



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.75

2010 年 1 月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

新年のご挨拶

新年あけましておめでとうございます。年頭に当たりご挨拶を申し上げます。

振り返ってみますと、昨年は様々な出来事が起こりました。年初からのリーマンショックを端緒とする世界的な経済の大混乱、春の新型インフルエンザ騒ぎ、夏の衆院選での自民党の大敗と民主党中心の連立政権の誕生、秋の事業仕分けとショッキングな話題に事欠かない1年でした。

中でも、事業仕分けは、大学を始めとする教育・研究機関にリーマンショック並の衝撃をもたらしました。大学院教育支援や若手研究者育成プログラム、学術の振興を目的とした様々な国家プロジェクトが取り上げられ、ワンフレーズのやりとりの中で次々に切り捨てられました。啞然として見ていたのは私だけではなかったと思います。しかも、もっとショックだったことは、大多数の国民がこの事業仕分けのやり方や縮減を支持したことであります。

我が国では今、ただでさえ科学・技術分野から若い人材が離れる傾向にあり、今回の事業仕分けでの博士研究員等に対する発言は、学術研究に取り組もうとする若者をますます減少させ、我が国の学術振興に取って極めて大きなダメージを与えたのではないかと恐れております。例え縮減の結論が修正されたとしても、今回の事業仕分けは若者の進路選択に大きな影響を与えたのではないかと危惧しております。日本発の論文数はすでに漸減状態となっているのです。

我が国は先進国の中で科学や技術の発展に関心をもつ大人の比率がもっとも低いといわれていますが、市民の皆さんに、もっと科学あるいは研究というものを知ってもらう必要があります。資源の乏しい我が国が生きていくには、知恵と技をおいてなく、無駄として切り捨てられそうになっている予算が、実は知や技を高めるための必要経費であると分かってもらう必要があります。教育者や科学者、技術者は黙々と教育に研究にいそむことが美德とされてきました。それが美德であることは違いないのですが、会員の皆さん一人一人がもうひと踏ん張りして、研究や教育について社会に発言する努力をされてみてはいかがでしょうか。

学生会員、正会員の誰もがすぐにできることがあります。それは、研究をしたいと思った切っ掛けや、今している研究の面白さ、研究を通して実現したい夢な



相本 三郎

どについて、皆さんの回りの人に話すことです。母親や彼女、あるいは彼氏に皆さんの研究について説明し、「面白い！頑張って！」と言わせてみませんか。500人の会員の皆さんがほんの数人に説明するだけでも千人以上の方々へのメッセージになります。それはペプチド学会市民フォーラムの優に10年分の効果です。

説明をする、語るという作業の中で、説明をする自分自身も気がつかなかったことが見えてくるかも知れません。自分の論理は完全ではない、自信がないと躊躇する必要はありません。それを説明しようとする過程から、論理は磨かれ、新たな創造につながるかも知れません。研究に携わる人々が、身近にいる人たちに研究について語り始めるなら、研究者、さらに研究という営みに対する世間の理解はきっと改善すると思います。

最後に、仕分け人が何と言おうと、大学院生、博士研究員の皆さん、あなた達こそ日本を支えてくれる人材であり、国の宝であります。自信をもって研究に励んでいただきたいと思います。本年、第5回国際ペプチドシンポジウムが京都で開催されます。是非とも持てる力を振り絞ってすばらしい成果を発表していただきたいと思います。

会員の皆様方のご健康とご研究の益々の発展を祈念し、新年のご挨拶とさせていただきます。

あいもと さぶろう
大阪大学蛋白質研究所 蛋白質有機化学研究室
aimoto@protein.osaka-u.ac.jp

平成 21 年度ペプチド学会賞を受賞して

このたび、平成 21 年度ペプチド学会賞を受賞し、大変光栄に思っています。アミノ酸とペプチドの化学(科学)に魅せられて、47 年間にわたって続けてきた研究成果が評価されたものと素直に喜んでおります。

筆者がこの分野に足を踏み入れたのは、1963 年に金沢大学理化学部の小竹宏志先生の研究室で卒業研究を行い、ペプチド合成に携わったことがきっかけでした。卒業研究と修士課程での研究テーマは、環状ペプチドラクトンエタマイシンの合成でしたが、保護基として Z 基、縮合剤として DCCD が利用できるのみで、縮合にはその他に活性エステル法や MA 法を利用する程度でした。



若宮 建昭

ここではエタマイシンの合成ができないのは当然で、ペプチド合成の練習実験で終わったようなものでした。しかし、この間にペプチド化学への興味が湧き、修士課程修了後に小竹先生のお勧めで、大阪大学理学部の大学院博士課程に進学いたしました。大阪大学では、金子武夫先生の研究室に入れていただき、芝哲夫先生のもとで新しいペプチド化学を学ぶことになりました。

以上のように筆者の研究生生活はスタートしたわけですが、当初の化学中心であったペプチド研究も、近年は化学、薬学、医学分野にわたるペプチド科学へと発展してきました。そのような変遷の中で私の研究を振り返って見ますと、一貫して“特異な構造を有するアミノ酸あるいはペプチドの有機化学およびケミカルバイオロジーを指向した研究”に携わってきたように思います。この紙面では、それらの中から受賞講演で取り上げたテーマについてご紹介いたします。

1. 生物活性ペプチドの有機化学

1-1) ツベラクチノマイシンとカプレオマイシン

大阪大学で博士論文のテーマとして与えられましたのは、おりしも東洋醸造（現・旭化成）の研究グループにより発見された、新規抗結核性ペプチドの構造決定でありました。ツベラクチノマイシン（Tum）と命名された化合物には、A、B、N、O という4種の同族体が存在し、私は主成分の Tum A の構造決定に主眼を置き、化学的な構造修飾や分解反応で解析を進めました。約4年を費やしてようやく Tum A の推定構造式を提出でき、学位論文にまとめました。その後、東洋醸造研究所の野田俊治氏により Tum O・2HBr・HCl の単結晶が作製され、その X 線構造解析が関西学院大学理学部中津和三先生のグループによって行われました¹⁾。この結果をもとに、化学的手法による Tum A、B、N、O の解析データを比較検討し、Tum 群の構造が確定しました（図1）¹⁾。4種の Tum は、それぞれ6残基のアミノ酸から構成される小分子ですが、全体としては Ser 以外がいわゆる特異なアミノ酸でした。とりわけ、 γ -ヒドロキシ- β -リジン (γ -Hy- β -Lys) と環状グアニジノアミノ酸ツベラクチジン (Tbd) は、初めて単離

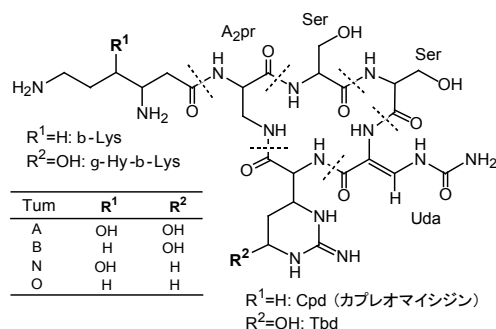


図1 ツベラクチノマイシンの構造

あるいは構造決定に成功した新アミノ酸であります^{2,3)}。また、3-ウレイドデヒドロアラニン (Uda) は直接単離できないアミノ酸でしたが、X 線構造解析でその構造を明確にすることができました。

Tum の構造決定を進めているうちに、Tum B が当時すでに結核の治療に臨床薬として用いられていたバイオマイシン (VM) と同一化合物であることが分かりました。VM の構造研究は、1964 年ごろから国内外の4グループによって進められていましたが、互いの結果に惑わされながら次々と異なる構造式が提出され、非常に混沌とした状況にありました。筆者らは、そのような周りの雑音に惑わされることなく、結果的に VM の構造を世界で最初に決定するという幸運に恵まれました⁴⁾。その後、Tum の全合成や半合成をもとにした構造活性相関の研究⁵⁾、¹H NMR によるコンホメーション解析⁶⁾なども行いました。

当時、やはり結核の治療薬として用いられていたカプレオマイシン (Cpm) の構造も未決定でありました。筆者らは、Tum での知見をもとに容易に構造研究を進めることができ、図2aのように Ser 残基の一部が α, β -ジアミノプロピオン酸 (A₂pr) に置き換わっただけに過ぎないと簡単に結論を出しました。ところが、¹H NMR スペクトルをよくよく調べてみると、分子中に存在する2残基の A₂pr に由来するプロトンの化学シフト値がそれでは説明できず、図2bのように考えなければいけないことに気が付きました⁷⁾。化学的手法でも後者の構造式の正しいことを確認し、幸いにも誤った結果を発表せずにすみしました。この時、つくづく思い込みは怖いと感じました。なお、Tum と Cpm の研究では、豊島正君（現・株）ペプチド研究所社長）および野本信也君（現・筑波大学准教授）が研究の推進力となってくれました。

1-2) ランチオニンペプチド

Tum の研究が一段落した1976年に、芝先生の親友でありました米国 NIH の Gross 博士の研究室に留学し、ナイシン⁸⁾と命名されたランチオニンペプチドに出会いました（図3）。ナイシンは、メゾランチオニ

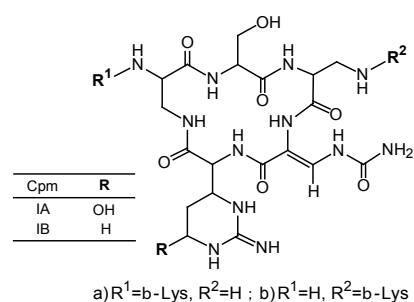


図2 カプレオマイシンの構造

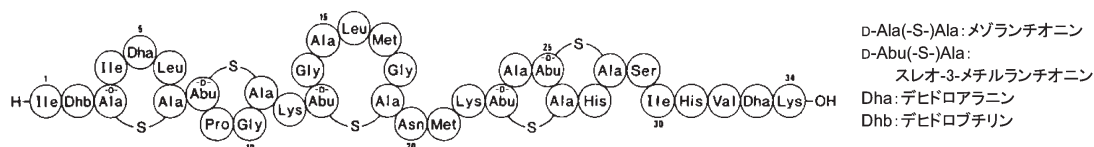


図3 ナイシンの構造

ンとスレオ-3-メチルランチオニンという特異なアミノ酸を計5残基含んでいて、これらのアミノ酸に起因する環状構造が5種存在するという、他に例を見ない極めて複雑な構造をしています。さらに、デヒドロアラニン (Dha) やデヒドロブチリン (Dhb) などのデヒドロアミノ酸が計3残基含まれていて、その複雑さに輪をかけていました。

Gross 研ではナイシンの全合成に取り組むことになりましたが、事情があって2年目に研究室が変わったために、ナイシンの全合成とは縁が切れたものと思っていました。ところが、帰国してしばらくすると Gross 博士がドイツで交通事故死するという訃報に接し、芝先生は親友の果たせなかった夢をわれわれの手で実現しようと決意され、筆者が改めてナイシン全合成の旗を振ることになりました。いざ再開するとなると合成上の問題点は多々ありましたが、ランチオン残基の調製とそれを含む環状ペプチドの構築法、およびデヒドロアミノ酸残基のペプチド鎖への導入法という難題を解決したあと、分子を5種のセグメントに分けて、それらを繋ぎ合わせる計画を立てました(図4)。一つのセグメントを作るのに数年かかった場合もあり、10数名の学生が約10年かけてようやく全合成が完成しました⁹⁾。アンカーは、当時博士課程の深瀬浩一君(現・大阪大学教授)でしたが、その劇的なゴールは今も語り草となっています。

ナイシンの合成を進めている途上に、富士レリオ研究所で見つけられたアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤の構造決定を依頼されました(1984年)。アンコベニンと命名したペプチドが、新たなランチオンペプチドであることが分かり、ちょっと驚きました。その構造は、ナイシンよりアミノ酸残基数ははるかに少ないのですが、3種のスルフィド環が3重に連結した(重複した)特異なものであり、デヒドロアラニンも1残基含まれていました(図5, 6a)¹⁰⁾。

アンコベニンの構造を決定した余韻がまだ残っている頃に、ブリストルマイヤーズ東京研究所から、抗単純ヘルペスウイルス剤の構造決定を依頼されました(1987

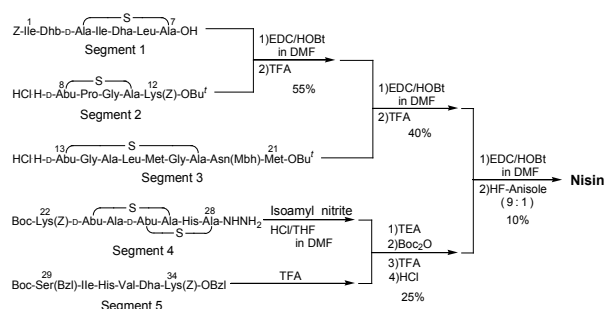


図4 ナイシン全合成の経路

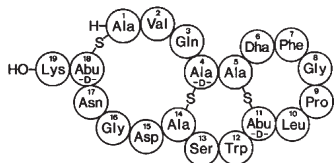


図5 アンコベニンの構造

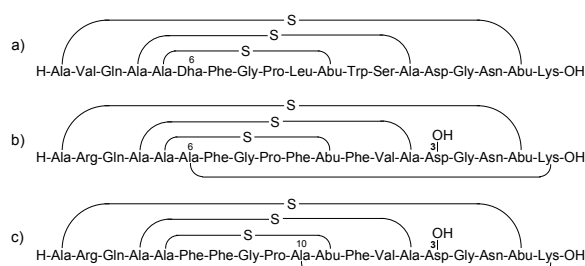


図6 (a) アンコベニンと(b)ランチオペプチンの構造、および(c) Kessler らによる Ro 09-0198 の推定構造

年)。この化合物には、メゾランチオニンが含まれていることは分かっており、次々ランチオンペプチドと出会うことに不思議な研究の縁を感じました。ランチオペプチンと命名した新規化合物は、3種のスルフィド環に加えて、リジノアラニンに由来する新たな環状部を有しており、構造的にはまた一段と複雑でありました(図6b)¹¹⁾。このように偶然の機会から明らかにしたアンコベニンとランチオペプチンの構造を比較してみると、構成アミノ酸には違いがあるものの、3種のスルフィド環の様式は全く同じであり、前者のデヒドロアラニンとリジンが後者ではリジノアラニンになっているという両者の関連に大変驚かされました。

2度あることは3度あると言いますが、その3度目は赤堀シンポジウムでおなじみの Kessler 教授により構造決定された免疫増強物質 Ro 09-0198(図6c)¹²⁾との関わりでありました。この新規なランチオンペプチドの構造は、ランチオペプチンと比較するとリジノアラニンの位置だけが異なっていました。これは明らかに間違っていると直感した筆者は、ただちに Ro 09-0198 を入手して HPLC や ¹H NMR の比較から、両者が同一物質であることを確かめ、Kessler 教授の提出した構造式は改められるべきであることを指摘しました¹³⁾。

2. ケミカルバイオロジーを指向したペプチド研究 2-1) リン酸化ペプチド

リン酸化タンパク質の機能を分子レベルで解明するために、ホスホアミノ酸を含む部分ペプチドの合成は極めて重要です。1990年に東京大学医学研究所の金ヶ崎士朗教授から、EGF 受容体中のホスホスレオニン (PThr) を含む部分ペプチド H-CysIleValArgLysArg PThrLeuArgArgLeuLeu-OH [Cys-EGFR(649-659)] の合成を依頼されました。当時、リン酸化ペプチドの合成法としては、ペプチド鎖に導入したヒドロキシアミノ酸の水酸基を酵素的にリン酸化するポストリン酸化法が主流であり、ホスホアミノ酸を直接利用するプレリン酸化法はまだ実用的ではありませんでした。将来のことを考えるとプレリン酸化による合成法が望ましいことは当然なのですが、Fmoc 法を適用する場合には脱 Fmoc に用いる塩基性条件下で、ホスホアミノ酸のうちホスホセリン (PSer) と PThr のリン酸エステルは、容易にβ-脱離を生ずることが常識となっていました。

したがって、我々はあまり深く考えることなくリン酸をベンジル基で保護し、Boc ストラテジーによる液相法で目的のペプチドを合成いたしました¹⁴⁾。その結

果、ホスホアミノ酸を通常のアミノ酸と同様に利用できること、リン酸の保護に用いたベンジル基が TFA により段階的ではあるものの比較的容易に除去されること、また、液相法では技術と時間を要することなどが分かりました。しかし、“リン酸エステルの片方が遊離になってもペプチド縮合に影響を与えない”という、今後につながる重要な知見も得ることができました¹⁴⁾。

その後 1992 年に、京都大学医学部の永田和宏教授から HSP27 関連のリン酸化ペプチド 3 種の合成を依頼されました。この偶然で突然の依頼を速やかに遂行するには、固相法の適用ともう少し酸に安定なリン酸保護基を用いるの必要性を感じました。そこで、まずリン酸保護基の検討を行い、アスパラギン酸やグルタミン酸の側鎖カルボキシル基の保護に用いられていたシクロヘキシル基やシクロペンチル基が有用であることを見出しました (図 7a, b)¹⁵⁾。実際に、*N*^α-Boc-O-(ジシクロヘキシルオキシホスホノ)セリンおよび *N*^α-Boc-O-(ジシクロペンチルオキシホスホノ)セリンを用いて HSP27 (79-89)-CysNH₂ の固相合成を試みました。その結果、MBHA 樹脂上で標準的なプロトコルにより目的のペプチド H-LeuArgSerPro**P**SerTrpGluProPheArgCys-NH₂ をそれぞれ収率 24%¹⁶⁾と 29%¹⁷⁾ではありますが、きわめて純度良く得ることに成功し、Boc ストラテジーによるリン酸化ペプチドの固相合成法を確立することができました。

こうなると、Fmoc ストラテジーでは合成できないという常識は真実かどうかを確かめたくになります。そこで、簡単なリン酸保護ジペプチドを用いて、Fmoc 基の除去に用いるピペリジン中でのリン酸エステルの安定性を調べると、多くのエステルが β-脱離よりはむしろ保護基の一方が除去され、しかもその状態で安定に存在するという常識を覆すような結果が得られました¹⁸⁾。ここで、前述の“リン酸エステルの片方が遊離になってもペプチド縮合に影響を与えない”という知見を生かして、PSer と PThr のリン酸部分をモノベンジルエステルとした Fmoc 誘導体 (図 7c) を調製しました¹⁹⁾。その有用性を確かめるために Fmoc-Ser [PO (OBzl) (OH)]-OH を用いて、Rink amide 樹脂上で HATU/DIEA 法により HSP27 (10-20)-CysNH₂ (H-LeuLeuArgSerPro**P**SerTrpGluProPheArgCys-NH₂) を合成しました。この収率は 49% と極めて高く、粗生成物の純度も Boc ストラテジーの場合よりはるかに良いことが分かりました¹⁷⁾。

以上のように、従来の常識を覆して Fmoc ストラテジーによる固相法で、誰でも容易にリン酸化ペプチドを合成できる道が拓けました。なお、筆者らの開発し

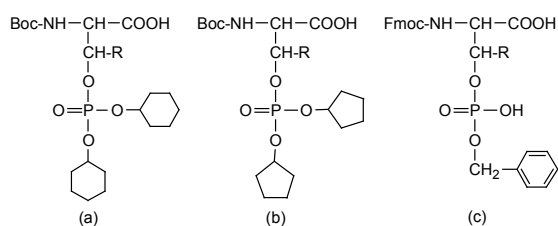


図7 Boc および Fmoc 用ホスホアミノ酸誘導体 (R = H または CH₃)

たホスホアミノ酸誘導体は、現在 Novabiochem 社あるいは渡辺化学工業から販売されています。

2-2) クモ毒ペプチド

1986 年に東京大学薬学部の中嶋暉躬教授がパプアニューギニア産のジョロウグモから単離・構造決定をされた毒成分 NSTX-3 (図 8a)²⁰⁾、また摂南大学薬学部の吉岡正則教授が 1990 年に日本産ジョロウグモの一種から単離・構造決定をされた毒成分クラバミン (図 8b)²¹⁾ の分子中に、プトレアニンと命名された *N*-(4-アミノブチル)-β-アラニン (四角で囲んだ部分) が含まれていました。このアミノ酸は、以前に牛脳から単離された特異なアミノ酸で、芝先生らにより構造決定と合成がなされていたことに縁を感じて²²⁾、これら 2 種のクモ毒を合成いたしました^{23, 24)}。

1994 年に筆者が近畿大学に移ったのを機に、当時サントリー生物有機科学研究所の所長になられていた中嶋先生とクモ毒の共同研究を再開し、マダガスカル産のジョロウグモ毒 NPTX-594 の合成による構造決定を行いました (2000 年) (図 9a)²⁵⁾。

グルタミン酸は、哺乳動物の脳内における神経情報伝達物質として、また脊椎動物や昆虫の神経と筋との接合部における神経伝達物質として極めて重要な役割を担っています。クモ毒が、グルタミン酸の受容体 (GluR) に対する強力な阻害剤であることは以前から知られていましたが、両者の相互作用については未解決の問題でありました。クモ毒のケミカルバイオロジーに興味を持った筆者は、クモ毒と GluR との相互作用解明の手法の一つとして、両者の結合状態を可視化することを計画しました。そのためには、十分な活性を有する蛍光標識クモ毒類縁体の創製と GluR の入手という二つの問題を解決する必要がありました。まず、NPTX-594 の構造活性相関の研究から、分子中右端の Lys 残基を *N*-(4-アミノブチル)グリシン (Abg) に置換した類縁体 (図 9b) が、天然物の 3 倍の活性を示すことを見出しました²⁶⁾。この類縁体の分子左端の芳香族アシル基を種々の蛍光標識アシル基で置換したもののの中から、7-ヒドロキシクマリン-4-アセチル

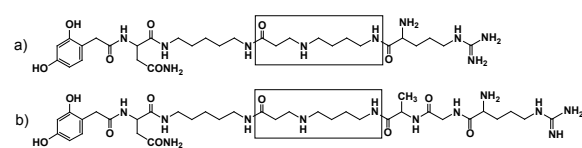


図8 a) NSTX-3 と b) クラバミンの構造

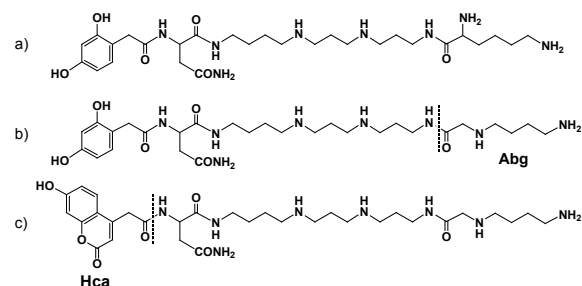


図9 a) NPTX-594, b) NPTX-594 の Abg 類縁体, および c) 蛍光標識類縁体

(Hca) 基を導入した化合物 (図 9c) が天然物と同程度の活性を示すことが分かり、問題の一つを解決することができました²⁷⁾。

一方、膜タンパク質の一種 GluR を純粋なタンパク質として得ることができませんので、GluR 遺伝子を組み込んだ培養細胞を調製し、その細胞中に発現する GluR を利用して、クモ毒との相互作用を解析しなければなりません。クモ毒が阻害する GluR には GluR1 と GluR2(Q) の 2 種が存在し、それらの遺伝子を組み込んだ HEK-293 細胞の調製条件を種々検討しました。幸いにも、これらのタンパク質を選択的に発現する細胞の調製に成功し、第 2 の問題も解決することができました²⁸⁾。この結果、GluR 発現細胞を用いて電気生理学的に NPTX-594 およびその蛍光標識類縁体の活性を測定することに成功し²⁹⁾、ここに長年の課題解決に向けてようやく第一歩を踏み出すことができました。今後、細胞中に発現した GluR が蛍光標識化 NPTX-594 類縁体と強く結合することを利用した GluR の可視化 (染色)、GluR と蛍光標識体との複合体単離の試みとその構造解析などの重要な課題が残っています。これらを解決することにより、クモ毒の GluR 阻害機構が明らかになり、グルタミン酸による神経情報伝達機構の一端を知る手がかりになるものと期待しています。

最後になりますが、このたびの受賞に当たり、博士課程に進学後から今日に至るまでかわらぬご薫陶を賜りました芝哲夫先生を始めとして、金沢大学での 3 年間、大阪大学での 28 年間、そして近畿大学での 16 年間にご指導をいただきました諸先生方、共同研究者の方々、また厳しい指導に耐えて研究を実践してくれた学生諸子に、心よりお礼申し上げます。振り返ってみますと、長年の研究生活の中でも特に研究費の獲得が困難な私学にあって、山口仁宏准教授の協力の下にできるだけ競争にならない研究テーマを選び、学生とともに国内外のペプチド討論会に積極的に参加・発表して刺激を受けてきました。さらに、それを糧にしてこつこつ続けてきた研究業績が評価されての受賞であったことを特にうれしく思っております。

また、私は来年 3 月で近畿大学を退職いたしますが、その最後の年に本賞を与えられましたのは、これまで日本ペプチド学会に筆者なりの貢献をしてきたことへの褒美かなとも思っている次第です。

参考文献

- 1) H. Yoshioka, T. Aoki, H. Goko, K. Nakatsu, T. Noda, H. Sakakibara, T. Take, A. Nagata, J. Abe, T. Wakamiya, T. Shiba, T. Kaneko. *Tetrahedron Lett.*, **1971**, 2043-2046.
- 2) a) T. Wakamiya, T. Shiba, T. Kaneko. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **45**, 3668-3672 (1972); b) T. Wakamiya, T. Teshima, I. Kubota, T. Shiba, T. Kaneko. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **47**, 2292-2296 (1974).
- 3) T. Wakamiya, T. Shiba, and T. Kaneko, H. Sakakibara, T. Noda, T. Take. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 949-954 (1973).
- 4) T. Noda, T. Take, A. Nagata, T. Wakamiya, T. Shiba. *J. Antibiot.*, **25**, 427-428 (1972).
- 5) T. Wakamiya, T. Teshima, H. Sakakibara, K. Fukukawa, T. Shiba. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 1984-1989 (1977).

- 6) T. Wakamiya, T. Shiba. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 2502-2508 (1975).
- 7) a) T. Shiba, S. Nomoto, T. Wakamiya. *Experientia*, **32**, 1109-1110 (1976); b) T. Shiba, S. Nomoto, T. Teshima, T. Wakamiya. *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 3907-3910.
- 8) E. Gross, J. L. Morell, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2919-2920 (1970); **93**, 4634-4635 (1971).
- 9) K. Fukase, M. Kitazawa, A. Sano, K. Shimbo, H. Fujita, S. Horimoto, T. Wakamiya, T. Shiba. *Tetrahedron Lett.*, **29**, 795-798 (1988).
- 10) a) T. Wakamiya, Y. Ueki, T. Shiba, Y. Kido, Y. Motoki. *Tetrahedron Lett.*, **26**, 665-668 (1985); b) idem, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 1032-1038 (1990).
- 11) K. Fukase, T. Wakamiya, N. Naruse, M. Konishi, T. Shiba. *Peptide Chemistry 1988*, ed by M. Ueki, Protein Research Foundation (1989), pp. 221-226.
- 12) H. Kessler, S. Steuernagel, D. Gillissen, T. Kamiyama, *Helv. Chim. Acta*, **70**, 726-741 (1987).
- 13) T. Wakamiya, K. Fukase, N. Naruse, M. Konishi, T. Shiba. *Tetrahedron Lett.*, **29**, 4771-4772 (1988).
- 14) T. Wakamiya, M. Kawahara, S. Kusumoto, S. Imajoh-Ohmi, S. Kanegasaki. *Peptide Chemistry 1991*, ed by A. Suzuki, Protein Research Foundation (1992), pp. 383-388.
- 15) a) T. Wakamiya, K. Saruta, S. Kusumoto, S. Aimoto, K. Yoshizawa-Kumagaye, K. Nakajima. *Peptide Chemistry 1993*, ed by Y. Okada, Protein Research Foundation (1994), pp. 109-112; b) T. Wakamiya, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 2699-2703 (1995); c) T. Wakamiya, R. Togashi, K. Saruta, S. Kusumoto, S. Aimoto, K. Yoshizawa-Kumagaye, K. Nakajima. *Peptide Chemistry 1995*, ed by N. Nishi, Protein Research Foundation (1996), pp. 17-20.
- 16) T. Wakamiya, K. Saruta, S. Kusumoto, S. Aimoto, K. Yoshizawa-Kumagaye, K. Nakajima. *Peptide Chemistry 1993*, ed by Y. Okada, Protein Research Foundation (1994), pp. 109-112.
- 17) T. Wakamiya, R. Togashi, T. Nishida, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto, S. Aimoto, K. Yoshizawa-Kumagaye, K. Nakajima, K. Nagata. *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 135-145 (1997).
- 18) T. Wakamiya, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto. *Peptide Chemistry 1994*, ed by Y. Ohno, Protein Research Foundation, Osaka (1995), pp. 5-8.
- 19) T. Wakamiya, T. Nishida, R. Togashi, K. Saruta, J. Yasuoka, S. Kusumoto. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 465-468 (1996).
- 20) Y. Aramaki, T. Yasuhara, T. Higashijima, M. Yoshioka, A. Miwa, N. Kawai, T. Nakajima, *Proc. Japan Acad.*, **62(B)**, 359-362 (1986).
- 21) M. Yoshioka, N. Narai, T. Teshima, T. Matsumoto, T. Wakamiya, T. Shiba, N. Tokoro, T. Okauchi, Y. Kono. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 3005-3008 (1992).
- 22) T. Shiba, I. Kubota, T. Kaneko. *Tetrahedron*, **26**, 4307-4318 (1970).
- 23) a) T. Teshima, T. Wakamiya, Y. Aramaki, T. Nakajima, N. Kawai, T. Shiba. *Tetrahedron Lett.*, **28**, 3509-3510 (1987); b) T. Teshima, T. Matsumoto, T. Wakamiya, T. Shiba, Y. Aramaki, T. Nakajima, N. Kawai. *Tetrahedron*, **47**, 3305-3312 (1991).

- 24) T. Teshima, T. Matsumoto, M. Miyagawa, T. Wakamiya, T. Shiba, N. Narai, M. Yoshioka. *Tetrahedron*, **46**, 3819–3822 (1990).
- 25) T. Wakamiya, A. Yamamoto, K. Kawaguchi, T. Kinoshita, Y. Yamaguchi, Y. Itagaki, H. Naoki, T. Nakajima. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 1743–1749 (2001).
- 26) T. Wakamiya, T. Kinoshita, Y. Hattori, Y. Yamaguchi, H. Naoki, Corzo Gerardo T. Nakajima. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77**, 331–340 (2004).
- 27) T. Nishimaru, M. Sano, Y. Yamaguchi, T. Wakamiya. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 57–63 (2009).
- 28) T. Nishimaru, R. Moriyama, T. Wada, S. Yoshida, K. Shimamoto, M. Nishizawa, S. Ito, Y. Yamaguchi, T. Wakamiya. *Peptide Science 2008*, ed by M. Nomizu, Jpn. Pep. Soc. (2009), pp. 401–404.
- 29) T. Nishimaru, R. Moriyama, T. Wada, S. Yoshida, K. Shimamoto, M. Nishizawa, S. Ito, Y. Yamaguchi, T. Wakamiya. *Peptide Science 2009*, ed by K. Okamoto, Jpn. Pep. Soc. (2010), in press.

わかみや たてあき
近畿大学理工学部
wakamiya@chem.kindai.ac.jp

平成 21 年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

この度は、日本ペプチド学会奨励賞という名誉ある賞をいただき、大変光栄に感じております。学会長の相本三郎先生をはじめ、理事、幹事、評議員、選考委員の諸先生方に改めて厚く御礼申し上げます。私は、学部4年時に長崎大学工学部工業化学科（現、応用化学科）に新設された青柳東彦研究室の第一期生として配属され、ペプチド化学に関する研究を開始しました。長崎大学工学研究科工業化学専攻修了後は、東京工業大学生命理工学研究科博士課程に進学し、三原久和先生のご指導のもと学位を取得しました。学位取得後は、スイス連邦工科大学（ETH Zurich）Donald Hilvert 研究室における博士研究員を経験し、京都大学エネルギー理工学研究所、東京大学生産技術研究所勤務を経て、現在は東北大学多元物質科学研究所に助教として研究ならびに教育に従事しております。本稿では、受賞の対象となり、学生時代からの研究テーマの中心でもある「非天然機能団を複合化したポリペプチドならびにタンパク質の設計と機能制御」について、受賞講演では紹介できなかった部分も含め、概説させていただきます。



坂本 清志

1. 2 α -ヘリックスペプチド-ヘム複合体の設計と合成

生体内において、鉄ポルフィリンは、酸素輸送/貯蔵、電子伝達、触媒反応等、多様かつ重要な機能を担っていることが知られています。天然では、ポリペプチド高次構造によって鉄ポルフィリンおよび近傍官能基の空間配置が決定され、多岐にわたるヘム機能中で特

定機能のみが高選択的に発現されています。ここで紹介する研究では、デノボデザインしたペプチド立体構造と非天然機能団としての鉄メソポルフィリン（ヘム）から構成されるミニヘムタンパク質の構築を目指しました。デノボデザインによって構築した比較的シンプルな配列を持つポリペプチドを用いることで、ヘムに対する高親和性やヘム機能制御に最低限必要となるペプチド高次構造要素を効率的に見いだせると考えたためです。具体的には、ヘムに対する軸配位子として His を持つ両親媒性 2 α -ヘリックスペプチドを素構造として選択し、その近傍のアミノ酸残基 (X: His $\pm$ 4, Y: His $\pm$ 3) を Phe, Leu, Ile, Val, Ala 等の疎水性アミノ酸で系統的に置換しました (Fig. 1)¹⁾。水中におけるヘムとペプチド間の相互作用を詳細に調べた結果、結合定数や還元電位とヘム結合部位の疎水性度に相関が見られました。また、水中での効率的な複合体形成には、ペプチド-ヘム間の疎水性相互作用に加えて、アミノ酸側鎖とヘム間のファンデルワールスコンタクトや芳香族性 Phe 側鎖とヘムとの edge-to-face 相互作用が大きく寄与することも明らかとなりました。また、興味深いことに、 β -ストランド形成傾向の高い Ile を用いて設計したペプチドは、単独の状態では β -シート構造を形成しましたが、ヘムとの複合体形成下においては、 α -ヘリックス構造をとることがわかりました^{2,3)}。この結果は、ヘムとの複合体形成を引き金として、ポリペプチド高次構造転移が生じることを見いだした初めての例と考えています。以上の 2 α -ヘリックスペプチド-ヘム複合体を用いて得られた知見を活用することで、デザインしたペプチド立体構造によるヘムの酸化触媒活性の制御にも成功しています⁴⁻⁷⁾。今後、より系統的なアミノ酸置換を施すことで、非天然環境下で高活性を発現可能な人工ミニヘムタンパク質への発展が期待されます。将来的には、非天然機能団を含むデザインペプチドを電極等の表面に単層固定化することによって、電子材料や化学センサーといった機能性分子素子への応用が可能であると考えています^{8,9)}。

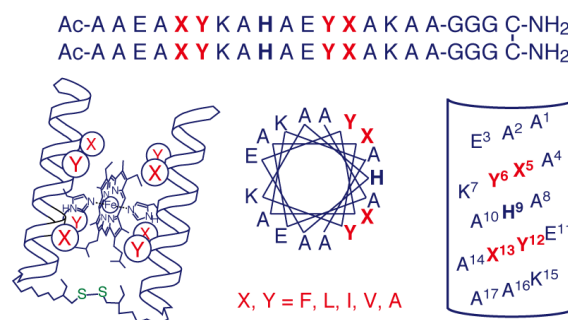


Fig. 1 ヘム複合化 2 α -ヘリックスペプチドのデノボ設計

2. 非天然機能性団を複合化した α -ヘリックスペプチドライブラリの設計と合成

コンビナトリアル化学において、多数の化合物群（ライブラリ）の中から効率的かつ迅速に機能分子を見いだすためには、ライブラリを構成する化合物の分子設計が重要となります。ここで紹介する研究で

は、 α -ヘリックス素構造を基体とし、非天然機能団を複合化した機能性ペプチドライブラリのデノボ設計ならびにスプリット合成を目的としました (Fig. 2)。さらに、標的分子として Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) を用いたスクリーニングを行い、分子認識能を有する機能性 α -ヘリックスペプチドの獲得を試みました¹⁰⁾。ライブラリに用いる基本構造としては、3つの Glu-Arg ペアで α -ヘリックス構造を安定化した 17 残基ペプチド配列を利用しています。標的分子である FAD のアデノシンあるいはリボitol 部位を認識する非天然機能団として、*p*-Boronobenzoic acid (BB) を Lys9 側鎖アミノ基上に導入してあります。さらに、ペプチド配列中の 1, 4, 5 位にあたる各 X, Y, Z 残基を Cys を除く 19 種のアミノ酸を用いてランダム化することで、最適な分子認識部位の構築を試みました。蛍光顕微鏡を用いて FAD 結合ペプチドをスクリーニングした結果、Y および Z 残基には、Trp あるいは Tyr 等の芳香族アミノ酸が多く認められました。さらに、スクリーニングによって得られた数種の配列を固相合成しより詳細な解析を行った結果、得られたペプチドは溶液中で α -ヘリックス構造を形成し、効率的に FAD 分子を結合することが明らかとなりました ($K_a = 10^4 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}$)。以上の結果は、 α -ヘリックス素構造および人工機能団を利用したライブラリ構築が、テーラーメイドな機能分子創製に有効であることを示唆しています。また、上記のストラテジーを用いて得られたペプチドや合理的にデザインされた機能性ペプチド等を位置特異的に複合化することで、人工の分子認識部位をタンパク質表面上に構築するといった試みにも取り組んでいます¹¹⁻¹⁴⁾。

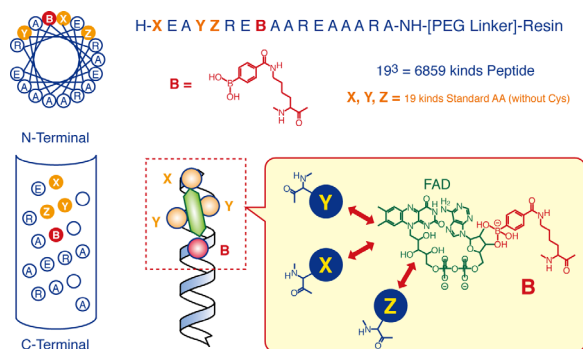


Fig. 2 非天然機能団を複合化した α -ヘリックスペプチドライブラリの設計

3. 非天然機能性団の複合化による外部刺激応答型タンパク質の構築

光照射や pH 変化等の外部刺激や酵素による任意の翻訳後修飾に応じて、その機能や触媒活性をコントロールすることが出来るタンパク質の人工構築は、タンパク質工学やナノバイオテクノロジー分野における重要な研究課題の一つと考えられています。何故なら、そのような外部刺激応答型タンパク質は、細胞機能や生体機能関連材料特性を時空間特異的に制御可能な人工分子スイッチとして応用が期待できるためです。さらに、このような人工タンパク質は、特定の生体物質

を検出するための分子プローブやセンサーとしても発展可能であると思われます。そのような背景を踏まえて、分割型タンパク質と人工の刺激応答部位を組み合わせることで、任意の外部刺激によって自在に活性化可能な機能性タンパク質の開発を目指しています。ここで紹介する一連の実験では、分割型緑色蛍光タンパク質 (Split GFP) をタンパク質側の基体として用い、非天然型光反応性部位や酵素反応応答部位を合理的に複合化することによって、特定の外部刺激添加時や、任意の酵素存在下において蛍光強度の増加を示す GFP 変異体の作製を試みました。

3-1. 疎水性ゲスト化合物の添加に応答する分割型 GFP 変異体の構築

近年のタンパク質工学の発展により、二分割した GFP の再会合を利用したタンパク質間相互作用の解析や特異的な核酸検出システムの構築が可能と成りつつあります。しかしながら、任意の有機小分子を認識して再構成効率と速度が向上する分割型 GFP の報告はこれまでにありませんでした。これらの背景を踏まえた基礎的試みとして、ここで紹介する系では、超分子化学における代表的化合物である β -シクロデキストリン (β CDx) を人工の刺激応答部位として利用し、疎水性ゲスト化合物存在下、より高い蛍光強度を示す分割型 GFP 変異体の構築を行いました (Fig. 3)¹⁵⁾。この実験では、Waldo らによって報告された 214 位分割型 GFP 変異体である GFP OPT をタンパク質側の基体として利用しています。この変異体は、214 個のアミノ酸からなる N 末端断片 (1-214) (GFPN) と 17 残基からなる C 末断片 (214-230) (GFPC) から構成され、両断片を混合することで自発的に再結合とクロムフォア形成が進行します。他の分割型 GFP 変異体と比べて、C 末側ペプチド断片が比較的短鎖であるため、化学合成によって容易かつ位置特異的に非天然機能団を導入することが可能です。この系においては、GFP OPT の C 末断片 (GFPC) の両末端に蛍光色素である 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylate (DC) と β CDx を複合しました (DC-M2- β CDx) (Fig. 3)。設計上、ペプチド鎖に導入したクマリン色素と β CDx とが自己包摂錯体を形成し、GFP N 末断片との相互作用が阻害されるものと予想しました。一方、適切な疎水性分子の添加によって、ペプチド中の分子内ホスト・ゲスト相互作用が解消された場合、GFP N 末断片との再結合およびリフォールディング効率が向上することを期待しました。

緩衝溶液中における紫外可視吸収スペクトル、蛍光スペクトルならびに円二色性スペクトル測定の結果、導入したクマリン機能団と β CDx とが分子内で相互作用することによって、ペプチド DC-M2- β CDx 単独の状態では分子内環状構造を形成していることが判りました。この状態のペプチドに N 末断片である GFPN を加えても、GFP に由来する蛍光の回復は非常に遅く、両断片間の再結合が強く阻害されていることが示唆されました。一方、 β CDx に比較的強く相互作用することが知られている 1-アダマンタノール (1-AdOH) やウルソデオキシコール酸 (UDCA)、ケノデオキシコール酸 (CDCA) 等のコール酸類の存在下において

は、mature GFP に基づく波長 510 nm における蛍光強度の速やかな増加が観測されています。 β CDx に対して小さな結合定数を持つデオキシコル酸 (DC) やメントールを添加しても、分割型 GFP の再構成効率に変化は見られませんでした。さらに、様々なゲスト分子存在下における蛍光強度を比較した場合、ペプチドに対する結合定数が大きなゲスト化合物程強い蛍光が観測されたことから、ペプチドとゲスト分子の結合によって分子内における自己包摂相互作用が弱まり、GFPN との再結合効率やリフォールディングの効率が向上したのと考えられます。以上の結果は、非天然の超分子相互作用を合理的に複合化することで、タンパク質の構造や機能を制御出来ることを示唆しています。

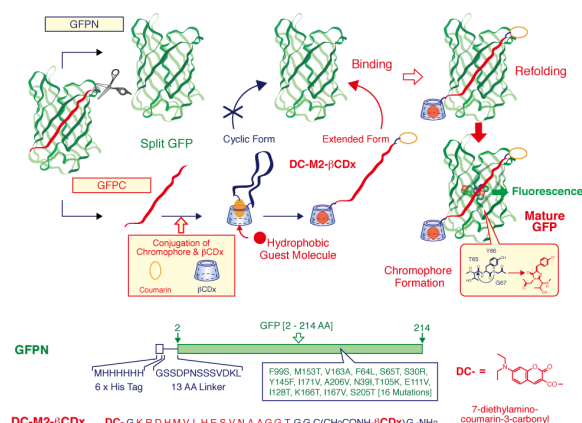


Fig. 3 疎水性ゲスト化合物の添加に応答する分割型 GFP 変異体の設計

3-2. 光照射によって活性化される分割型 GFP 変異体の構築

ある特定波長領域の光照射によってその機能や構造をコントロール出来るケージドタンパク質の開発は、タンパク質フォールディング研究や細胞機能を自在にコントロールする上で重要と考えられます。ここで紹介する研究では、人工の光応答機能団である 7-diethylamino-4-hydroxymethylcoumarin (DECM) と Split GFP を組み合わせることによって、特定波長領域の光照射によって蛍光機能を回復できる GFP 変異体の構築を試みました (Fig. 4)。この実験においても、上記の系で用いた分割型 GFP 変異体 (GFP OPT) を基体として用いています。特定波長の光に応答する分割型 GFP を構築するために、C 末断片ポリペプチド鎖中、222 位の Glu 残基側鎖上に DECM 基をエステル結合によって導入しています (cE-M2)。過去に報告された GFP の三次構造解析からこの Glu222 残基はタンパク質立体構造内部に存在し、GFP のクロモフォア近傍に位置していることが明らかとなっていたため、導入した DECM 基の立体障害によって、C 末断片と N 末断片の再構成を阻害できるものと考えました。一方、特定波長領域の光照射下では、DECM 基の特異的光切断が生じ、両断片間の再結合およびリフォールディング効率が向上することを期待しました。

溶液中における蛍光スペクトル測定の結果、光照射を行っていない cE-M2 と GFPN の再構成反応はほぼ完全に抑制されることが判りました。一方、可視光

(> 400 nm) を照射した場合、cE-M2 上の DECM 基が効率よく切断されると同時に (量子収率, $f = 0.06$), GFP に由来する蛍光強度の速やかな増加が見られました。特定波長領域の光照射によって DECM 基のケージングが解除された結果、GFP 断片間の再結合が可能となり、リフォールディングとクロモフォア形成が迅速に進行したのと考えています。今回得られた結果は、人工的な光反応性基を分割型タンパク質に複合化することで、タンパク質立体構造や機能の制御が可能であることを示唆しています。ここで用いた方法論は、分割型 YFP や CFP 等の蛍光特性の異なる蛍光タンパク質変異体にも応用可能であることが明らかとなっています。将来的には、任意のタンパク質や細胞の多重蛍光標識に発展させる予定です。

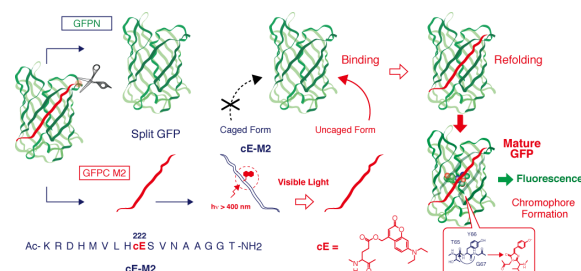


Fig. 4 可視光照射によって活性化される分割型 GFP 変異体の設計

3-3. リン酸化・脱リン酸化反応の検出を指向した分割型 GFP 変異体の構築

生体内におけるタンパク質のリン酸化・脱リン酸化は、細胞内シグナル伝達の主要機構として重要な役割を担っています。従って、任意のキナーゼやホスファターゼの酵素活性を可視化・検出できれば、複雑な細胞内現象の一部を分子レベルで理解できるものと考えられます。以上の背景を踏まえて、この実験系では分割型 GFP を利用した新規のタンパク質リン酸化・脱リン酸化反応検出系の構築を試みました。具体的には、GFP OPT の N 末側断片に、リン酸化 Tyr 認識能を有する p85 α 由来の SH2 ドメインを複合化しました (SH2-GFPN) (Fig. 5)。加えて、C 末側断片に、SH2 認識モチーフを含む配列を連結した 2 種のペプ

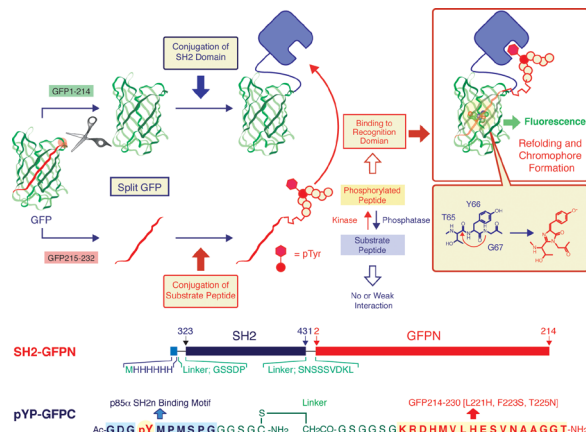


Fig. 5 リン酸化・脱リン酸化反応の検出を指向した分割型 GFP 変異体の設計

チドを設計かつ合成しました (pYP-GFPC および YP-GFPC)。基質配列中のリン酸化状態が、分割型 GFP の再構成反応に与える効果を調べるために、pYP-GFPC 中の Tyr 側鎖上にはリン酸基を導入しています。

初めに、SH2 ドメインを複合化した GFPN タンパク質とペプチドとの再構成過程を調べるために、ペプチド pYP-GFPC および YP-GFPC 存在下における SH2-GFPN の蛍光スペクトルを測定しました。pYP-GFPC 存在下では、非リン酸化ペプチドである YP-GFPC と比べて、SH2-GFPN は、10 倍の蛍光強度増加を示しました。この結果は、GFPN-SH2 中の SH2 ドメインが、特異的にリン酸化 Tyr 残基を認識することで、GFP のリフォールディング効率や速度が向上したことを示唆しています。次に、今回構築した系を用いて、試験管内におけるキナーゼおよびホスファターゼ活性の検出を試みました。非リン酸化ペプチドである YP-GFPC を基質配列特異的チロシンキナーゼである INSR とインキュベートし再構成反応を行った場合、キナーゼ非存在下と比べて著しい GFP 蛍光強度の増加が見られています。キナーゼ阻害剤であるスタウロスポリン (STS) 添加時や基質特異性の異なる Abl キナーゼを用いた場合には、蛍光強度の変化は得られないことを確認しています。この結果は、INSR によって YP-GFPC 中の Tyr 残基が配列特異的にリン酸化され、分割型 GFP のリフォールディング効率を向上させたことを示唆しています。また、リン酸化ペプチドである pYP-GFPC をチロシンホスファターゼである YOP とプレインキュベートし、GFPN-SH2 と混合した場合、GFP 蛍光強度の有意な減少が観測されました。以上の結果は予備的なものではありませんが、将来的には本システムを用いて、任意のキナーゼやホスファターゼの活性を定量的に検出したいと考えています。

3-4. カスパーゼ活性の検出を指向した分割型 GFP 変異体の構築

アポトーシスは、生物の個体発生、神経系ネットワーク構築、細胞交換および免疫系の成立等、生命を維持していく上で重要な役割を担っていることが知られています。また、アポトーシス過程の破綻は、癌、自己免疫疾患、アルツハイマー病等の発症に密接に関与していることが報告されています。細胞内におけるアポトーシス実行においては、システインプロテアーゼであるカスパーゼファミリーが中心的な役割を果たしていることから、任意のカスパーゼ活性を選択的に可視化・検出することは、アポトーシス機構を分子レベルで解明するために重要であると考えられます。以上の背景を踏まえた基礎的研究として、この系では、分割型 GFP を利用したカスパーゼ活性検出システムの開発を目指しました。この実験では、GFP OPT の C 末断片の N 末端側に、カスパーゼ 3 の基質配列 (DEVD) を付加し、ペプチドの N- および C- 末端を、共有結合を介して架橋することで、環状ペプチドを構築しました (cM2-Casp3)。設計上、カスパーゼの添加によって、ペプチド中の基質配列部位が特異的に切断され、GFP N 末断片との再結合およびリフォールディングが速やかに進行することを期待しました

(Fig. 6)。

テストチューブ内において、cM2-Casp3 と GFPN を含む溶液にカスパーゼ 3 を添加した場合、カスパーゼ 3 非存在下と比べて、GFP 蛍光強度が顕著に増加することが判りました。カスパーゼ 3 阻害剤である Ac-DNLD-CHO を添加した場合、阻害剤濃度依存的に GFP 由来蛍光強度の減少が見られています。また、カスパーゼ 3 の代わりにカスパーゼ 9 を添加しても、目立った蛍光強度変化は認められませんでした。従って、カスパーゼ 3 活性によって cM3-Casp3 中の基質配列部位 (DEVD) での選択的切断が起こり、分割型 GFP の再構成反応と蛍光の回復が生じたものと考えられます。今後は、複合化した DEVD 基質配列部分を他の酵素の認識・切断配列に置換することで、任意のプロテアーゼ活性の検出に応用したいと考えています。

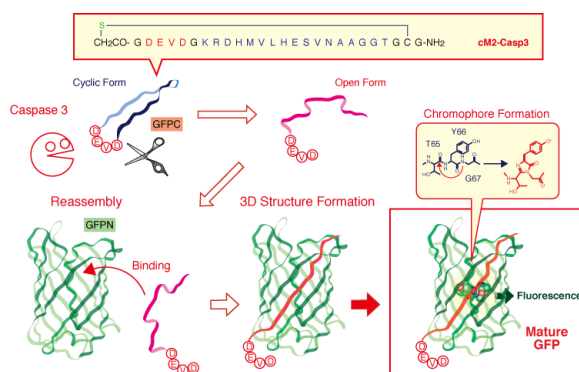


Fig. 6 カスパーゼ活性の検出を指向した分割型 GFP 変異体の構築

おわりに

これらの研究を行うにあたって、多くの方にご協力頂きました。心より感謝し、御礼申し上げます。今後は、より多くの研鑽を積みつつ研究を進展させ、学会に少しでも寄与したいと考えております。多々、ご迷惑をおかけする機会もあるかとは思いますが、今後とも、ご指導、ご鞭撻のほど、よろしくお願い申し上げます。

参考文献

- 1) Sakamoto, S., Ueno, A. and Mihara, H. Effects of Amino Acids Substitution of Hydrophobic Residues on Haem-Binding Properties of Designed Two- α -Helix Peptides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2059-2069 (1999).
- 2) Sakamoto, S., Obataya, I., Ueno, A. and Mihara, H., Regulation of α/β -Folding of a Designed Peptide by Haem Binding, *Chem. Commun.*, 1111-1112 (1999).
- 3) Sakamoto, S., Ueno, A. and Mihara, H., Molecular Assembly of Two- α -Helix Peptide Induced by Haem Binding, *Chem. Commun.*, 1073-1074 (1998).
- 4) Sakamoto, S., Fukushima, H. and Kazuaki Kudo, Regulation of Catalytic Activity of Peptide-Heme Conjugate by Conformational Change with Trifluoroethanol, *Chem. Lett.*, **35**, 584-585 (2006).
- 5) Obataya, I., Sakamoto, S., Ueno, A. and Mihara, H. Design, Synthesis and Peroxidase-like Activity of 3 α -Helix Proteins

Covalently Bound to Heme, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2719–2722 (2000).

- 6) Sakamoto, S., Ueno, A. and Mihara, H. Design and Synthesis of Haem-Binding Peptides. Relationship between Haem-Binding Properties and Catalytic Activities, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2395–2404 (1998).
- 7) Sakamoto, S., Sakurai, S., Ueno, A. and Mihara, H. Haem Binding and Catalytic Activity of Two- α -Helix Peptide Annealed by Trifluoroethanol, *Chem. Commun.*, 1221–1222 (1997).
- 8) Haruyama, T., Sakamoto, S., Mihara, H. and Aizawa, M. Electron Transfer of Flavin-pendant α -Helical Peptides Self-Assembled on an Electrode, *Electrochemistry*, **67**, 1221–1223 (2000).
- 9) Sakamoto, S., Aoyagi, H., Nakashima, N. and Mihara, H. Design and Synthesis of Flavin-Conjugated Peptides and Assembly on a Gold Electrode, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2319–2326 (1996).
- 10) Sakamoto, S., Okano, I. and Kudo, K. Design of FAD-binding Peptide Using a Combinatorial α -Helix Peptide Library, *Chem. Lett.*, 978–979 (2004).
- 11) Murota, K., Sakamoto, S. and Kudo, K. Reversible Immobilization of Protein into Hydrogel Using Designed Coiled-coil Peptides, *Chem. Lett.*, **36**, 1320–1321 (2007).
- 12) Sakamoto, S. and Kudo, K. Design and Synthesis of Semi-Artificial Myoglobin Possessing DNA-Binding Peptides on Heme Propionates, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **78**, 1749–1756 (2005).
- 13) Sakamoto, S., Itoh, A. and Kudo, K. Artificial Assembly of Myoglobin and Flavodoxin Reductase Using Designed Coiled-coil Peptides, *Chem. Lett.*, 1202–1203 (2004).
- 14) Sakamoto, S., Itoh, A., Kudo, K. and Yoshikawa, S. De Novo Design, Synthesis, and Function of Semi-Artificial Myoglobin Conjugated with Coiled-Coil Two- α -Helix Peptides, *Chem. Eur. J.*, **10**, 3717–3726 (2004).
- 15) Sakamoto, S. and Kudo, K. Supramolecular Control of Split-GFP Reassembly by Conjugation of β -Cyclodextrin and Coumarin Units, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 9574–9582 (2008).

さかもと せいじ
東北大学多元物質科学研究所
sakamoto@tagen.tohoku.ac.jp

平成 21 年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

この度は、日本ペプチド学会奨励賞という名誉ある賞を頂き、大変光栄に存じます。会長の相本三郎先生をはじめ、理事、幹事、評議員、選考委員の先生方に、この紙面をお借りしまして改めて御礼申し上げます。本稿では、受賞の対象となりました「異常アミノ酸含有天然物の合成と機能性分子創成への展開」についてご紹介いたします。



今野 博行

はじめに

私は東北大学農学部農芸化学科の出身です。学部4年時の研究室配属では折谷隆之先生の主宰する農薬化学講座を希望しました。折谷研究室は主にテルペン類の単離、構造決定、全合成、活性試験などの研究を行っていました。卒業論文のテーマは不斉合成反応（実際には基質作りに時間の大半を使いました）の応用実験であり、来る日も来る日も失敗の連続でした。修士課程に進学した後は、epoxyrollin A というバンレイシ科アセトゲニン生合成中間体の立体化学決定を行いました。しかしながら合成したものが天然物のスペクトルと全く一致せず、立体どころか平面構造まで違っていました。また次に手がけたdiepomuricaninについては立体化学を決定した所、競争相手から議論が甘いと彼らの論文を通じて指摘を受けました。このような感じで満足感を得られぬまま修士課程が修了しました。

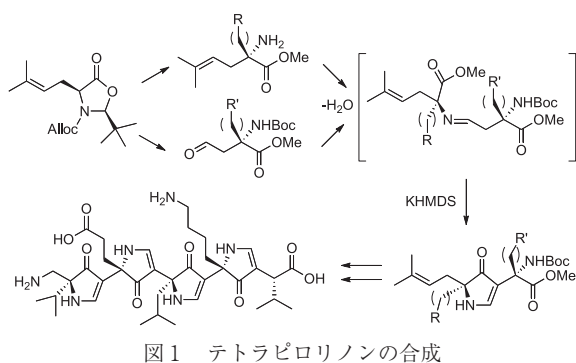
博士課程へ進学するか企業へ就職するか悩みましたが、合成化学を深く学びたいと決意し、同大学院薬学研究科に進学することにしました。小笠原國郎先生のアルカロイド合成の美しさに魅せられ薬品合成化学講座の門を叩きました。ここからの3年間は人生で最も充実した時間であったことは間違いなく、合成化学を通じて様々なスキルアップを行うことができました。研究ではシクロペンタノイド型キラル合成素子の開発研究に携わり、小分子ながらアルカロイド、テルペノイドを中心に6つの天然物の全合成を達成することができました。このように私の学生時代はペプチドとは全く無縁の世界であり、この分野で今後歩んでいくものと思っていました。

学位取得後、小笠原先生のご配慮もあり米国 Pennsylvania 州 Philadelphia 市にある Pennsylvania 大学の Amos B. Smith, III 先生の研究グループにポスドクとして参加しました。Smith 研を希望したのはいわゆる大きな天然物合成に携わってみたいからに他なりません。しかしながら私の人生とはこんなものなのでしょう、同じ化学科の Hirschmann グループのペプチドミミック班の人数が足りないのでもそちらに行くようにと言われたのです。当時ペプチドについて全く知識がありませんでしたので、Hirschmann 教授がどれほどの人物かは知る由もなく英語で反論も出来ず受諾してしまいました。これがペプチドとの出会いになります。（実際にはアミド結合が存在しませんので、ペプチドとは言えないかもしれませんが）以後、研究テーマがペプチドにシフトしていくことは当時は想像もつきませんでした。

両親媒性ペプチドミミックの創成

ペプチドや蛋白質中にはアミド結合が存在しプロテアーゼによって容易に切断され、それゆえこれらは薬剤などには不向きであると一般的に言われています。一方で、水素結合を形成するユニットとしてアミド結合は重要な構成単位です。Hirschmann 先生はペプチドミミックをデザインするにあたり、アミド結合と同等の水素結合能力をもつエナミノン構造に着目し、側鎖の配向性を固定する目的で環構造にしたピロリノン骨格を創成しました。驚くべきことにデザインされたピロリノン構造は元となるペプチドを立体的によくミ

ミックしており、いくつかのペプチドミメティックス創成に成功しています¹⁾。私は Hirschmann グループの一員としてピロリノン構造を用いた β -シート形成能をもつ両親媒性ペプチドミミックの創成を検討しました。両親媒性ペプチドとして Keiser らによって創成されたペンタペプチド H-Val-Glu-Leu-Lys-Val-OH をミミックするため酸性ならびに塩基性アミノ酸側鎖をピロリノン内に組み込む必要がありましたが当時は効率的な合成法が存在しませんでした。そこで、Myers らのアミノ酸合成法と Seebach らの α -アルキル化反応を組み合わせることで α 、 α -2 置換アミノ酸類の合成を行い、それよりアルデヒドとアミンに導きました。そしてこれらから得られるイミンを強塩基で処理することでピロリノン構造を合成することに成功しました。この一連の反応を繰り返すことで標的としたテトラピロリノンを得ることができました。(図1) しかしながら、溶解性の問題もあり β -シート形成能を評価することは困難でありました。

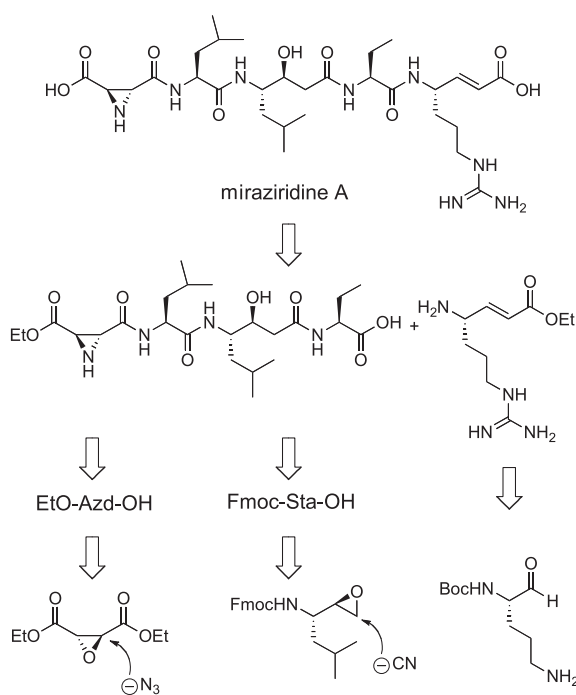


Miraziridine A の合成研究

帰国後、運良く徳島大学工学部生物工学科 A4 講座(主宰:伊藤嘉浩先生,現理研)の助手に着任しました。同じ助手に小出隆規先生(現早稲田大学教授)がおられ、コラーゲンに関する研究を精力的に行っておられました。私もなんとか自分でテーマを設定して研究を行わなければならないと思い、学生時代に学んだ「天然物合成」、ポストドク時代に学んだ「ペプチド化学」、さらに新たな課題として「構造活性相関」をキーワードに研究テーマを設定しようと決めました。その最初のターゲットが miraziridine A です。Miraziridine A は海綿 *Theonella aff. mirabilis* から単離されたペンタペプチドで、異常アミノ酸が4つも含まれています²⁾。また、システインプロテアーゼ阻害能をもつと報告されていました。おもしろいことにシステインプロテアーゼ阻害剤に特有のチオールキャプチャー部分がこの天然物には2つ存在するという過去に例を見ないものでした。そこで私は異常アミノ酸の立体選択的な合成をし、それぞれを固相上でカップリングすることでターゲットに導き、さらに酵素阻害能を評価することで阻害部位の特定を行うことにしました。

まず、異常アミノ酸部分の合成から検討を始めました。アジリジンジカルボン酸 (EtO-Azd-OH) とスタチン (Fmoc-Sta-OH) の合成はエポキシドを経由するルートを検討しましたが、報告されている条件ではラセミ化や基質の分解が起こり、満足する結果を与えま

せん。そこで、以前に超原子価シリケート剤の開発に携わった経験からこの試薬がエポキシドの開環反応にも使えるのではないかと考えた所、思った通りの反応が進行することがわかりました³⁾。これを鍵反応に2つの異常アミノ酸の合成を達成しました。また、ビニルアルギニンの合成では側鎖保護基の選択が重要であり、diBocを用いた時に最も効率よく増炭反応が進行することを見出しました。続いてこれらアミノ酸を用いてカップリングを検討しました。ビニルアルギニンは塩基性条件下において不安定であったので、最後にカップリングするルートで合成を進めました。最終脱保護はエステラーゼを用いて穏和に行い、miraziridine A の全合成を達成することができました。(図2) その後、アナログ体と共に cathepsin B に対する阻害能の評価を行うことで、miraziridine A のアジリジンがチオールキャプチャーとして働いていることを明らかにしました。加えて Azd-Leu-Sta 部分があれば阻害能が十分発揮されることもわかりました⁴⁾。



Callipeltin A の合成研究

徳島を離れ、京都大学大学院薬学研究科藤井信孝先生の研究室にお世話になる機会を得ました。短い間でしがペプチド化学の大家に在籍できたことは大変名誉なことであり、大高章先生(現徳島大学教授)、玉村啓和先生(現東京医科歯科大学教授)と一時の間同じ研究室に在籍できたことは大きな刺激であり、ペプチド化学や医薬品化学の面白さばかりでなく多くの経験を積ませて頂きました。その後、京都府立医科大学の新研究室発足に立ち会う機会を得、赤路健一先生のご指導の下で自由に行う研究を行う環境を与えて頂きました。この間、中心に行ったテーマが callipeltin A の合成研究です。Callipeltin A は海綿 *Callipelta* sp. より単

離，構造決定された環状デプシペプチドで異常アミノ酸が豊富に含まれています⁵⁾。(図3) また抗 HIV 活性を有しており，HIV 受容体として働くケモカインレセプター CCR5 を阻害することが示唆されています。私はアミノ酸類の立体制御合成と固相合成法を組み合わせることで効率的な誘導体合成を行い，CCR5 阻害剤創成を目指して研究に着手しました。

Callipeltin 類に含有する β -MeOTyr 部分は酸性条件に不安定なため構造決定時には立体化学が未決定でした。我々は合成化学的なアプローチで立体化学の決定を行うこととし，シンナメートエステルから Sharpless の不斉ジヒドロキシル化，アミノヒドロキシル化反応を使い分けて不斉中心を制御し，さらにレトロアルドールによる分解を回避するためにアジリジンを経由することで位置および立体化学的に満足できる方法論を確立することができました。その後，トリペプチド誘導体にし，天然物との比較によって不明だった立体化学を 2R, 3R と決定しました^{6,7)}。

次に Fmoc-D-alloThr ならびに diMepyroGlu について，L-あるいはD-セリンを用いたジアステレオ選択的な合成法を検討しました。特に diMepyroGlu については接触水素化ならびにアルキル化で高い立体選択性を得，効率的なルートとなりました⁸⁾。(図4)

また，callipeltin A の部分構造である callipeltin E と M の固相合成を検討しました。2-クロロトリチルクロリド樹脂上でカップリングと脱保護を行い，TFA

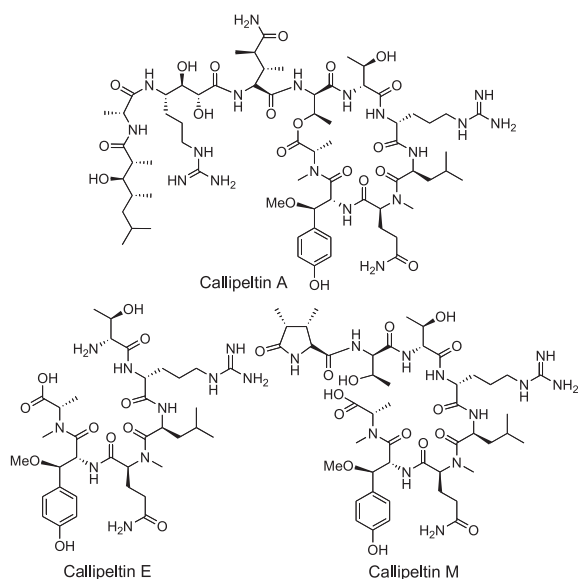


図3 Callipeltin A, E, ならびに M

のみで樹脂からの切り出しと最終脱保護を行うと β -MeOTyr の分解を抑えることができ callipeltin E および M の全合成を達成することができました。現在 callipeltin A の全合成ならびに CCR5 阻害剤創成へ向けた評価系の作成を検討中です。

SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤創成研究

京都府立医科大学赤路研究室内でスタッフがリンクできるテーマを立ち上げようということになり，赤路教授，野坂准教授とともに SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤に関する研究を始めました。SARS（重症急性呼吸器症候群）は2002～2003年にかけて東アジアで猛威を振るった呼吸器疾患ですが，阻害剤研究についてはそれほど盛んではありません。私たちは阻害剤創成に必要な一連の流れ，すなわち標的蛋白質の調製，評価系の確立，阻害剤合成法の開発を通じて，適切な阻害剤を見出すことをゴールに研究をスタートさせました。まずプロテアーゼの調製時 mature SARS 3CL プロテアーゼが安定性を欠くものであり，188Arg/189Gln で切断を受けやすいことを突き止めました。そこで分解抵抗性の変異蛋白質 R188I mutant を作成することで正確な評価系の確立を行うことができました⁹⁾。阻害剤のデザインでは，基質配列に基づいたペプチダルデヒドを適宜合成し，阻害能の評価から $IC_{50} = 5.7 \mu M$ をもつ化合物を見出すことができました。さらなる阻害剤探索のため固相法でペプチダルデヒドを合成しましたが，既法では望むペプチダルデヒドを効率的に得るには不十分でした。私たちはアセタール法でローディングならびに伸長したペプチダルアセタールから一旦チオアセタールを経由することが効率的なアルデヒド変換法になりうることを見出しました。(図5)

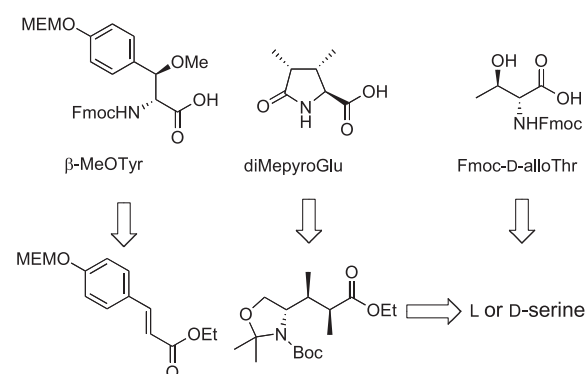


図4 Callipeltin 類に含有する異常アミノ酸の合成計

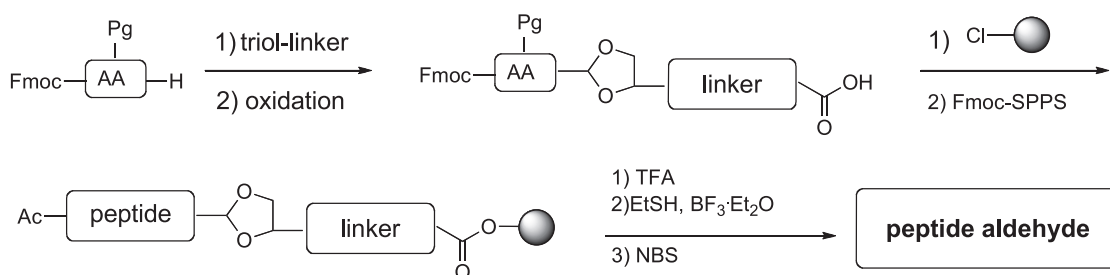


図5 チオアセタールを経由するペプチダルデヒドの合成

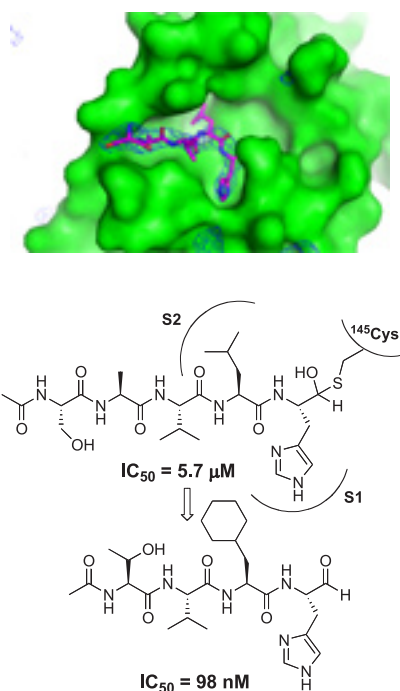


図6 蛋白質-阻害剤の構造解析とそれより導かれた阻害剤

この方法論をもとにさらに構造活性相関を進め、さらに学外の方にもご協力を頂き、結晶化、X線構造解析に成功し理論的な分子設計が可能になりました。それによって分子量500程度のペプチド性阻害剤 ($IC_{50} = 98 \text{ nM}$) を作成することに成功しました。(図6) 本研究をスタートさせた時には構造解析が実現できるとは思っていませんでしたが、赤路先生の熱意が研究を前進させたのだと思いますし、共同研究の大事さと必要さを身にしみて感じた研究となりました。今後、低分子化を含め更に発展させていければと思っています。

おわりに

昨年の4月より現在の所属になり、独立した研究室を主宰しております。研究室立ち上げも一段落し、今後新しい研究テーマを設定し合成化学を基盤とした生命科学研究を行っていきたいと思っています。それによって学会を盛り上げていければと思っています。

最後になりますが、本受賞についてのご推薦、ならびに本稿の大半の研究に対してご指導頂きました赤路健一先生に心から感謝申し上げます。また、藤井信孝先生、野坂和人先生、Amos B. Smith, III 先生、故 Ralph F. Hirschmann 先生、小笠原國郎先生、折谷隆之先生、田中陽光先生、小出隆規先生、真壁秀文先生、吉田尚之博士をはじめとする多くの先生方、さらに一緒に研究をしてくれた学生諸君に支えて頂きました。心から感謝申し上げます。

参考文献

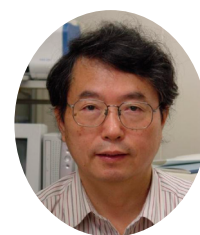
- 1) Smith, A. B. III, Benowitz, A. B., Sprengeler, P. A., Barbosa, J., Guzman, M. C., Hirschmann, R., Schweiger, E. J. Bolin, D. R., Nagy, Z., Campbell, R. M., Cox, D. C., Olson, G. L. (1999) *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9286-9298.
- 2) Nakao, Y., Fujita, M., Warabi, K., Matsunaga, S., Fusetani, N. (2000) *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 10462-10463.

- 3) Konno, H., Toshiro, E., Hinoda, N. (2003) *Synthesis*, 2161-2164.
- 4) Konno, H., Kubo, K., Makabe, H., Toshiro, E., Hinoda, N., Nosaka, K., Akaji, K. (2007) *Tetrahedron*, **63**, 9502-9513.
- 5) Zampella, A., D'Auria, M. V., Gomez-Paloma, L., Casapullo, A., Minale, L., Debitus, C., Henin, Y. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6202-6209.
- 6) Konno, H., Aoyama, S., Nosaka, K., Akaji, K. (2007) *Synthesis*, 3666-3672.
- 7) Zampella, A., D'Orsi, R., Sepe, V., Casapullo, A., Monti, M. C., D'Auria, M. V. (2005) *Org. Lett.*, **7**, 3585-3589.
- 8) Konno, H., Takebayashi, Y., Nosaka, K., Akaji, K. (2010) *Heterocycles*, **81**, 79-89.
- 9) Akaji, K., Konno, H., Onozuka, M., Makino, A., Saito, H., Nosaka, K. (2008) *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 9400-9408.

この ひろゆき
山形大学大学院理工学研究科
konno@yz.yamagata-u.ac.jp

第46回ペプチド討論会を開催して

第46回ペプチド討論会を、平成21年11月4日(水)～6日(金)の期間、北九州国際会議場(北九州市小倉北区)で開催しました。この会は九州工業大学を中心に、九州大学、福岡女子大学、佐賀大学、福岡大学、九州共立大学、久留米大学、産総研九州センター等の協力を得て運営しました。九州工業大学では岡元孝二、坂本寛准教授、大内将吉准教授、加藤珠樹准教授、前田衣織助教、園木ゆか事務職員を中心に行いました。



岡元 孝二

今回は総数395名(一般事前参加180名、学生事前参加154名、一般当日参加45名、学生当日参加16名)の方が参加登録され、2日目の懇親会には総数215名(一般参加124名、学生参加91名)の方が参加されました。

本討論会では、近年の情報科学の発展を踏まえて新たに「ペプチドインフォマティクス」の課題を加え、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・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を中心課題として、一般口頭発表20件、若手口頭発表20件、ポスター発表140件の総計180演題の研究発表に対して活発な討論が行われました。またペプチドインフォマティクスの面からの佐藤文俊教授(東大生研)による有意義な招待講演が3日目に行われました。さらに韓国からSeong An教授(Kwangju 大学)とSihyun Ham教授(Sookmyung 女子大学)の興味深い招待講演が2日目に行われました。ポスター発表においても韓国からの2演題の発表



討論会場



ポスター会場

があり、研究の面での日韓交流がなされました。

受賞講演は、平成 21 年度日本ペプチド学会賞の若宮建昭教授（近畿大学）、日本ペプチド学会奨励賞の坂本清志助教（東北大学）及び今野博行准教授（山形大学）により行われました。

本年度の討論会も昨年と同様に若手優秀発表賞及び若手ポスター賞を選考しました。若手優秀発表賞は 20 題の若手口頭発表の中から、東海大学の北條裕信先生を審査委員長、若手の先生方を審査委員として厳正に選考していただき、最優秀賞 1 名及び優秀賞 9 名が選ばれました。また若手ポスター賞も十数名の審査委員により厳正に審査していただき、9 名が選ばれました。いずれの審査もレベルの高い発表からの苦渋の選考であり、この場を借りて審査委員の先生方には御礼申し上げます。

さらに今回は企業展示にスタンプラリーを初めて企画し、全ての展示ブースからスタンプを集めた方には日本ペプチド学会のロゴマーク入りの T シャツを無料で配布することを試みました、結果として約 150 枚を配布し、展示企業の方には好評でありました。

最後に、多大なるご支援、ご高配を賜りました北九州市及び各助成団体、協賛企業並びに日本ペプチド学会の関係者に厚く御礼申し上げます。さらに本討論会の準備、運営に多大にご協力いただきました実行委員及び関係者（九州工業大学、九州大学、福岡女子大学、佐賀大学、福岡大学、九州共立大学、久留米大学、産総研九州センター等）の方々には深く感謝します。

来年、木曾良明教授（組織委員長、京都薬科大学）及び藤井信孝教授（組織副委員長、京都大学）のお世話で開催されます 5th IPS/47th JPS（京都市）の成功を



懇親会の風景

心よりお祈り申し上げます。

各賞の受賞者

日本ペプチド学会賞：

若宮建昭（近畿大学）Organic Chemistry and Chemical Biology of Amino Acids and Peptides with Unique Structure

日本ペプチド学会奨励賞：

坂本清志（東北大学）Design and Functional Regulation of Proteins and Peptides by Conjugation of Artificial Components

今野博行（山形大学）Studies on Marine Natural Products Containing Unusual Amino Acids

若手口頭発表最優秀賞：

神絃一郎（東京大学）

若手口頭発表優秀賞：

石川晶也（東京薬科大学）、岩崎 崇（農業生物資源研究所）、大矢亜紀（東京医科歯科大学）、人見 梓（東京大学）、柏本啓介（京都薬科大学）、高林靖子（東京薬科大学）、西村裕一（九州大学）、Vladimir Torbeev（京都薬科大学）、渡辺達哉（東京大学）

JPS ポスター賞：

Euis Maras Purwati（大阪大学）、小川麻里子（京都大学）、鎌田瑠泉（北海道大学）、Sunghyun Kim（Gwangju Institute of Science and Technology (GIST)）、高木雅晴（東京薬科大学）、玉垣裕子（大阪大学）、出口綾香（京都府立医科大学）、山本貴博（岡山大学）、八木寛陽（北海道大学）

日本ペプチド学会市民フォーラム 2009 報告

日本ペプチド学会主催の市民フォーラム 2009 を第 46 回ペプチド討論会の翌日の 11 月 7 日（土）に北九州国際会議場（北九州市小倉北区）で開催しました。本フォーラムは北九州市、（財）北九州産業学術推進機構、九州工業大学大学院情報工学研究院、九州工業大学大学院生命体工学研究科の共催で行われました。

本フォーラムでは北九州市の重点課題である環境及びペプチドと健康の関連を取り上げて、「環境にやさしく健康を守る万能素材—アミノ酸・ペプチド」をテーマにして、5 人の専門家による講演及び会長メッセージが行われました。講演は西野憲和教授（九州工業大

学)「ペプチドと酵素」, 奈良岡 浩教授 (九州大学)「宇宙とアミノ酸」, 山岡伸也研究員 ((株) 新菱)「バイオマスからの超効率的なペプチド生産」, 児島将康教授 (久留米大学)「病気の治療に使われるペプチド」, 藤井紀子教授 (京都大学)「生物界の右左—老化と D-アミノ酸」, 相本三郎会長 (大阪大学)「ペプチド学会からのメッセージ」の 6 題であり, いずれも今回のテーマにふさわしく, 市民にわかりやすく興味深い講演でした。また会場からいくつかの質問があり, 活発な市民フォーラムでした。

参加者は約 100 名でしたが, 本フォーラムの小冊子を 3,000 部作製し, 北九州市をはじめ, 九州北部の市民に配布するとともに約 180 のマスコミ・大学・高校に郵送し, アミノ酸・ペプチドの紹介, 啓蒙を図ることができました。

おかもと こうじ
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
okagen@bio.kyutech.ac.jp

46JPS 若手口頭発表賞を受賞して

2009 年 11 月 4 日から 6 日にかけて北九州国際会議場で開催された第 46 回ペプチド討論会において, 若手口頭発表に演者として登壇する機会を与えて下さいました九州工業大学の岡元孝二先生をはじめ, 審査員の先生方にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。私にとってペプチド討論会とは年間を通じて最も大切な発表の場であり, それ故に常に新しいデータを発表しなければ, というプレッシャーと年間戦いながら研究を続けてまいりました。その結果, 今討論会において若手口頭発表賞 Good Stone Award を受賞することが出来ましたことは大変感慨深いものがございます。しかしながら, 今回頂きました賞はあくまでも“Good”であり, 研究者にとって最高の褒め言葉である“Excellent”を冠した Excellent Stone Award には至りませんでした。また, 自分よりも若い発表者の研究データやプレゼン能力と自身のそれを比較した際に, 己の未熟さを度々痛感致しましたことは, 真摯に受け止めるべき結果であると考えております。今後は今回の受賞に慢心することなく, Good な研究者から Excellent な研究者を目指し, 全身全霊で研究と向き合っていこうと思います。それでは, 今回受賞の対象となりました, 「Mitochondria disruptive 9-mer peptides conjugated with tumor homing domain: cyclic RGD motif」という研究について簡単にご紹介をさせていただきます。

これまでに我々の研究室ではカブトムシの幼虫から抗菌性ペプチド・ディフェンシンを単離し, この天然型ディフェンシンの生理活性部位をリード配列として, 人工的改変, D 型アミノ酸置換を経ることで最終的に D 型アミノ酸 9 残基からなる新規抗菌性ペプチ

ド (D-peptide A, B, C, D と命名) を作成するに至りました¹⁾。これらの改変ペプチドは正電荷を持ち, 両親媒性, α -ヘリックス構造をとるペプチドであることが分かっております。一方で, 細菌はホスファチジルグリセロールやカルジオリピン, 哺乳類がん細胞はホスファチジルセリンといった負電荷を帯びた酸性リン脂質を細胞膜表面に豊富に含有するため, 改変ペプチドは静電相互作用によってこれらの脂質膜へと結合し, 膜破壊を引き起こすことで抗菌活性, 抗がん活性を示すことが確認されております²⁻⁵⁾。また, 正常な哺乳類細胞膜表面はホスファチジルコリン, スフィンゴミエリンといった全体として電荷を持たない双イオン性リン脂質で覆われており, ホスファチジルセリン等の酸性リン脂質は内側の細胞質側に局在しているため, 正電荷を持つ改変ペプチドが電荷的に引き付けられないことも明らかになっております。

また近年になり, ミトコンドリアも負電荷を帯びた外膜を持つことが報告されております⁶⁾。これは, 進化の過程においてミトコンドリアが好気性細菌に由来していることに起因するものと考えられております。このことから我々は改変ペプチドの新規標的としてミトコンドリアに着目しました。そこで, まずはマウス肝臓から単離したミトコンドリアを改変ペプチドで処理したところ, 明瞭なミトコンドリア破壊が観察され



岩崎 崇

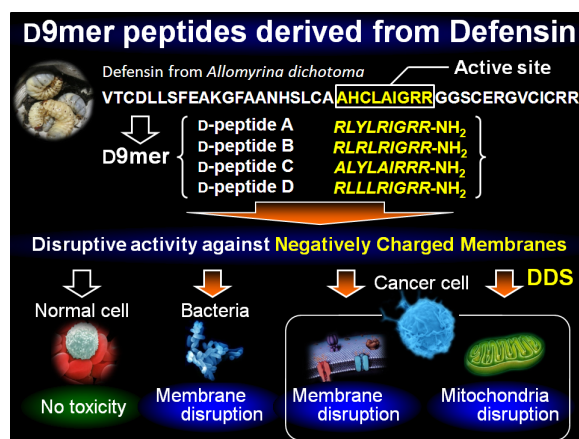


図1 カブトムシディフェンシン由来改変ペプチドの負電荷を帯びた生体膜破壊活性

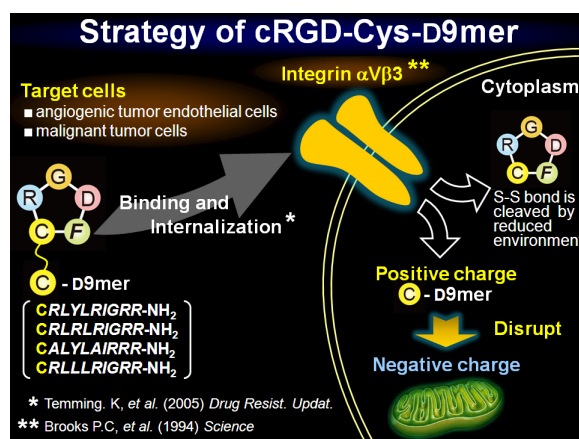


図2 環状型 RGD モチーフ-改変ペプチド複合体による細胞選択的ミトコンドリア破壊の概要図

ました。次に、細胞内移行配列である octa-arginine⁷⁾を用いて、改変ペプチドを細胞内へ輸送したところ、顕著な細胞内ミトコンドリア破壊が観察され、様々な細胞株に対して低い濃度で細胞毒性を示すことが分かりました⁸⁾。しかし octa-arginine は細胞選択性が低いため、この細胞毒性は無差別的なものでありました。そこで、細胞選択的なドラッグデリバリーキャリアとして環状型 RGD モチーフ [c(RGDFC)] を用いることとしました。環状型 RGD モチーフは細胞膜上の integrin $\alpha V\beta 3$ と結合した後に細胞内へ取り込まれることが分かっており⁹⁾、また integrin $\alpha V\beta 3$ は一部のがん細胞株とがん組織周囲の血管上皮細胞に過剰に発現していることからがん細胞・組織特異的な薬物輸送の標的分子として有効であると考えられます¹⁰⁾。環状型 RGD モチーフ-改変ペプチド複合体を合成し、様々な哺乳類細胞株に対する細胞毒性を調べたところ、上記のペプチド複合体は integrin $\alpha V\beta 3$ を細胞膜上に多量発現しているサル腎臓がん細胞 (Vero) とヒト血管上皮細胞 (HUVEC) に選択的に取り込まれ、アポトーシスを誘導することが明らかになりました。この結果は、細胞内ミトコンドリアは改変ペプチドの新たな標的として有効であり、また目的にあったドラッグデリバリーキャリアと組み合わせることで、細胞選択的なミサイル療法に応用可能であることを示唆しております。今後は、細胞膜とミトコンドリア、即ち細胞外と細胞内の標的を狙った両アプローチにより、改変ペプチドの様々な応用研究が期待されます。

最後になりましたが、本研究は筑波大学生命環境科学研究科山川稔教授と農業生物資源研究所生体防御研究ユニット石橋純博士のご指導のもと遂行したものであり、両先生には心から感謝申し上げます。また本研究を通じて大変お世話になりましたペプチド学会の先生方にも、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。研究者として駆け出しの時期に、こんなにも面白く遣り甲斐のある研究に巡り合えたことは本当に幸でしたと思います。来年度からは本研究とは離れることとなりますが、またいつかペプチド討論会で発表する機会を与えて頂けると幸いに存じます。今後ともよろしくお願い申し上げます。

【参考文献】

- 1) Ishibashi, J., Saido-Sakanaka, H., Yang, J., Sagisaka, A., and Yamakawa, M. *Eur. J. Biochem.*, **266**, 616-623. (1999)
- 2) Saido-Sakanaka, H., Ishibashi, J., Momotani, E., Amano, F., and Yamakawa, M. *Peptides*, **25**, 19-27. (2004)
- 3) Saido-Sakanaka, H., Ishibashi, J., Momotani, E., and Yamakawa, M. *Dev. Comp. Immunol.*, **29**, 469-477. (2005)
- 4) Iwasaki, T., Saido-Sakanaka, H., Asaoka, A., Taylor, D., Ishibashi, J., and Yamakawa, M. *J. Insect Biotechnol. Sericology*, **76**, 25-29. (2007)
- 5) Iwasaki, T., Ishibashi, J., Tanaka, H., Sato, M., Asaoka, A., Taylor, D., and Yamakawa, M. *Peptides*, **30**, 660-668. (2009)
- 6) Trapp, S., and Horobin, R. W. *Eur. Biophys. J.*, **34**, 959-966. (2005)
- 7) Futaki, S. *Biopolymers*, **84**, 241-249. (2006)
- 8) Iwasaki, T., Ishibashi, J., Kubo, M., Asaoka, A., Taylor, D., and Yamakawa, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 683-

687. (2009)

- 9) Temming, K., Schiffelers, R.M., Molema, G., and Kok, R.J. *Drug Resist. Updat.*, **8**, 381-402. (2005)
- 10) Brooks, P.C., Clark, R.A.F., and Cheresch, D.A. *Science*, **264**, 569-571. (1994)

いわさき たかし
農業生物資源研究所生体防御研究ユニット
itaka@affrc.go.jp

46JPS 若手口頭発表賞を受賞して

この度は、第46回ペプチド討論会「若手口頭発表」において、優秀発表賞という名誉ある賞を頂き、大変嬉しく存じます。発表の機会を与えて頂いた討論会世話人・九州工業大学の岡元先生をはじめ、審査員の先生方に心よりお礼申し上げます。本稿では、受賞の対象となった「オピオイド受容体活性化における細胞膜表面 Trp 残基の役割」の研究とその周辺の話について紹介致します。



西村 裕一

私たちの研究室では、オピオイド受容体とオピオイド受容体様 (opioid receptor-like 1) ORL1 受容体について研究を行っています。脳神経系において、鎮痛に関わるオピオイド受容体には、 μ (MOR), δ (DOR), κ (KOR) の3種類が存在し、これらは全て G タンパク質共役の7回膜貫通型受容体 (GPCR) であり、その構造は高い相同性をもっています¹⁻⁴⁾。一方、ORL1 受容体は痛覚神経刺激、痛み増強の神経ペプチドであるノシセプチンに対する受容体であり、その構造はオピオイド受容体、特に KOR と非常によく似ています。ORL1 受容体のリガンド認識、すなわち、ノシセプチンの結合には、細胞外第2ループ (EL2) および第5膜貫通ドメイン (TM5) が深く関与しています。私たちは以前に、ノシセプチンの結合部位を探索する研究から、これらのうち208位の Trp は TM5 の最上部に存在し、この Trp を Ala に置換した変異受容体では、ノシセプチンは野生型 (WT) に対するのと同様に強く結合するものの、ORL1 受容体はほとんど活性化しないことを発見しました⁵⁾。このことから、Trp208 は ORL1 受容体の活性化に何らかの直接的な役割を担っている、きわめてユニークな残基であることが示されました。他の3種のオピオイド受容体においても同様な位置に Trp が保存されており、しかも、それぞれ隣り合うか、1残基おいて2つずつ持っています (Fig. 1)。私たちは、これらの Trp 残基のどちらか一方が、あるいは両方がオピオイド受容体の活性化において、ORL1 受容体の Trp208 と同じような役割を持っているに違いない、と考えました。

オピオイド受容体の立体構造の分子モデリングの考察からは、これら Trp は EL2 と TM5 の境界に存在し、細胞膜表面に受容体をアンカリングする役目を担っているのではと想定されます。本研究では、こうしたオ

Rat ORL1 Receptor --AQVEDEE--IECLVEIPAPQ--DYWGPVFAICIFLFSFIIPVLIISVCYS
 Rat μ Opioid Receptor --TKYRQGS--IDCTLTFSP--TWYWENLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYG
 Rat δ Opioid Receptor --TQPRDGA--VV--CTLQFPSP--SWYWDTVTKICVFLFAFVVPILIIITVCYG
 Rat κ Opioid Receptor --TKVREDVDVIECSLQFPDDEYSW--WDLFMKICVFVFAFVIPVLIIVCYT

Fig. 1 ORL1 およびオピオイド受容体 EL2-TM5 領域のアミノ酸配列アライメント

ピオイド受容体の EL2-TM5 境界に存在する Trp の役割を明らかにすることにしました。そして、2 つある Trp 残基をそれぞれ Ala に置換し、リガンド結合と受容体活性化にどのように影響するかを評価しました。具体的には、トリチウム標識したリガンドによる飽和結合試験、それを標識なしのリガンドと競合させて調べる競合結合試験、そして、リガンドの生物活性を評価する [35 S]GTP γ S 結合試験の 3 つのアッセイを実施しました。これらの一連の結合試験によって、受容体発現量、リガンド結合能、受容体活性化能が評価されます。また、受容体の活性化をより検出しやすくするために、受容体の C 末端には G α サブユニットを融合させました。

まず、2 つある Trp 残基のうち、C 端側にある Trp から取り掛かりました。しかしながら、作製した変異受容体 (MOR W228A, DOR W209A, KOR W222A) の結合親和性、受容体活性化能はいずれも WT と同等であることが分かりました。そこで次に、N 端側にある Trp を Ala に変異させ、得られた変異受容体 (MOR W226A, DOR W207A, KOR W221A) について調査しました。

まず、 μ 受容体の結果について説明します。飽和結合試験の結果より、トリチウム標識リガンド・DAGO が結合可能な健全な MOR W226A の発現量は WT に比べてきわめて低いことが判明しました。これは、変異受容体が活性のある安定な構造を取って細胞膜に挿入される割合が小さいことを意味します。しかし、この受容体に対して DAGO は WT に対するのと同様に強い結合能を示しました。そこで、[35 S]GTP γ S 結合試験を実施したところ、最大活性が WT の 21 % にまで低下するという結果が得られました (Table 1)。こうして、ORL1 受容体のときと同様に、226 位 Trp を Ala に置換するとリガンド結合性は維持するものの、受容体活性化能を大きく減じ、この Trp 残基に受容体活性化に特別な働きがあることが明らかとなりました。

次に、 δ 受容体の結果について説明します。作製した DOR W207A の受容体発現量は、 μ 受容体の場合と異なり WT とほぼ同等の値となりました。一方、リガンド・Deltorphin-II で調べたところ、ORL1 受容体、MOR と同様に、DOR もリガンド結合能を維持するものの、最大活性が WT の 32 % にまで低下するという結果が得られました (Table 1)。この結果は、 κ 受容体でも同様でした (Table 1)。

以上の結果から、オピオイド受容体においても細胞膜界面の Trp 残基がリガンドの結合には関与せず、受容体の活性化に必須な残基であることが分かりました。細胞膜界面に存在するこうした Trp 残基は、膜構成脂質と相互作用し、膜貫通ドメイン α -ヘリックス

Table 1 各受容体の結合試験の結果

Receptors	$B_{\max}$ (%)	IC ₅₀ (%)	EC ₅₀ (%)	$E_{\max}$ (%)
MOR WT	100	100	100	100
MOR W226A	11	71	24	21
DOR WT	100	100	100	100
DOR W207A	86	85	67	32
KOR WT	100	100	100	100
KOR W221A	61	72	94	59

を細胞膜に係留・保持する「分子アンカー」として受容体の活性型構造を安定化していると推測されます。このような Trp の機能は既に数報報告されています^{6, 7)}。そして、分子アンカーとして働く Trp が受容体活性化に必須であることは、この Trp がリガンド結合に伴うコンホメーション変化において何らかの影響を受けることを意味するものと考えられます。GPCR のコンホメーション変化の実体がかかっていない現状において、膜界面 Trp 残基とそれが支える TM5 の構造構築の本質を解明することが、受容体活性化、コンホメーション変化の分子機構解明の端緒となるかも知れません。

GPCR の残基変異についてはいろいろな問題点が指摘されます。私たちは、こうした問題点について最大限に配慮しながら研究を進めています。今回の研究においては幸いなことに、リガンドの受容体結合が野生型受容体と同じに維持されたことから、変異させた Trp 残基の効果を取り出して評価することができました。しかし、リガンドの結合部位を同定するためには、リガンドが結合しない結果を評価しなくてはならず、大きな問題となっています。今後、この問題を解決する研究に取り組んでみたいと考えています。最後に、今回私は Good Stone 賞を受賞しました。しかし、私は未だただの「良い石ころ」に過ぎません。これを励みにいつかはきれいな宝石となって輝けるよう、これからも研究に邁進して行きたいと思っています。私は現在修士 1 年ですので、これからも長くペプチド学会にはお世話になりますが、今後ともどうぞよろしくお願い致します。

参考文献

- 1) Kosterlitz, H. W. and Hughes, J., *Life Sci*, **17**, 91-96 (1975).
- 2) Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Linda, Fothergill, A., Morgan, B. A. and Morris, H. R., *Nature*, **258**, 577-579 (1975).
- 3) Chavkin, C., James, I. F., Goldstein, A., *Science*, **215**, 413-415 (1982).
- 4) Henderson, G. and McKnight, A. T., *Trends Pharmacol. Sci.*,

18, 293-301 (1997).

- 5) Isozaki, K., Li, J., Okada, K., Nishimura, H., Matsushima, A., Nose, T., Costa, T., and Shimohigashi, Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **17**(23), 7904-4908 (2009).
- 6) Yau, W. M., Wimley, W. C., Gawrisch, K., and White, S. H., *Biochemistry* **37**(42), 14713-14718 (1998).
- 7) Kathleen, N. N., Abhay, H. P., Shan, Q., Ramona, J. U., Shuhua, T., David, M., and Suren A. T., *Biochemistry* **45**(41), 12448-12460 (2006).

にしむら ひろかず
九州大学大学院理学研究院化学専攻
nishimura-1986@chem.kyushu-univ.jp

46JPS ポスター賞を受賞して

この度、2009年11月4日～6日にかけて北九州国際会議場で行われた第46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。発表では多くの先生方からご指摘とご助言をいただき、ありがとうございました。また、大変光栄なことにポスター賞をいただきました。そこで、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。



鎌田 瑠泉

癌抑制タンパク質 p53 は、DNA 損傷にตอบสนองして細胞周期停止やアポトーシスを誘導し、ゲノム安定性を維持する機構の中心的な働きをしています。p53 は p21, bax など、細胞周期停止やアポトーシスに関わる様々な遺伝子の転写を活性化します。p53 は5つの主要なドメインから構成され、C末端側に位置する四量体形成ドメインを介した四量体形成が p53 の配列特異的 DNA 結合、タンパク質間相互作用に必須です。近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の作成過程に p53-p21 経路が関与し、p53 を欠損させることで iPS 細胞の作成効率が 10-20 倍に増加することが明らかとなっています。そのため、坂口研究室では、細胞内 p53 の機能を効率的に阻害することの出来るペプチドの開発を目的とした研究を行っています。

p53 は四量体を形成して機能する転写因子であり、DNA と結合する部位が変異した変異型 p53 とヘテロ四量体を形成することによりドミナント-ネガティブに不活性化することが知られています。このため、p53 四量体形成ドメインペプチドを細胞内に導入し、内在性の p53 タンパク質とヘテロ四量体を形成させることによって機能を阻害できるのではないかと考えました (図1)。本研究では、ペプチドを細胞内に導入するために Protein Transduction Domain (PTD) を用いました。四量体形成ドメイン (p53tet) の N 末端に 10 残基の Lys (K10) あるいは Arg (R10) を融合した K10-p53tet, R10-p53tet を Fmoc 固相法により合成しました。蛍光ラベルしたペプチドを用い、合成した PTD 融合 p53tet ペプチドが効率的に細胞内へと移行することを確認しました。さらに、四量体を形成で

きず、単量体で存在する変異型ペプチド K10-p53tet-L344P, R10-p53tet-L344P を合成し、PTD を融合していない p53tet とのヘテロオリゴマー形成能を解析しました。その結果、K10-p53tet-WT, R10-p53tet-WT は p53tet ペプチドとヘテロオリゴマーを形成しましたが、単量体変異体 K10-p53tet-L344P, R10-p53tet-L344P はほとんどヘテロオリゴマーを形成しませんでした。

続いて、当研究室で開発した細胞内 p53 の転写活性を解析するレポーターシステムを用いて、PTD 融合 p53tet ペプチドが p53 タンパク質の転写活性に及ぼす効果を定量化しました¹⁾ (図2)。このシステムでは、黄色蛍光タンパク質 Venus 融合 p53 (Venus-p53) 発現ユニットと、p53 応答性プロモーターによって発現が誘導される赤色蛍光タンパク質 mCherry 発現ユニットを一つのプラスミドに有するレポーターベクター p53RE-mCherry-hCMV-Venus-p53 を、内在性 p53 を欠損した NCI-H1299 細胞に導入します。細胞内の黄色蛍光強度により p53 の発現量を、赤色蛍光強度により p53 の転写活性を定量化することが出来ます。このシステムでは、Venus-p53 発現ユニットと p53 応答性 mCherry 発現ユニットの比は細胞ごとに一定となります。

このシステムを用いて Venus-p53 の転写活性の変化を解析した結果、K10-p53tet-WT, R10-p53tet-WT ペプチドを導入した場合、ペプチドが無いときに比べて約 50 % 転写活性が低下しました。一方、単量体で存在し、Venus-p53 とヘテロオリゴマーを形成できない変異型 K10-p53tet-L344P, R10-p53tet-L344P では阻害効果をほとんど示しませんでした。以上より、K10-p53tet, R10-p53tet ペプチドは細胞に取り込まれ、細胞内の Venus-p53 とヘテロオリゴマーを形成することにより細胞内 p53 の転写活性を阻害できることが明ら

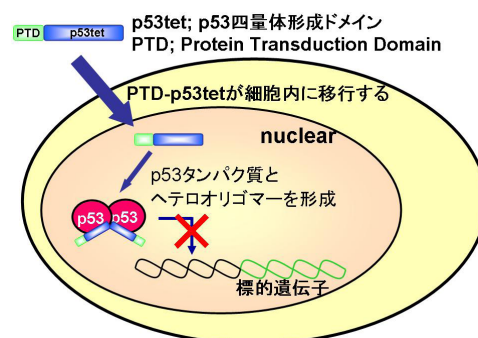


図1 p53tet ペプチド導入による内在性 p53 機能の阻害

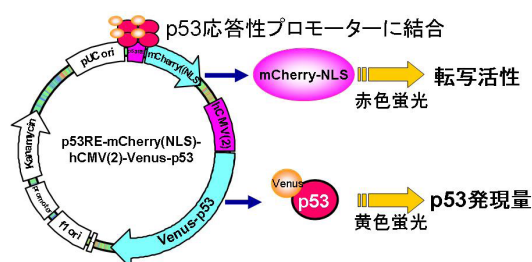


図2 p53 転写活性の測定法

かになりました。本研究は坂口和靖先生の指導のもとで行った研究であり、適切な助言をいただいた坂口先生に感謝いたします。

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九州工業大学の岡本孝二先生をはじめ、皆様に心から御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Imagawa, T., Terai, T., Yamada, Y., Kamada, R., and Sakaguchi, K. *Anal. Biochem.*, **382**, 249-256 (2009)

かまだ るい
北海道大学大学院理学院
化学部門生物化学研究室
rui@mail.sci.hokudai.ac.jp

46JPS ポスター賞を受賞して

私は2009年11月4日から6日にかけて北九州市・小倉で行われた第46回ペプチド討論会に参加、ポスター発表を行う機会に恵まれました。発表では多くの先生方からご指摘ならびにご助言をいただき、大変有意義な時間を過ごすことができました。また、大変光栄なことにポスター賞を受賞することが出来、大変嬉しく思っています。そこで、この場をお借りして、今回ポスター発表させていただいた私の研究内容を紹介させていただきます。



小川麻里子

アルツハイマー病(AD)は認知症をきたす疾患の中で一番多い疾患です。その原因は未だ不明ですが、脳の神経細胞が急激に減少し脳が萎縮して高度の知能低下や人格の崩壊がおこる認知症です。世界中で根治的治療法の確立が切望されており、発症機構の解明が急務です。

ADの病理学的特徴の一つにアミロイドβ蛋白質(Aβ)の凝集・沈着(老人斑)があり、これが脳内で最も早期に発見される変化であることから、本来可溶性のAβが凝集・不溶化し神経細胞毒性を発現することがADの発症において重要な役割を果たすと考えられてきました。しかし、近年は老人斑と認知症の程度に必ずしも相関がないことから不溶性のAβ線維ではなく、可溶性のオリゴマーに注目が集まっています。Aβはβアミロイド前駆体蛋白質から切りだされ、主に40もしくは42残基のアミノ酸からなる分子種が生じます。このうち42残基のアミノ酸からなるAβ-(1-42)は、40残基のアミノ酸からなるAβ-(1-40)と比較して溶液中でより速やかに線維を形成し、より高い細胞毒性を示すことが知られています。一方、ガングリオシドを含む神経細胞膜はAβの凝集を促進することが報告されています。しかし、細胞膜上でのAβの凝集挙動の相違に関する研究はあまり進んでいません。

私たちの研究室では人工脂質膜を用いてガングリオ

シド-Aβ間の相互作用を検討してきました。これまでに、ガングリオシドがスフィンゴ糖脂質やコレステロールに富む脂質ミクロドメイン(脂質ラフト)でコレステロール濃度依存的にクラスターを形成すること、可溶性のAβがこのガングリオシドクラスターを特異的に認識し結合することで、βシートに富むコンフォメーションへと変化すること、そしてこの結合型Aβが核となってAβの凝集が促進されることを明らかにし、Aβ凝集モデルとして提唱してきました(図)。

私はこの人工脂質膜を用いた研究と臨床の橋渡しの一端として、生細胞膜とAβの相互作用を調べる研究を行っています。今回の発表では細胞膜上におけるAβの毒性本体の解明およびAβ-(1-42)とAβ-(1-40)の細胞膜上での凝集挙動の比較を目的としました。細胞膜上での観察には固定処理後の観察やAβに蛍光ラベルを施すアッセイ法が汎用されていますがそのようなステップはAβの存在状態を大きく変えてしまう可能性があります。またAβの線維やオリゴマーをあらかじめ形成させて細胞に投与するアッセイでは細胞膜存在下で形成されるAβ会合体とは異なる会合体の挙動を観察している危険もあります。そこで、共焦点顕微鏡を用いてなるべく生理的条件下に近い状態での観察を目指しました。ヒト神経系細胞由来のSH-SY5Y細胞にAβ-(1-42)またはAβ-(1-40)を投与した後、Aβ-(1-42)とAβ-(1-40)の結合は抗Aβ抗体とその蛍光標識二次抗体にて、アミロイド線維の形成はアミロイド染色試薬であるCongo redにて可視化し、細胞死は生細胞染色試薬を用いて判定しました。ここでのポイントは固定処理を行わず生細胞上での観察を行っている点、そして野生型のAβをモノマーの状態で添加している点です。細胞をAβ-(1-42)とインキュベートし、上述の抗体と染色色素を用いることでAβの細胞膜への結合、線維の形成、その後顕著な線維蓄積と細胞死を可視化することに成功しました。Aβ-(1-40)の場合も同様にその細胞膜への結合、線維形成、細胞死が観察されましたが、Aβ-(1-42)の10倍の濃度を必要としました。さらに全反射照明蛍光顕微鏡を用いて細胞膜周囲にAβ-(1-40)により形成された線維状の構造を確認することが出来ました。今回の実験で細胞死はAβ-(1-42)およびAβ-(1-40)のどちらの場合にも顕著な線維形成が認められた後に観察されたことから、線維によって細胞膜にもたらされる力学的ストレスが

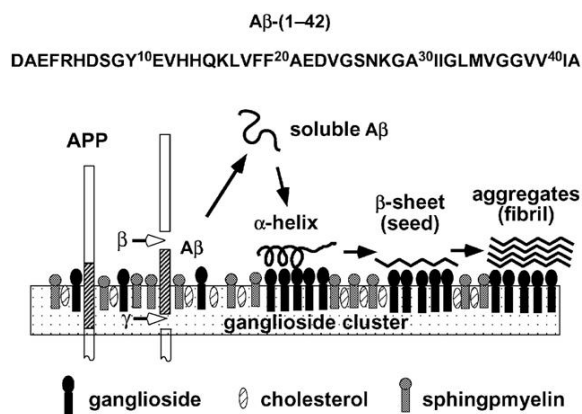


図 脂質ラフトにおけるAβアミロイド形成モデル

細胞死を誘発するのではないかと考えています。

今回のペプチド討論会は私にとって初めての学会で英語での口頭発表や種々の研究テーマに触れることが出来、とても新鮮で非常によい経験となりました。今回の学会で得たことを今後の活動にも生かしていきたいと思います。最後になりましたが今回の学会をお世話して下さいました九州工業大学の岡元孝二先生をはじめ、お世話になりました皆様方に心よりお礼申し上げます。

おがわ まりこ

京都大学大学院薬学研究科薬品機能解析学

ogawa.mariko@yakugakuf04.mbox.media.kyoto-u.ac.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@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：坂本 寛)