています。坂口研では週2回のペースで論文紹介と各研究テーマの進行状況を発表する data club が開かれています。それら以外にも各研究テーマに沿った少人数のディスカッションも頻繁に行われており、各研究テーマを展開していく中で欠く事の出来ない重要な意見交換の場となっています。現在、がん抑制タンパク質 p 53の構造と機能制御をメインテーマに研究を行っていますが、「化学反応の集積がいかんして生命となりうるのか」という壮大な

テーマのもと、翻訳後修飾によるタンパク質制御やアミロイド関連など幅広い分野で研究を展開しています。

### < PPM1D の基質特異性研究 >

私は坂口研に着任して以来、リン酸化に代表される翻訳後修飾によるタンパク質の機能調節に興味を持ち、これまでリン酸化モチーフ特異的抗体の開発と応用、および p 53誘導性ホスファターゼ PPM1D の機能解析について研究を実施してきました。翻訳後修飾の研究では今年のペプチド学会で修士2年の飯塚さんがポスター賞を受賞し、多くの方に評価された事をうれしく思っております(詳細はPNJ 59号をご参照ください)。今回はもう一つのテーマである PPM1D の機能解析について、その基質認識に静電相互作用が重要な役割を果たしていることを明らかにしましたので、ご紹介させていただきます。

#### 1. PP2C タイプホスファターゼ PPM1D

タンパク質の脱リン酸化を触媒するプロテインホスファターゼは、タンパク質のリン酸化を触媒するキナーゼと協同的に作用することにより、細胞周期の制御機構として重要な役割を担っています。PPM1D (protein phosphatase magnesium-dependent 1, delta) は、がん抑制タンパク質 p 53依存的に誘導される Ser/Thr ホスファターゼであり、その過剰発現が乳がん細胞の約15%に見られる事から、PPM1D と細胞のがん化の関係が近年注目されるようになりました<sup>(1,2)</sup>。細胞内の Ser/Thr ホスファターゼは酵素化学的性質より大きく4種類 (PP1, 2A, 2B および2C) に分けることができます。PPM1D はオカダ酸非感受性や Mg<sup>2+</sup> 依存性といった PP2C タイプに特徴的な酵素活性を示すことから PP2C タイプに分類され、他の PP2C と同様の触媒機構により基質の脱リン酸化を行っていると考えられています(図)。一方、他の PP2C タイプが触媒部位近傍の電荷の影響により基質に酸性残基を好まないにもかかわらず<sup>(3)</sup>、PPM1D の標的タンパク質として知られている p 38, Chk1, p 53などの脱リン酸化部位近傍には酸性アミノ酸や芳香族アミノ酸が多数見られることから<sup>(4,5)</sup>、我々は「PPM1D にはその基質認識において、他の PP2C タイプに見られないアミノ酸配列特異性を有しているのではないか」との考えに至りました。

#### 2. PPM1D の構造特異性

我々は PPM1D における基質の認識機序を明らかにすることを目的として、X線構造が明らかにされている PP2C の結晶構造を基に PPM1D の高次構造予測を行いました。その結果、PPM1D はその活性部位近

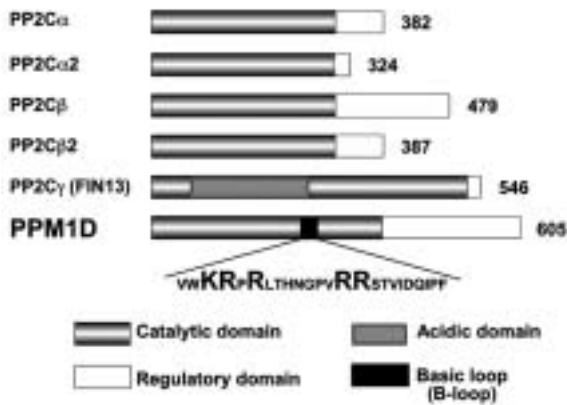


図 PP2C タイプホスファターゼ

傍に他の PP2C ファミリーには見られない塩基性残基に富んだループ領域 (B-loop) を有することを我々は見出しました (図)。この B-loop の PPM1D 基質認識に対する役割を解明するために、PPM1D の触媒ドメイン (WT-c) およびその変異体について、リン酸化 p53 ペプチドを基質として脱リン酸化能の解析を実施しました。

### 3. PPM1D の基質認識機序の解析

p53 の 15 位リン酸化セリンは細胞内において PPM1D 特異的に脱リン酸化されることが知られています<sup>(6)</sup>。我々は、15 位セリンがリン酸化されたペプチド p53 (10-23) 15 S (P) および、その 18 位の Thr 残基を酸性アミノ酸 Asp ならびに塩基性アミノ酸 Lys に置換した合成ペプチドを作製し、WT-c に対する速度論的解析を実施しました。その結果、p53 (10-23) 15 S (P) に比べて Asp 置換体は WT-c に対する親和性が上昇する一方、Lys 置換体では WT-c への親和性が減少することが明らかとなりました。さらに、PPM1D の変異体として B-loop 欠損体ならびに B-loop 内に存在する塩基性残基の Ala 置換体を作製し、酵素活性を解析したところ、これら変異体では p53 (10-23) 15 S (P) 基質ペプチドに対する親和性の顕著な減少が観察されました。これらの結果から、PPM1D の塩基性 B-loop と基質酸性残基間の静電相互作用が PPM1D の基質に対する結合に重要な役割を果たしていることが明らかとなりました。

これまで 4 種の Ser/Thr ホスファターゼの中において、PPM1D を含む PP2C タイプのみ有効な阻害剤は見つかっていません。PP2C タイプ特異的阻害剤の開発が PP2C タイプホスファターゼの機能解析研究だけでなく、抗がん剤としての病理的な見地からも熱望されています。現在、我々は今回明らかにされた PPM1D

の基質認識機序を基にした PPM1D 特異的阻害剤の開発を目指し、日々研究を行っているところです。

### <おわりに>

ポストゲノム時代の現在、タンパク質の翻訳後修飾に関する研究の加速度的な増加に伴い、キナーゼおよびホスファターゼについても多くの知見が蓄積されてきています。その中で“ペプチド”はタンパク質翻訳後修飾解析に欠く事の出来ない分子ツールとして、その役割と重要性は以前にも増して高まっていると思われます。私はこれまで分子生物学的手法を用いた研究に多く携わってきましたが、化学的な視点を見失わないように心がけてきました。今後も化学科出身の“chemist”という芯をしっかりと持ちつつ、研究に携わっていきたく考えています。また、現在指導する立場になり、毎年新しい研究者の卵が研究室に配属されてきますが、ときには息抜きとしてカラオケで尾崎豊やブルーハーツを熱唱することで交流を深めながら、彼らに研究の面白さを伝えていければと日々考えています。今後も北海道に降り積もる雪を溶かす程の“情熱”を持って研究および教育に精進していく所存です。

### (追記)

少し早いですが、来年 2007 年度に開催されるペプチド夏の勉強会は 40 回を数える歴史ある同会において初の北海道開催となります。私が世話人という大役を引き受けさせていただくことになりましたが、夏の北海道は気候も快適で交流を深める上でも最高の環境だと思いますので、多数のご参加をお待ちしております。

### <文献>

1. Li, J., Yang, Y., Peng, Y., Austin, R.J., van Eindhoven, W.G., Nguyen, K.C., Gabriele, T., McCurrach, M.E., Marks, J.R., Hoey, T., Lowe, S.W., Powers, S.: Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23. *Nat. Genet.* **31**, 133-134 (2002).
2. Choi, J., Nannenga, B., Demidov, O.N., Bulavin, D.V., Cooney, A., Brayton, C., Zhang, Y., Mbawuike, I.N., Bradley, A., Appella, E., Donehower, L.A.: Mice deficient for the wild-type p53-induced phosphatase gene (Wip1) exhibit defects in reproductive organs, immune function, and cell cycle control. *Mol. Cell Biol.* **22**, 1094-1105 (2002).
3. Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T., Barford, D.: Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J.*, **15**, 6798-6809 (1996).



4. Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, E., Tsukuda, H., Taya, Y., Imai, K.: p53-inducible wip 1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.*, **19**, 6517-6526 (2000).
5. Lu, X., Nannenga, B., Donehower, L.A.: PPM1D dephosphorylates Chk 1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev.*, **19**, 1162-1174 (2005).

ちゅうまん よしろう  
北海道大学大学院理学研究科化学専攻  
chuman@sci.hokudai.ac.jp

## 学会より

### 第43回ペプチド討論会・第4回 ペプチド工学国際会議

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



“Peptide Science and Engineering in Chemical  
Biology”

主催 日本ペプチド学会

共催 ペプチド工学国際会議

協賛・後援 日本化学会, 日本生化学会, 日本薬学会,  
日本農芸化学会, 日本生物工学会, 日本蛋白質科学  
会, 高分子学会, 有機合成化学協会

会期 11月5日(日)~8日(水)

会場 パシフィコ横浜アネックスホール

(横浜市西区みなとみらい)

#### 討論主題

Synthetic Innovation of Peptide & Protein; Peptide  
& Protein Design and Engineering; Structure-  
Activity Relationship for Chemical Biology; Peptide  
& Cell Engineering; Peptide & Drug Discovery;  
Peptidomics & Proteomics including Post-translational  
Modification; Peptide Library & Protein Chip;  
Peptide in Health and Medical Science; Peptide &  
Nanobiotechnology; Young Investigators' Symposium  
and Poster Competition (若手講演賞)

発表形式 口頭またはポスター発表

主な外国人講演者 Lars Baltzer (Sweden), Annette  
Beck-Sickinger (Germany), Ettore Benedetti (Italy),  
Ernest Giralt (Spain), Ferenc Hudecz (Hungary),  
Helmut Maecke (Switzerland), Jean Martinez  
(France), Peter Nielsen (Denmark), Manfred Mutter

(Switzerland), Claudio Toniolo (Italy), Helma Wen-  
nemers (Switzerland), Dek Woolfson (UK), Charles  
M. Deber (Canada), Annelise Barron (USA), Samuel  
H. Gellman (USA), Lila Gierasch (USA), Jeffery  
Kelly (USA), Kit Lam (USA), Thomas Muir (USA),  
James Tam (USA), Marcey Waters (USA), Tony  
Hughes (Australia), Ian Smith (Australia), Jackie  
Wilce (Australia), Shao Yao (Singapore), Kyung-Soo  
Hahm (Korea), Yoon-Sik LEE (Korea), YangMee Kim  
(Korea), Dawei Ma (China)

発表申込締切 6月2日(金) 詳細は日本ペプチド学  
会 web を参照ください。 <http://peptide-soc.jp/>

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 43JPS-PEM4@pac.ne.jp

### 第39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。(昨年度より日本ペプ  
チド学会主催になりました。)

今年は群馬大学工学部材料工学科機能物質化学講座  
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。  
(近日中に1st circular を配信する予定です。)多数のご  
参加をお待ちしております。

日時: 平成18年8月6日(日) - 8日(火)(予定)

場所: 関東甲信越地区国立大学共同利用合宿研修施設  
草津セミナーハウス

(〒377-1711群馬県吾妻郡草津町大字草津字白根  
737) <http://www.gunma-u.ac.jp/campus/index.html>

世話人: 山田 圭一

〒376-8515 群馬県桐生市天神町1-5-1

群馬大学工学部材料工学科機能物質化学講座

Phone: 0277-30-1345 Fax: 0277-30-1343

e-mail; yamada@chem.gunma-u.ac.jp

### 第8回ペプチドフォーラム

『ペプチド・タンパク質合成の革新的方法論と  
Chemical Biology への展開』

平成18年7月1日(土) 京都薬科大学 愛学館 愛学  
ホール

講演者：Stephen Kent (University of Chicago, USA), James P. Tam (Scripps Research Institute, USA), Peter White (Novabiochem, Switzerland), Barbara Döerner (Novabiochem, Switzerland), 相本三郎 (大阪大学), 藤井信孝 (京都大学), 宍戸昌彦 (岡山大学), 相馬洋平 (京都薬科大学)

問合せ先：齋藤一樹 (京都薬科大学21世紀COEプログラム)

E-mail: pep8@mb.kyoto-phu.ac.jp

詳細：http://www.kyoto-phu.ac.jp/coe/8peptide\_forum/

### 第29回ヨーロッパ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29回ヨーロッパペプチドシンポジウムに参加し、研究発表する2006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、2006年6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、6月中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、EPSからの助成金との重複受領はできません。また、ここ数年以内にJPS Travel Awardに採択されていない人が優先されますのでご注意ください。

### 日本ペプチド学会第9期役員

この2月から3月にかけて、第9期の役員選挙が実施されました。その結果、以下の役員が選出されました。なお、今後、副会長、各役割担当の理事、会長選任の評議員等が4月の理事会で選出されます。( \*過去3期連続選任理事の評議員)

会 長 木曾良明 (京都薬科大学)

理 事 相本三郎 (大阪大学) 赤路健一 (京都府立医科大学) 岡田芳男 (神戸学院大学) 木村皓俊 (㈱ペプチド研究所) 塩入孝之 (名城大学) 宍戸昌彦 (岡山大学) 藤井信孝 (京都大学) 三原久和 (東京工業大学) 若宮建昭 (近畿大学)

監 事 植木正彬 (東京理科大学) 小林祐次 (大阪薬科大学)

評議員 大高章 (徳島大学) 北田千恵子 (武田薬品工業㈱) 齋藤一樹 (京都薬科大学) 坂口和靖 (北海道大学) 佐藤一紀 (福岡女子大学) 下東康幸\* (九州大学) 高尾敏文 (大阪大学) 玉村啓和 (東京医科歯科大学) 豊島正 (㈱ペプチド研究所) 野水基義 (東京薬科大学) 林良雄 (京都薬科大学) 日高雄二 (近畿大学) 深瀬浩一 (大阪大学) 藤井郁雄 (大阪府立大学) 二木 史朗 (京都大学) 松崎勝巳 (京都大学) 南野直人 (国立循環器病センター研究所) 向井秀仁 (三菱化学生命科学研究所)

### 編集後記

巻頭には、この度日本ペプチド学会の名誉会員となられた鈴木昭憲先生、松尾壽之先生にご寄稿いただきました。大変お忙しい中どうもありがとうございました。また、今回は「若手特集」ということで、各編集委員の方にご推薦いただいた国内外で活躍中の若手研究者の皆さんにご執筆いただきました。如何だったでしょうか? 「なかなか頑張っているな」「自分の若いころを思い出すなあ」など、様々な感想を持たれたのではないのでしょうか。いつまでも、彼らのように研究に対する情熱を持ち続け、また良き指導者として共に頑張っていくことができるよう、日々研鑽を積んでいきたいものです。

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：前田 衣織)