



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.73

2009年7月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

棘皮動物の生殖を司るペプチド

始めに

本ニュースレターの読者の多くは、いつも理路整然と計画的に進められている研究紹介を見ておられるのだと思います。今回は、生物屋が興味ある生物現象の仕組みを調べたくて、見よう見まねで進めた生理活性成分探求の話をも2題ほど紹介させていただきます。

多くの動物では、母親から正常に産卵された卵でなければうまく受精が出来ません。産卵に先立ち母親の体内でホルモンの作用を受けて、卵の生理状態が受精とその後の胚発生に向けて変化するのです。そうしたホルモンの働きをいろいろな動物を使って調べてきました。今回は、棘皮動物のヒトデとナマコのホルモンの話です。

棘皮動物の卵成熟研究の始まり

1959年に米国のChaetとMcConnaugheyが、ヒトデの放射神経の熱水抽出物を産卵期の雌個体に注射して放卵現象を観察した。当時、東京大学海洋研究所にいた故金谷晴夫博士は日本産のヒトデを用いて同様の現象を確認し、神経由来の物質による産卵制御のモデルとなることを確信したという。その後、金谷らのグループを中心として、放卵現象の解析と、それを支配する物質の探求が進められてきた。

ヒトデに限らず一般に動物の産卵期卵巣中の卵（正確には卵母細胞）は、個々に濾胞細胞に取り巻かれており、十分に肥大成長したものであっても、そのままでは受精出来ず未成熟な卵と呼ばれる。この時の卵はまだ減数分裂を完了していないのである（減数第1分裂前期に留まっている）。金谷らは、ヒトデの放射神経から分泌される成分が濾胞細胞に作用して新たに2次成分を合成・分泌させること（神経成分の生殖腺刺激活性）、濾胞細胞から分泌された2次成分が卵母細胞に直接働いて減数分裂を再開させ、受精可能な卵細胞へと変化させることを明らかにした（濾胞成分の卵成熟誘起活性）。卵母細胞の減数分裂が進み受精可能となる現象を卵成熟と呼ぶ。

イトマキヒトデの濾胞細胞から分泌される卵成熟誘起活性成分は核酸の微量塩基である1-methyladenineであることが1969年に明らかにされた。動物界で初めて明らかにされた卵成熟誘起ホルモンであった。一方、



吉国 通庸

ヒトデ放射神経から分泌され濾胞細胞を刺激する生殖腺刺激活性成分（gonad-stimulating substance；GSSと呼ばれた）の探索は、金谷の弟子である白井弘子らが続け、還元処理感受性の比較的低分子量のペプチドであることが分ったが、当時の機器では構造を明らかにするところまでは至らなかった。

補：脊椎動物で初めての卵成熟誘起ホルモンは、金谷の後に研究室を引き継いだ長濱嘉孝（現基礎生物学研究所教授）らにより、1985年に、サケ科魚アマゴから17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone) が同定されている。

ヒトデの生殖腺刺激ホルモンはインスリン族ペプチドであった

昨今の分析機器の性能を頼りに、金谷・白井の仕事を引き継ぎヒトデGSSの同定を再度試みた。イトマキヒトデの放射神経束は、腹側から見ると管足の基部に沿って海水に露出して走行しており、眼科用ピンセットなどで容易に摘出出来る。GSS活性は、*in vitro*でヒトデ卵巣片から成熟卵の放出（排卵）の有無で確認した（排卵アッセイ法）。この方法は簡便で、その検出感度は高く（後日の合成標品での検定ではED₅₀は数nMであった）、同じヒトデ個体を活かしておき少なくとも数回は卵巣片を摘出出来るので再現性も高い、非常に優れた生物検定法であった。

5500匹のヒトデの神経からの抽出液を除タンパクした後、力任せに逆相クロマトグラフィーを4回繰り返して単一の成分を得た。MALDI-TOF-MSで分子量4737（小数点以下省略）、還元処理で2236と2507の2成分が得られ、heterodimerであると思われた。幸いに辛うじてprotein sequencerに掛かる量であったので、それ以上のクロマトを諦め、そのままsequencerで分析すると同時に、磯部稔教授（名大・農）にお願いしてQ-TOFでMS/MSデータを取って頂いた。sequencerではC末端までは読み切れなかったが、MS/MSデータで配列を補完することが出来た。

明らかとなったイトマキヒトデ活性成分の配列は、A鎖(2507)が SEYSGIASYCCLHGCTPSELSVVC、B鎖(2236)が EKYCDDDDFHMAVFRTCAVSでMALDIでの値とも一致した。驚いたことに、A鎖のCCXXXCXXXXXXXXXC、B鎖のCXXXXXXXXXXXXCというシステインの配置は、インスリンスーパーファミリーペプチドのシステインモチーフそのものであった。6つのシステインは全てジスルフィド架橋に関わり、AB間に2対、A鎖内に1対の架橋を形成し6massを失う。インスリンの生合成は、一つの遺伝

子が一本の長いペプチド鎖をコードし、翻訳後のプロセッシングで成熟型のヘテロ二量体となる。イトマキヒトデ活性成分の遺伝子をクローニングしてみると、果たしてインスリンと同様の遺伝子構造を持っていることが判明した。

インスリンペプチドの化学合成は素人には難しいが、とにかくA鎖・B鎖を合成し自然酸化で反応させて見ると、非常に低収率ではあったが、分子量・クロマトの溶出位置共に天然標品と一致する物が得られた。生物検定に用いたところ、単離した濾胞細胞にかけると1-methyladenineの合成・分泌を誘導したこと、それにより卵成熟・排卵を誘起したこと、その時のED₅₀が天然物の推定値と一致したこと（ED₅₀は数nM）から、単離同定したインスリン型のペプチドがイトマキヒトデの生殖腺刺激ホルモン（GSS）であると決定した¹⁾。In situ hybridizationでGSS遺伝子の発現部位を見ると確かに放射神経組織で発現していることも確認出来た。

インスリンスーパーファミリーには、インスリン、インスリン様成長因子（IGF）、リラキシン、ボンビキシン（昆虫類）等のサブグループが含まれる。前3者の遺伝子を系統解析してみると、インスリン・IGFのサブグループとリラキシンサブグループの二つに分かれる（ボンビキシンは遺伝子の特殊化の程度が大きいので省いている）。イトマキヒトデGSSはリラキシンサブグループに含まれた。リラキシンは、哺乳類分娩時の恥骨結合・子宮頸部の弛緩を誘起するペプチドとして発見された。他に、乳腺の発達促進や精液中での精子運動活性化作用などが報告され、生殖にも関わるインスリン族ペプチドとして知られる。また、リラキシンサブグループは、インスリン族遺伝子の分子進化中で最も古いグループと考えられている。

無脊椎動物は多くの動物門を含み、様々な動物からインスリン様ペプチドの存在の報告があるが、その生理作用を明確に証明したものはない。今回のイトマキヒトデの生殖腺刺激ホルモンの解明が初めての例ではないだろうか。今後、無脊椎動物のインスリン様ペプチドの生理機能解明の一助となれば嬉しい。また、棘皮動物インスリン族ペプチドが生殖作用を司っていたという事実は、インスリン族遺伝子の機能の進化を考える上でも興味深い。

マナマコの卵成熟と産卵行動を誘発するペプチド

次にマナマコの産卵を誘発するペプチドを紹介したい。金谷らのイトマキヒトデ研究を参考に1980年代にマナマコの卵成熟の研究が行われていた。丸山好彦（現島根大臨海実験所）はマナマコ放射神経中に卵成熟誘起活性を検出したが、やはり機器感度の点で詳細な構造解析は困難であったようだ。ヒトデGSSの解明が一段落したので、次にマナマコのホルモンを探すことにした。中国では、干しマナマコは海中珍寶七品の一つに数えられる大変な高級食材である。中国経済の躍進を受けて日本からの干しマナマコ輸出は、海産物中で真珠に続いて2位（19年度統計）になるなど水産業界の期待も大きい。マナマコはヒトデ類と同じ棘皮動物に属するので、ヒトデGSSに続く二つ目のインスリン族ペプチドが見つければという基礎生物学的な期待

もあった。しかし、全く他の化合物の可能性もあり得るので、あくまでも生理活性のみを指標として活性成分を追いかけることとした。

棘皮動物には周口神経系と放射神経系の2つの主要な神経系があるが、摘出の容易さから周口神経を材料とすることにした。活性検定はヒトデの場合と同様に、摘出した卵巣片を用いた排卵アッセイ法を用いた。

約150匹分の口器組織（周口神経を含む）抽出物の除蛋白した画分に活性は回収された。ここでも逆相クロマトグラフィー一本で精製を進めた。3段階のクロマトグラフィーの後に2カ所の活性画分を得た。どちらもほぼ単一成分にまで精製出来ていた。2画分ともにUV検出系でのシグナル強度が予想以上に強く、本当に微量のホルモン様成分なのかと不思議に思いながらprotein sequencerとLC-MS/MSで構造解析を進め、NGIWyamideとQGLFSGVamideを得た²⁾。

排卵アッセイ法で合成標品の活性を検定してみると、QGLFSGVamideでは μ MレベルのED₅₀値であったが、NGIWyamideのそれは用いたマナマコ雌個体の成熟度（卵巣の感受性度）にもよるが、なんとpMレベルにも達するほど強力なものであった。では、NGIWyamideはpMレベルもの強い活性を持ちながら、どうして精製中に不審に思うほどのシグナル量を示したのか？何故それほど量が含まれていたのか？過去の報告を調べて分かった。NGIWyamideは、広島大学の宗岡洋二郎先生（生理活性ペプチドの比較神経生物学のご研究で日本動物学会賞を受賞しておられる）らのグループが、1995年にマナマコの神経ペプチドの網羅的解析の中で見出したペプチドであった。 μ Mレベルで縦走筋や腸管を収縮させる作用がある。その後、

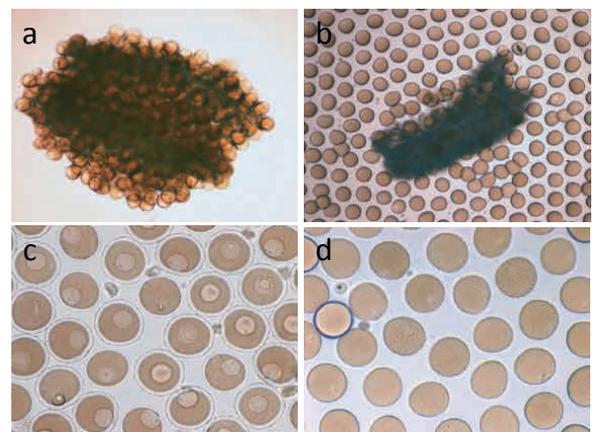


図1. マナマコ排卵アッセイと成熟卵：
マナマコの卵巣片（a）をNGIWyamide（この例では10nM）で処理すると1時間程度で排卵が見られる。卵を放出した後の卵巣組織は収縮して縮んでいる（b）。NGIWyamide処理前の卵巣内の卵母細胞は、個々に濾胞細胞に取り巻かれている。卵母細胞の外側には透明なゼリー層があり、濾胞細胞はその外側に張り付いている（c）。NGIWyamide処理により卵成熟を起した卵（d）。核膜が消失して核の存在が見えなくなっている。濾胞細胞は卵表層から脱落している。a～d共に十分に育った卵の直径は約150 μ mである。

東工大の本川達雄らのグループが、ナマコ体壁を成す結合組織の硬化を誘導する機能を中心にその作用の解析を続けている。NGIWyamideは結合組織内を走行する神経細胞にかなり含まれているらしい。マナマコ体組織毎のNGIWyamide含量はまだ定量していないが、どうやらそれが、大きなシグナル強度の原因だったのだろう。材料とした口器部分には、相当量の結合組織が含まれていたから。

NGIWyamideの構造活性相関解析は始めたところであるが、イソロイシンをロイシンに置換したNGLWyamideは、天然型の10倍から100倍（用いる個体による）強い活性を示した。一方で、C末端のアミド化を除くと活性は μM 以下に激減した。QGLFSGVamideも活性を失う。今後、NGIWyamideの受容部位・受容体を解析するためにも適当な誘導体を探さねばならない。僅か5残基のペプチドなので、残念ながら未だに遺伝子のクローニングには成功していない。共同研究で、マナマコ神経組織で発現するmRNAを網羅的に解析するEST解析を進めているので、いずれそれに引っかけられるだろうと思っている。5アミノ酸だけをコードする遺伝子とは考えられないので、NGIWyamide配列のマルチリピートなのか、それとも他に別のペプチドがコードされているのか、楽しみである。

ヒトデGSSは卵巣中の濾胞細胞に作用して2次ホルモンである1-methyladenineを分泌させることから、いわゆる生殖腺刺激ホルモンに分類出来る。ところが、マナマコNGIWyamideは、卵巣から取り出した濾胞細胞に包まれた卵母細胞の卵成熟を誘起出来ないことが分かった。どれだけ丁寧に取り出しても成熟しない。現時点では、卵巣中の別の組織を標的としていることが分かりつつあり、そこから更に別の物質が出て、それが濾胞細胞に作用しているらしい。それがインスリン族ペプチドであれば、さらに話は面白くなるのだけれど。いずれにしてもNGIWyamideは、ナマコの生殖腺刺激ホルモンではなく、ホルモン情報の流れにおいて、もう一段上流に位置することとなる。これも又、新しい発見であった。ヒトデではGSSの上流のものは



図2. NGIWyamide注射（最終体内濃度 10^{-8}M ）により誘発されたマナマコ放精・放卵行動。左が雌、右が雄で、それぞれ頭の後の生殖孔から放卵、放精している。注射後、1時間前後から放精・放卵が始まり、1時間ほど継続する。

想定されていない。ナマコはヒトデより複雑な制御をしているのだろうか？

最後にもう一つ。産卵期の雌雄の親ナマコにNGIWyamideを注射するとどうなるか？勿論、成熟した卵・精子を放出するのであるが、面白い行動が見られた。水産実験所の大水槽の中に両拳ほどの石で小さな小山を作り、その傍らに注射したマナマコを置いてやる。それに触れて気付いたナマコは石山を登り始めるのである。石山の頂上に登り詰めたナマコは、そこで頭を大きく持ち上げる。体の後部分の管足で石にしっかり張り付いて体を固定し、持ち上げた頭を大きくゆっくり左右に振り始める。そして頭の後（！）にある生殖孔から放卵・放精するのである。まるで海中に子供達を振りまくように。NGIWyamideの作用による卵成熟が完了するのは1時間以上かかり、それから産卵されるのだが、石山の登攀開始は注射後10分も掛からない個体さえいる。NGIWyamideは生殖腺に働くのと同時に、産卵行動をも誘発する作用を持つらしい。どこに効いているのか、どうやって調べるか、これからの研究が楽しみである。

おわりに

脊椎動物では生殖腺刺激ホルモンは、視床下部から分泌される生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の刺激を受けて脳下垂体から分泌される。GnRHはより上流に位置して生殖を司る重要なホルモンである。脊椎動物では詳しく調べられてきたが、無脊椎動物にGnRHがあるかどうかは長らく不明であった。2002年にサントリー生有研のグループにより発見されたマダコのGnRH様ペプチドは驚きであった。昨年以來、同じ軟体動物のアメフラシのゲノム解析からGnRH様ペプチドが見つかり、続いてケンサキイカからも遺伝子がクローニングされた。イカのもはマダコと同じアミノ酸配列を持っている。公開されているデータベースを検索すると、カサガイ類やイトゴカイ（環形動物）からも類似のペプチドが見つかる³⁾。但し、マダコのもの以外では生殖に関わる様な作用の解析はまだである⁴⁾。軟体・環形以外の他の無脊椎動物でもGnRH様ペプチドは見つかるだろうか？マナマコのNGIWyamideは生殖腺刺激ホルモンの上流という意味ではGnRHと同じ位置付けになるのだが、GnRHとは似ても似付かない構造だったのはちょっと残念か…。

ヒトデの研究は、私の前任地である基礎生物学研究所の長濱嘉孝研究室で、学芸大の三田雅敏氏との共同研究で行なったものです。マナマコの研究は、基礎生物学研究所の大野薫氏と水産総合研究センター養殖研究所の山野恵祐氏と共に、生研センターの支援を受けて実施いたしました。

参考文献

- 1) Mita M., Yoshikuni M., *et al.*, A relaxin-like peptide purified from radial nerves induces oocyte maturation and ovulation in the starfish, *Asterina pectinifera*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106, 9507-9512, 2009.
- 2) Kato S, *et al.*, Neuropeptides induce oocyte maturation and gamete spawning of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*,

Dev. Biol., 326, 169-176, 2009.

- 3) Tsai PS, and Zhang L., The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes : orthology, phylogeny, structure, and function., Biol. Reprod., 79, 798-805, 2008.
- 4) Minakata H, *et al.*, Octopus gonadotropin-releasing hormone : a multifunctional peptide in the endocrine and nervous systems of the cephalopod., J. Neuroendocrinol., 21, 322-326, 2009.

よしくに みちやす
九州大学農学研究院
アクアフィールド科学講座
yosikuni@agr.kyushu-u.ac.jp

ペプチド・タンパク質と 生物無機結晶との相互作用

はじめに

私は、これまでに2回このニュースレターに記事を書かせていただいた。2回目に「ペプチドの多様な機能を探索する-ペプチドと無機結晶との相互作用-」(No. 38, 2000年10月)と題して書いて以来10年近くになる。ここでは、この間の研究成果の一部を紹介したい。

下等な細菌から高等植物・動物に至るまで、さまざまな生物が無機鉱物を生体の内外に作る。この作用は生鉱物化(バイオミネラリゼーション, biomineralization)と呼ばれる。鉱物の種類もまたさまざまであり、FeやMnなどを含む鉱物もあるが、貝殻やサンゴなどの炭酸カルシウムと骨や歯などのリン酸カルシウムが主であり、いずれもカルシウム塩である。炭酸カルシウムバイオミネラリゼーションは二酸化炭素の固体への固定反応として、光合成による二酸化炭素の有機物(糖)への固定反応と対照的である。光合成産物は容易に分解してまた二酸化炭素に戻っていくが、固体に固定された炭酸カルシウムは長い炭素循環サイクルの中に組み込まれる。海洋生物による何億年もの生命活動の結果、その遺体は石灰岩と化して山や海の堆積物を形成しており、これは地球上の炭素の約90%を占める。残りの炭素は石油や石炭等の形で浅い地殻に存在しているが、これまた生物の遺体由来する。本記事は、固体への固定反応に関わるペプチド・タンパク質についてのお話である。



長澤 寛道

アメリカザリガニの胃石の基質タンパク質

筆者が最初にバイオミネラリゼーションに興味を持ったのは、甲殻類の脱皮の内分泌制御の研究に着手して間もない頃で、アメリカザリガニを室内で飼育していたときのことである。ひとつの容器に4, 5匹の個体を入れておいたのが、翌日来てみると、1匹少ない。そのときは必ず直径数ミリメートルの半球状の白い石が2個容器の底に発見された。文献からこれは胃石と呼ばれるもので、脱皮の前にのみ胃の中に形成さ

れる炭酸カルシウムの石であることがわかった。脱皮に際して外骨格中の炭酸カルシウムは溶かされ、胃に送られて胃石として一時貯蔵され、脱皮の後に溶かされて再び外骨格の石灰化に使われる。このように石灰化・脱石灰化が内分泌制御下にあるのが甲殻類の特徴である。

まず、胃石に含まれる有機物を調べた。大部分の炭酸カルシウムを希酢酸で溶解するとスポンジのような不溶物が残った。この不溶物をdithiothreitolを含むSDS溶液中で煮沸するとSDS-PAGE上でほぼ1本のバンドを示すタンパク質が抽出された。このタンパク質をgastrolith matrix protein (GAMP)と命名した。TOF-MS解析により、分子質量は約50,500 Daと推定された。N末端はブロックされていたが、内部アミノ酸配列の解析データを基にcDNAをクローニングした。その結果、1515 bpから成るORFは18残基のシグナルペプチドと487残基のGAMPをコードしていた。GAMPのN末端はピログルタミン酸でブロックされており、N末端側に10アミノ酸による17回の繰り返し構造が、C末端側に5アミノ酸による15回の繰り返し構造が存在した。前者はヒトのinvolucrinという皮膚に存在するタンパク質の特徴と類似していたことから、皮膚としての機能に共通の役割を有していることが推定される。発現解析の結果から、GAMP遺伝子は脱皮の前に胃石を作る細胞群(胃石板という)でしか発現していないことがわかった。また、胃石板組織の培養系に脱皮ホルモンを加えると、GAMP遺伝子の発現が著しく上昇することが確認された。さらに、GAMPは 5×10^{-8} Mでin vitroでの炭酸カルシウム過飽和溶液からの結晶化を阻害した。以上のことから、GAMPは胃石形成の制御に重要な役割を果たしていることが推定された¹⁾。

アメリカザリガニの外骨格の基質ペプチド

次に、甲殻類では代表的な石灰化組織である外骨格についてその石灰化を制御していると考えられる有機基質を探索した。そのために、石灰化阻害活性検定法を考案した。これは、1981年にすでにアメリカの研究者によって発表されていた方法を小スケール用に改良したものである。この検定法を用いて、酢酸で脱灰したアメリカザリガニの外骨格の不溶性画分から、SDS溶液で抽出し、その抽出物をHPLCにより精製することによって、2種類の活性ペプチド(CAP-1, -2と命名)を得た。配列解析の結果、CAP-1および-2はそれぞれ78および65アミノ酸残基からなり、ともにキチン結合配列として知られているRebers-Riddiford共通配列を有しており、お互いに約60%の配列の相同性を示した(図1)^{2,3)}。また、いずれもAsp残基を多く含む酸性ペプチドで、これが石灰化阻害活性を示すこと、およびカルシウムイオン結合能があることの原因の一つと考えられた。バイオミネラルに含まれる他の多くの有機基質が酸性の高分子化合物とされているが、その意味ではこれら2つのペプチドの性質も合致している。

CAP-1はSerを6残基含むが、そのうちの70残基目のSerだけがリン酸化されていることがわかった。このリン酸化によってこのペプチドは酸性の度合い

おわりに

甲殻類を出発にして、興味は徐々に膨らんで行き、魚類の耳石、円石藻の円石（ココリスと呼ばれる）、アコヤガイの貝殻にも対象を広げ、炭酸カルシウムバイオミネラル化の鍵となる有機基質に構造的・機能的な共通性がないかを調べた。これまでのところ、上述のように、残念ながら化学構造の共通性は見つかっていない。しかし、機能的には有機基質の存在様式とin vitroでの活性から、われわれは有機基質が主に3つに分類できることを提唱している（図2）⁶⁾。

1. 生理的条件下で、不溶性高分子化合物（例えば、コラーゲン、キチン、セルロース等）
2. 1の不溶性高分子化合物と結合し、結晶核形成、結晶多形、結晶方位等を制御する化合物で、酸あるいはEDTA溶液では抽出されないもの
3. 酸あるいはEDTA溶液で抽出される化合物で、結晶成長や結晶の形を制御するもの

このうち、最も重要な化合物は2の化合物と考えられる。今後もこの分類を強く意識して新しい機能性化合物、特にタンパク質やペプチドの探索とそれらの機能の解析によってバイオミネラル化という現象のより深い理解に繋がりたいと考えている。

参考文献

- 1) Tsutsui, N. et al., Zool. Sci., 16, 619-628 (1999)
- 2) Inoue, H. et al., Biosci. Biotech. Biochem., 65, 1840-1848 (2001)
- 3) Inoue, H. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 318, 649-654 (2004)
- 4) Sugawara, A. et al., Angew. Chem. Int. Ed., 45, 2876-2879 (2006)
- 5) Sugisaka, A. et al., Front. Mater. Sci. China, 3, 183-186 (2009)
- 6) 長澤寛道, 海洋生物における石灰化の意味, 海と生命, 塚本勝巳編, 東海大学出版会, 218-231 (2009)

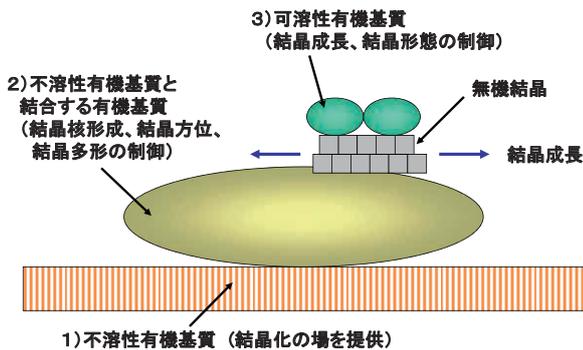


図2. バイオミネラル中の基質ペプチド・タンパク質の存在様式と役割

ながさわ ひろみち
東京大学・大学院農学生命科学研究科
anagahi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

チオエステル法の現状と今後の課題

1. はじめに

チオエステル法とは、長鎖のペプチドを化学合成する際に用いられるセグメント縮合法の一つである^{1,2)}。この方法は、リン酸化タンパク質や糖タンパク質を含む数多くのタンパク質化学合成に利用されてきた。本稿では、この方法が開発されて以降の改良点、依然として残る問題点、今後の課題等について、我々の最近の研究結果を述べながら紹介していきたい。



片山 秀和

2. 従来型チオエステル法

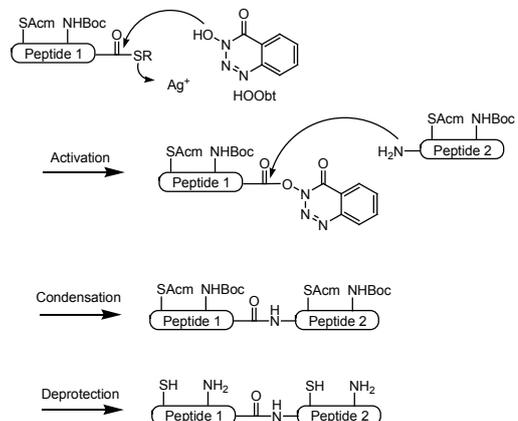
チオエステル法は、1991年に北條らによって開発されたセグメント縮合法に改良を施して出来上がった方法である。それは、以下のようなスキームで反応が進行する。すなわち、ペプチドチオエステルをAg⁺イオンによって活性化し、反応系中に存在するHOObtとエステル交換することによってペプチドのC末端のみを化学選択的に活性エステルへと導き、N末端アミノ基と反応させることによってペプチド結合を形成させる。この方法では、原理的には縮合部位に特定のアミノ酸を必要としないという利点がある。一方、化学選択的縮合のためにCys残基側鎖をAc基で、Lys残基側鎖をBoc基で保護して反応を行うことが一般化されてきた。

縮合反応に用いられるペプチドセグメントは、化学合成されたものに限らない。近年、川上らは、大腸菌発現系によって調製したペプチドを、チオエステル法によるセグメント縮合反応に用いる方法を確認し、p21MAXタンパク質の化学合成を達成した³⁾。この方法によって、大腸菌の系では導入不可能な翻訳後修飾がほどこされている部分のみを化学合成し、それ以外の部分は発現タンパク質を用いることが可能であるため、調製可能な分子量に理論上の限界が無くなった。

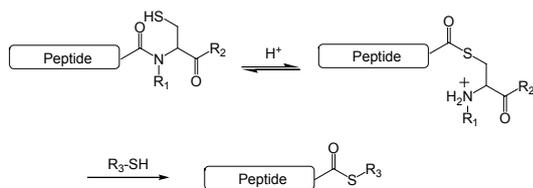
このままでも、この方法はほぼ完成されている。しかし、本当に改良する余地は残されていないのだろうか？

3. ペプチドチオエステル調製法の開発

通常のFmoc固相合成法では、チオエステル基がFmoc基の除去に用いられるピペリジンに不安定であ



Scheme 1. チオエステル法の概略



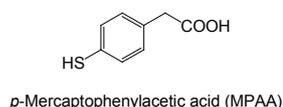
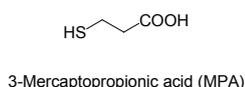
Scheme 2. NAC法によるペプチドチオエステル調製法

るため、ペプチドチオエステルを直接的に合成することは困難である。そこで我々は、固相合成の後に選択的にC末端をチオエステルへと変換する方法として、*N*-Alkyl Cysteine (NAC) 法を開発した。この方法は、ペプチドのC末端にNACを導入しておき、酸性条件下における*N*-S転移反応、およびそれに続く分子間チオエステル交換反応によって、ペプチドチオエステルを得る方法である⁴⁾。

この方法によって、従来のペプチドチオエステル調製法と比較して飛躍的に収率を向上させることが可能となり、数多くのタンパク質および糖タンパク質の化学合成に利用されている。

4. 活性化にAg⁺イオンは必要か？

従来の方法では、N末端側セグメントのチオエステル基の安定性を考慮して、3-mercaptopropionic acid (MPA) のようなアルキルチオールとのチオエステルを用いていた。このような安定なチオエステルは、元来の活性化度が低いため、Ag⁺イオンによる活性化が必要であった。しかし、thiophenolとのチオエステルのような、弱いながらも活性化されているようなのであれば、Ag⁺イオンは必須ではないのかもしれない。我々は、そのような考えの下、*p*-mercaptophenylacetic acid (MPAA) とのペプチドチオエステルを縮合反応にそのまま供してみた。その結果、Ag⁺イオンが存在しない条件においても、ペプチドの縮合反応が進行することが明らかになり、この方法によりヒトケモカインの1つであるCCL27の化学合成を達成した⁵⁾。



では、アルキルチオエステルをMPAA存在下でAg⁺イオンを使用せずに縮合反応に用いることができるのだろうか？ すなわち、反応系中にAg⁺イオンの代わりにMPAAを添加することによって、チオエステル交換によるチオエステルの活性化が可能なのではないだろうか。そこで、MPAとのペプチドチオエステルを、MPAAおよびHOOt存在下で縮合反応に供してみたが、反応はまったく進行しなかった(未発表データ)。反応中に、MPAAとチオエステル交換した中間体も確認できず、チオエステルの分解もおこらなかったことから、反応条件において、チオエステル交換反応が起

こらないか非常に遅いために、反応が進行しなかったもとの思われる。

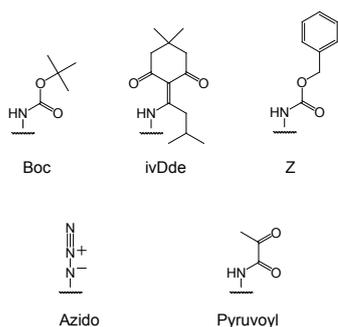
5. 保護基はこれが最善なのか？

先にも述べたが、チオエステル法による縮合反応の際には、Lys残基側鎖にはBoc基を、Cys残基側鎖にはAcm基を保護基として従来より用いてきた。しかしながら、Boc基は、ペプチド固相合成後の樹脂からの切り出しに用いられるTFAにより除去されてしまうため、縮合反応前に再導入する必要があった。そのような煩雑さを避けるためには、酸や塩基に安定で、縮合反応後に容易に脱保護可能な新たなアミノ基保護基をLys残基にあらかじめ導入しておき、それをペプチド合成に利用する方法が考えられる。市販のアミノ酸誘導体に用いられるアミノ基保護基のうち、Z基、あるいはivDde基はそのような性質を有している。すなわち、Z基はTFAよりも強い酸によって、ivDde基はヒドラジンによってそれぞれ脱保護が可能である。実際、ivDde基を保護基として用いたタンパク質の化学合成が近年、報告された⁶⁾。しかし、ペプチド中のLys残基すべてにこのような保護基を導入した場合、ペプチドの疎水性が上昇し、精製が困難になる懸念がある。そこで我々は、これらより疎水性の低い保護基としてアジド基に着目した。

アジド基は、これまで“click chemistry”による部位特異的修飾を目的としてペプチドに導入されることはあったが⁷⁾、縮合反応時の保護基としての有用性は検討されてこなかった。そこで我々は、アジド基の保護基としての有用性を示すことを目的としてモデルペプチドの合成を行った。その結果、アジド基はペプチド固相合成、樹脂からの切り出し、チオエステル法による縮合反応の諸条件下において安定であり、かつ反応後に亜鉛/酢酸により容易にアミノ基へと変換することができた。これは、アジド基のペプチドの保護基としての有用性を示した最初の報告となった⁸⁾。なお、アジド基はチオール化合物のような還元剤存在下において不安定であると思われるが、我々の予備実験では、アジド基はチオールによる還元を受けにくいという結果が得られている。例えば、NAC法によるペプチドチオエステル調製反応の条件下(5% MPA)において、アジド基の分解は48時間後においても10-15%程度にとどまる。アジド基含有ペプチドチオエステルも、NAC法によって高収率で得ることに我々は成功している。

さて、アジド基以外に保護基となりうるものはほかにないのだろうか？ 我々は、新たな保護基の候補として、pyruvoyl基に着目した。pyruvoyl基のようなα-ketoacyl基は、*o*-phenylenediamineによって除去することが知られており、大腸菌発現系によって調製したペプチドを縮合反応に用いる際に、川上らもセグメント調製の中間体のN末端保護基としてα-ketoacyl基を用いていた³⁾。しかしながら、このような保護基を、Lys残基側鎖の保護基として利用した例はこれまでになかった。そこで我々は、pyruvoyl基を保護基として用いて、ペプチド固相合成および縮合反応を行った。その結果、いくつかの点で副反応が確認されたが、それらを抑えながら効率よく縮合反応を行うことが可

能となった⁹⁾。この方法により、生理活性ペプチド、および糖ペプチドの効率的合成を達成した。



6. 今後の課題

ペプチドの化学合成の最終目標とは何なのだろうか？ その答えは、おそらく合成に携わっている研究者ひとり一人違っているのではないだろうか。私の考えている目標は「大腸菌発現系よりも簡単に効率よくタンパク質が得られる」ような系の確立である。そのためには、どのような工夫が必要であろうか？

固相合成の限界が40-50残基の長さであると一般的に言われているが、それならば、100残基程度ならば、2つのセグメントを縮合するだけでできるはずである。極端なことを言うならば、50残基をそれぞれ固相合成して、2種類の樹脂を一緒くたに脱保護して、混ぜるだけで勝手に縮合反応が終わるような反応ができれば、それが一番手っ取り早いわけである。その後の保護基の脱保護も、ステップが単純かつ少ないほうが良いのは述べるまでもない。そのためには、Cys残基の保護基も改良する必要があるのではないだろうか。また、ペプチドチオエステルのもっと効率的な合成法が必要なのではないだろうか。考えれば考えるほど、先の道のりは長いような気がする。

参考文献

- 1) Hojo H, Aimoto S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111-117.
- 2) Aimoto S. *Biopolymers (Peptide Sci.)* **1999**, *51*, 247-265.
- 3) Kawakami T, Hasegawa K, Teruya K, Akaji K, Horiuchi M, Inagaki F, Uesugi S, Aimoto S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2625-2628.
- 4) Hojo H, Onuma Y, Akimoto Y, Nakahara Y, Nakahara Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 25-28.
- 5) Hojo H, Murasawa Y, Katayama H, Ohira T, Nakahara Y, Nakahara Y. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1808-1813.
- 6) Arnusch C J, Branderhorst H, de Kruijff B, Liskamp R M, Breukink E, Pieters R J. *Biochemistry* **2007**, *46*, 13437-13442.
- 7) Chen G, Wan Q, Tan Z, Kan C, Hua Z, Ranganathan K, Danishefski S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7383-7387.
- 8) Katayama H, Hojo H, Ohira T, Nakahara Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5492-5494.
- 9) Katayama H, Utsumi T, Ozawa C, Nakahara Y, Hojo H, Nakahara Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 818-821.

かたやま ひでかず
 東海大学・糖鎖科学研究所
 katay@hotmail.co.jp

学会からのお知らせ

第46回ペプチド討論会 開催のお知らせ

主催：日本ペプチド学会

共催：日本化学会、日本薬学会、日本生化学会、日本農芸化学会、北九州市

会期：平成21年11月4日(水)～6日(金)

会場：北九州国際会議場

(JR小倉駅新幹線口より徒歩5分 北九州市小倉北区浅野3-9-30 Tel: 093-511-6848)

討論主題：

1. アミノ酸およびペプチドの化学
2. 生理活性ペプチドの単離・構造決定および合成
3. ペプチド合成の新規な戦略と方法論
4. ペプチドの構造-機能相関
5. ペプチドの医学および薬学的研究
6. ペプチドインフォマティクス
7. ペプチドに関連したケミカルバイオロジー
8. ペプチドの構造解析
9. ペプチドのバイオマテリアルへの応用
10. その他広くペプチド科学に関する研究

発表申込・アブストラクト受付：

8月1日(土)～31日(月)

(発表申込・アブストラクトの締切が同日です)

発表形式：口頭(英語・日本語)またはポスター

(昨年同様若手シンポジウムを企画しております。詳しくは下記HPを参照して下さい)

第46回 ペプチド討論会
 主催 日本ペプチド学会
共催 日本薬学会、日本生化学会、日本化学会、日本農芸化学会

開催日: 2009年11月4日(水)～6日(金)
 会場: 北九州国際会議場
 (JR 小倉駅・新幹線口・徒歩5分)
 演題応募受付: 8月1日(土)～8月31日(月)
<http://www.life.kyutech.ac.jp/~jps46/>
 詳しくはHPをご覧ください

11月7日(土)
 「市民フォーラム」
 環境にやさしく
 健康を守る万能素材
 -アミノ酸・ペプチド-
 開催

○事前・登録/参加費
 一般(ペプチド学会員・共催学会員): 6,000円
 (非会員) 10,000円
 学生(ペプチド学会員・共催学会員): 3,000円
 (非会員) 5,000円

○当日・登録/参加費
 一般(ペプチド学会員・共催学会員): 8,000円
 (非会員) 12,000円
 学生(ペプチド学会員・共催学会員): 4,000円
 (非会員) 6,000円

○懇親会費
 一般: 8,000円, 学生: 4,000円

世話人: 岡元孝二
 九州工業大学大学院
 情報工学研究院
 生命情報工学研究系
 連絡先: 千820-8502
 福岡県飯塚市川津680-4
 TEL 0948-29-7810
 Email: jps46@life.kyutech.ac.jp

ポスター

発表申込方法：下記HPより入力フォームをダウンロードし、E-mailあるいは郵便にて送付して下さい。

受諾通知：9月中旬にE-mailにて通知

参加登録料：

事前登録（8月1日（土）～10月23日（金）まで）

一般（プロシーディング含む）：

（主催・共催学会員）6,000円，（非会員）10,000円

学生（プロシーディングなし）：

（主催・共催学会員）3,000円，（非会員）5,000円

当日登録

一般（プロシーディング含む）：

（主催・共催学会員）8,000円，（非会員）12,000円

学生（プロシーディングなし）：

（主催・共催学会員）4,000円，（非会員）6,000円



北九州国際会議場



JR小倉駅



小倉城

懇親会：11月5日（木），北九州国際会議場

会費：一般8,000円，学生4,000円

（当日参加も受け付けますが，なるべく事前

参加登録時に下記HPよりお申し込み下さい）

討論会世話人：岡元孝二

（九州工業大学大学院情報工学研究院）

問合・連絡先：

〒820-8502

福岡県飯塚市川津680-4

九州工業大学大学院情報工学研究院

生命情報工学研究系内

第46回ペプチド討論会実行委員会事務局

担当：坂本寛，園木ゆか（事務）

TEL：0948-29-7815 or 7830

FAX：0948-29-7801

E-mail：jps46@life.kyutech.ac.jp

ホームページ：http://www.life.kyutech.ac.jp/~jps46/

（11月7日（土）市民フォーラム，北九州国際会議場）

第5回国際ペプチドシンポジウム（5th IPS）

開催のお知らせ

第5回国際ペプチドシンポジウム（5th International Peptide Symposium）は，木曾良明先生（京都薬科大学），藤井信孝先生（京都大学）のお世話により，第47回ペプチド討論会との合同で開催されます。皆様の積極的なご参加をお待ちしています。なおOrganizing Committeeのメンバー，講演題目等は下記のホームページをご参照下さい。

第5回国際ペプチドシンポジウム（5th IPS）

開催日時：2010年12月4日（土）～9日（木）

場所：国立京都国際会館（京都市左京区）

ホームページ：http://www.5ips.jp

E-mail：info@5ips.jp

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-8686 箕面市稲4-1-2

（株）千里インターナショナル内

編集委員

野水 基義（担当理事）

（東京薬科大学薬学部）

TEL・FAX 042-676-5662

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

坂本 寛（九州工業大学大学院情報工学研究院）

TEL 0948-29-7815, FAX 0948-29-7801

e-mail: sakakan@bio.kyutech.ac.jp

玉村 啓和（東京医科歯科大学生体材料工学研究所）

TEL 03-5280-8036, FAX 03-5280-8039

e-mail: tamamura.mr@tmd.ac.jp

松島 綾美（九州大学大学院理学研究院）

TEL 092-642-4353, FAX 092-642-2607

e-mail: ayami@chem.kyushu-univ.jp

北條 裕信（東海大学工学部）

TEL 0463-58-1211（代），FAX 0463-50-2075

e-mail: hojo@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp

（本号編集担当：北條 裕信）