



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.78

2010年10月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

イオンチャネルを形成する 巨大ペプチド系天然物の全合成

はじめに

我々は、生物活性天然物の複雑な構造とそこに含まれる活性の秘密に魅せられ、天然有機化合物の有機化学による構築（全合成）に挑戦してきました。本稿では、巨大ペプチド系天然物ポリセオナミドBの全合成について紹介いたします^[1,2]。細胞膜のイオン透過に関与する天然物の有機合成は、我々の中心的な研究課題のひとつです。細胞は、膜タンパク質であるイオンチャネルを開閉して細胞内外のイオン濃度を制御します。この細胞内外のイオン濃度差、すなわち膜電位は、我々の感覚・感情・思考・動作を統御しています。天然物の中には、この巧妙に保たれているイオンバランスを乱すことで強力な毒性を発現する分子が知られています。我々が全合成に成功したイオンチャネルに作用するペプチド系天然物としては、海産性ラン藻由来の神経毒アンチラトキシン^[3]が、イオンチャネルとして機能する天然物としては海綿由来の細胞毒ポリセオナミドB^[4]が挙げられます。アンチラトキシンは、細胞に内在する電位依存性ナトリウムチャネルに結合し、開状態を安定化することで、ナトリウムイオンを細胞内に流入します^[4]。一方、ポリセオナミドBは、それ自体がイオンチャネルを形成し、一価カチ

オンを無制限に透過します^[5]。この2つの分子は作用機序が全く異なるものの、細胞内外のイオン流入を外部から化学的に制御できる点で共通しており、生物科学研究や創薬に役立つ研究題材分子として期待されます。特に、細胞内在性の標的タンパク質を必要としないポリセオナミドBの作用機序は、その強力な細胞毒性と相俟って非常に興味深いものです。

ポリセオナミドB

ポリセオナミドB (**1**) は、八丈島産海綿 *Theonella swinhoei* より単離・構造決定された天然物です(図1)^[6]。現在までに知られるペプチド系天然物の中では、最大の分子であり(分子量 5000)、培養癌細胞に対して pM レベルの極低濃度で毒性を示すことが報告されています。全48残基の直鎖配列には、多くの非タンパク質構成アミノ酸が含まれ、D体、L体アミノ酸が交互に並ぶ特徴的の一次構造は、タンパク質では見られないフォールディング様式を可能とします。CDCl₃/CD₃OH を溶媒とした **1** の NMR 解析では、分子全体に渡る β ヘリックス形成が観測されており、長さ 3 nm・内径 0.4 nm のナノチューブを形成することが明らかとなりました^[7]。このナノチューブは細胞膜を貫通するのに十分な長さを持っており、**1** のイオンチャネル活性を説明する構造要因と予想されています。

一般的に膜タンパク質イオンチャネルは、分子量5万を超える単量体が複数集まってイオンの通り道を形成します。一方、**1** はイオンチャネルタンパク質に比べて10分の1以下の分子量でありながら、単分子でチャネルを形成できることになります。この特徴を活かして我々は、**1** を分子基盤としたチャネル機能の構築と制御を研究目的としました。

非リボソーム由来ペプチドである **1** のアミノ酸配

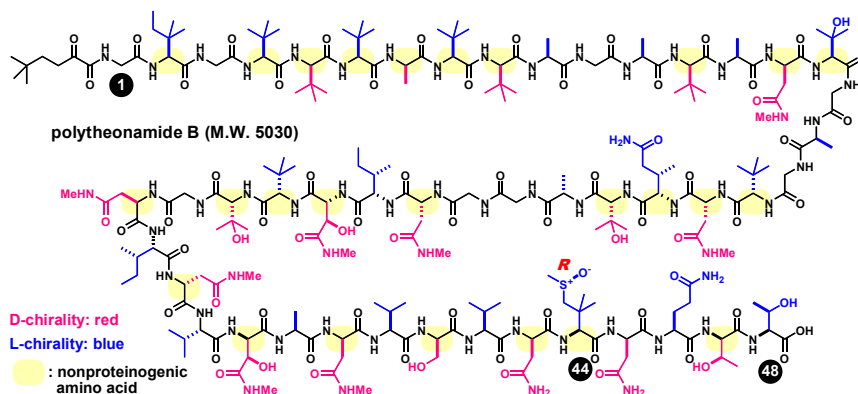


図1

列は、通常の遺伝子コードが適用できないため、遺伝子発現による調達は極めて困難です。また、大量の微生物が共生する海綿においては、生産生物の特定、単離、培養は非常に難しいことが知られています。全合成は、**1** とその合成類縁体を大量供給できる可能性がある唯一の方法となります。

合成計画

我々は **1** の全合成だけでなく、合成類縁体の詳細な機能解析、さらに天然物に本来存在しない新しい機能の付与を目的として、柔軟かつ収束的な合成戦略を立案しました。すなわち、**1** の全合成を、1. 非タンパク質アミノ酸の化学合成、2. ペプチドフラグメントの自動固相合成、3. フラグメント連結による全体構造の構築の三段階の階層に分割しました。この方法論を完成できれば、アミノ酸ユニットの置換、ペプチド部分構造の置換が各階層で可能であるため、**1** を構造基盤とした類縁体合成および新機能付与への研究展開が容易になります。

非タンパク質構成アミノ酸の合成

1 を構成する 20 種類のアミノ酸のうち、14 種類は非タンパク質アミノ酸です。この中で市販されていないものは 8 種類で、これに N 末端の α -ケトカルボン酸 (Ncap) を加えた 9 つのユニットを合成的に供給する必要があります。それぞれ個別に合成ルートを開発し、調製しました。アミノ酸ユニットは次の階層の固相合成で利用するために、N-Fmoc 体としました。例として、**1** の固有のアミノ酸である、(*S_R*)-L- β 、 β -ジメチルメチオニン S-オキシド (44 番目残基) の合成概略を、図 2 に示します。

4 大フラグメントの設計と自動固相合成

次に、合成した非タンパク質ユニットを含むアミ

ノ酸を自動固相合成機により連結しました (図 3)。**1** のアミノ酸配列は、水素結合のドナー / アクセプターや立体的に嵩高い β -置換構造を含んだ側鎖に富んでいるため、固相法ですべての構造を連結することは不可能でした。担持するポリマー、アミノ酸の縮合条件を種々検討したところ、16 残基以上の長さのペプチドフラグメントでは、収率が極端に低下することが判明しました。そこで、48 残基の **1** の全体構造を 10 残基程度の 4 大フラグメント [A (1-11), B (12-25), C (26-32), D (33-48)] に分割し、自動固相合成法により各フラグメントを合成しました。次の階層のフラグメント連結反応の効率を考慮し、C-末端 (第 11, 25, 32 番目残基) には連結反応の際にラセミ化の心配がない Gly を、N-末端 (第 12, 26, 33 番目残基) にはなるべく立体的に小さいアミノ酸を配置するように、各フラグメントを設計しました。また、側鎖に多くの極性官能基を持つフラグメント D (33-48) は、固相合成が困難であることが予想されたため、ヒドロキシ基を *t*-ブチル (*t*-Bu) 基で、第 1 級アミド基をトリフェニルメチル (Tr) 基で保護し、合成の効率化を図りました。以上の設計した 4 大フラグメント A (1-11), B (12-25), C (26-32), D (33-48) を Fmoc 法を用いて固相合成しました。

フラグメント連結とポリセオナミド B の全合成

ポリセオナミド B の全体構造を構築するために、4 大フラグメントの連結反応を検討しました。大きな分子の中の小さな反応点同士を繋ぐフラグメント間の連結反応は、一般的なアミノ酸縮合条件では極めて困難でした。そこで、ペプチドフラグメントの連結には、チオエステルを経由するカップリング反応を適用しました (図 4)^[8]。はじめに、フラグメント C (26-32) の C-末端のカルボン酸をチオエステルへと誘導し、フラグメント D (33-48) 存在下、銀塩で処理し

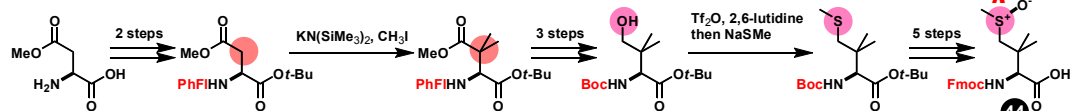


図 2

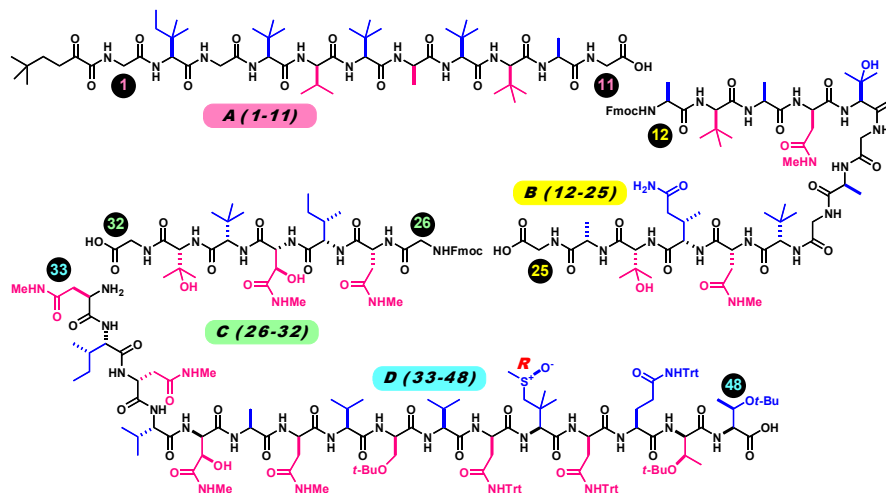


図 3

たところ、全体構造の半分に相当するフラグメントCD(26-48)を高収率で得ることができました。次に、チオエステル化したB(12-25)をCD(26-48)と連結し、BCD(12-48)を合成しました。さらに、チオエステルへと誘導したA(1-11)をBCD(12-48)と縮合し、保護された**1**の合成に成功しました。非タンパク質アミノ酸を大量に含み、D-体L-体が交互に並んだ配列を持つ非リボソームペプチド**1**のフラグメント連結においても、チオエステル法は強力な武器となりました。

最後に、アルコールを保護する3個の*t*-Bu基と、アミド基を保護する3個のTr基を、TFAを用いた酸条件下で同時に除去し、非リボソーム由来ペプチドで最大の分子であるポリセオナミドBの全合成を達成しました。

おわりに

我々は、巨大ペプチド系天然物である**1**の全合成法を開発しました。アミノ酸合成、フラグメント固相合成、フラグメント連結の階層的合成戦略を取り入れることで、巨大な**1**の分子構造を柔軟かつ収束的に構築することが可能となりました。この全合成方法論は、**1**だけではなく、類縁体の網羅的合成に利用されることが期待されます。すなわち、有機合成化学的な新機能付与・創製に向けた、化学基盤を構築できたと言えます。また、合成フラグメントを用いた機能研究では、**1**のアミノ酸配列が複数の機能をコードしていることが明らかとなりました。これはタンパク質に見られる機能ドメインに相当する性質であると考えられ、非リボソーム由来ペプチドを構造基盤とした人工機能分子の設計に新しい可能性を示すものと期待して

います。現在、より短工程で合成できる人工配列のポリセオナミド模倣ペプチドを設計・合成しており、新しい機能を持つ人工分子の創製を目指しています。

参考文献

- [1] Inoue, M.; Shinohara, N.; Tanabe, S.; Takahashi, T.; Okura, K.; Itoh, H.; Mizoguchi, Y.; Iida, M.; Lee, N.; Matsuoka, S. *Nature Chem.* **2010**, *2*, 280.
- [2] Matsuoka, S.; Mizoguchi, Y.; Itoh, H.; Okura, K.; Shinohara, N.; Inoue, M. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4644.
- [3] Okura, K.; Matsuoka, S.; Goto, R.; Inoue, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 329.
- [4] Cao, Z.; George, J.; Garwick, W.H.; Daden, D.G.; Rainier, J.D.; Murray, T.F.J. *Pharm. Exp. Therapeutics.* **2008**, *326*, 604.
- [5] Iwamoto, M.; Shimizu, H.; Muramatsu, I.; Oiki, S. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3995.
- [6] Hamada, T.; Matsunaga, S.; Yano, G.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 110.
- [7] Hamada, T.; Matsunaga, S.; Fujiwara, M.; Fujita, K.; Hirota, H.; Schmucki, R.; Güntert, P.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12941.
- [8] Aimoto, S. *Biopolymers* **1999**, *51*, 247.

いのうえ まさゆき

inoue@mol.f.u-tokyo.ac.jp

まつおか しげる

matsuoka@mol.f.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院薬学系研究科

統合薬学専攻

有機反応化学教室

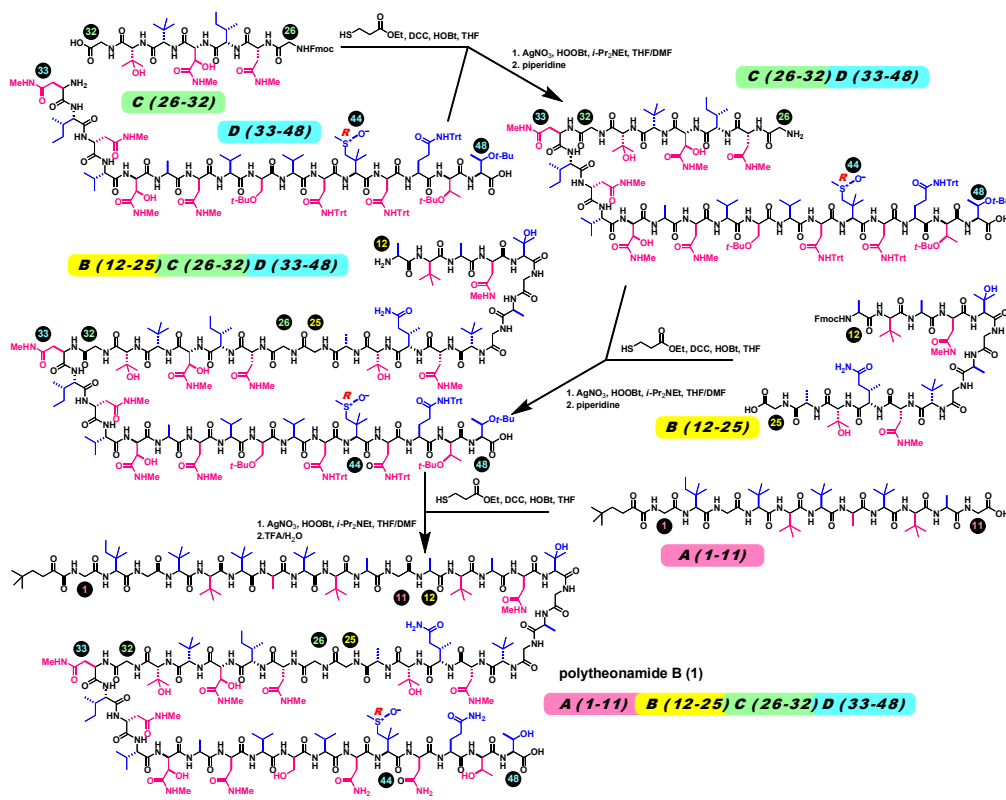


図 4

投げ縄構造を有する抗結核ペプチド，ラリアチン —微生物が造るユニークなペプチド抗生物質—

はじめに

天然由来の化合物は多様な構造を有することとユニークな生物活性を示すことが知られている。そして、これらの天然由来化合物は生体や細胞の機能を解明するためのツールとして有用であるだけでなく、新しい医薬品開発の素材としてもその重要性は広く認識されている。我々の研究グループでは、種々の生物、細胞、あるいは酵素・タンパク質を用いた評価系を確立し、微生物資源を対象に新しい生物活性物質の探索を実施してきた。それらの評価系のうち、*Mycobacterium smegmatis* を検定菌として用いて選択的な増殖阻害活性を示す化合物を探索した結果、ラリアチンと命名したペプチドを見出した。

本稿では我々が発見した投げ縄構造と呼ばれるユニークな立体構造を有する抗結核ペプチド，ラリアチンについて述べ、投げ縄構造を持つ一連のペプチドについて、これまで報告されている化合物および微生物ゲノム解析より明らかにされた投げ縄構造を持つペプチドの多様性について紹介する。

ラリアチンの発見^{1,2)}

我々は結核菌の類縁菌である *M. smegmatis* に選択的な抗菌活性を示す物質を探索し、土壌より分離した *Rhodococcus jostii* K01-B0171 株よりラリアチン A を発見した。ラリアチン A は 18 個のアミノ酸により構成され、N 末端のグリシンの α アミノ基と 8 番目のグルタミン酸の γ カルボニル基がアミド結合して環状構造を作り、さらに C 末端の尾部が環状部分を通り抜けた“投げ縄構造”を有していることが明らかとなった。我々は、ラリアチンの全合成をペプチド骨格を合



猪腰 淳嗣

成したのちマクロラクタム環を形成するスキームで試みたが、尾部を環部に通して投げ縄構造を形成させることはできなかった。生産菌では C 末端の尾部が E⁸-W⁹-V¹⁰-G¹¹ の β -ターン領域で折りたたまれた状態で環化反応が進行するものと推定している。

ラリアチンは、グラム陽性菌やグラム陰性菌には抗菌活性を示さず、*M. smegmatis* に対して強い抗菌活性を示した。また、ヒト型結核菌 *M. tuberculosis* に対しても低濃度で有効であり、我々が期待した通りの結核菌選択性を持った化合物であることが明らかとなった。このような高い選択性は、現在結核の薬物療法において第一選択薬として用いられているイソニアジドと類似している。ラリアチンの抗結核菌に対する作用機序はまだ明らかではないが、結核菌特有の標的分子に作用しているものと予想している。

微生物が生産する投げ縄ペプチド化合物

図 2 にこれまでに報告されている投げ縄構造と考えられているペプチドを示した。これらの化合物はすべて微生物によって生産される。構造の特徴に注目すると、これらの化合物は 3 つのグループに分類することができる。すなわち、N 末端のグリシンと 8 番目ま

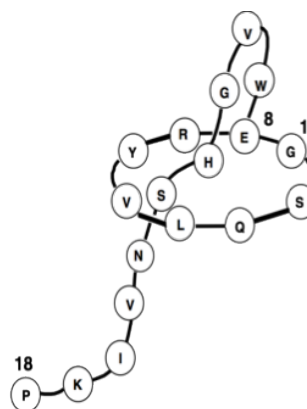


図 1 ラリアチン A の構造

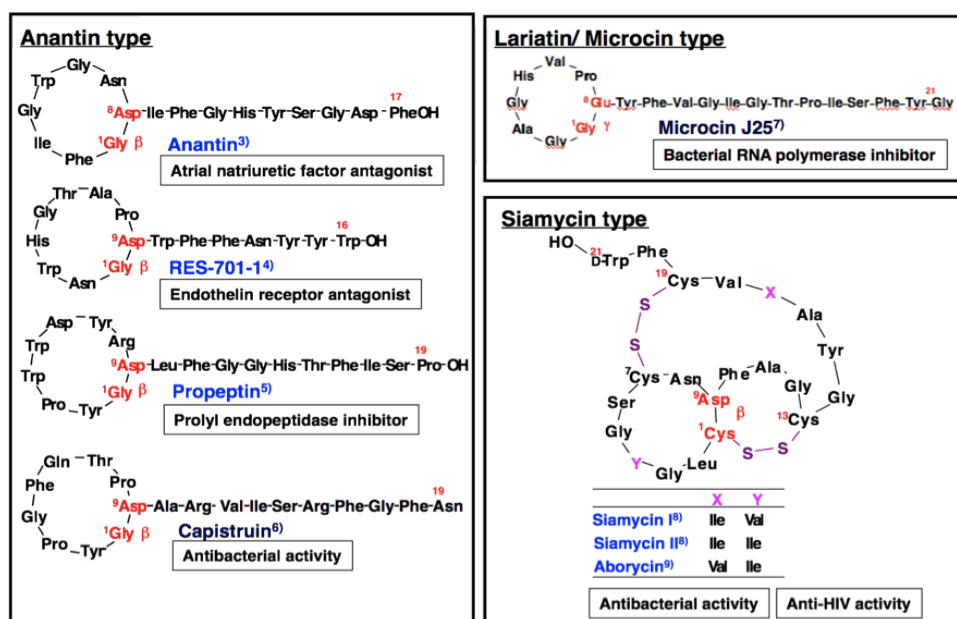


図 2 投げ縄構造を有するペプチド

たは9番目のアスパラギン酸の β カルボニル基が環状構造を形成している化合物群（アナンチンタイプ）、N末端のグリシンと8番目のグルタミン酸の γ カルボニル基が環状構造を形成している化合物群（ラリアチン/マイクロシンタイプ）そして、N末端のシステインと9番目のアスパラギン酸がマクロラクタム環を形成し、さらに分子内に保存された4分子のシステイン残基により2組のジスルフィド結合を形成しているシアマイシンタイプである。

これらの投げ縄ペプチドは心房性ナトリウム利尿因子受容体拮抗作用（アナンチン）、エンドセリン受容体拮抗作用（RES-701-1）、プロリルエンドペプチダーゼ阻害作用（プロペプチン）、抗菌活性（マイクロシン J25、カプストリン）、抗免疫不全ウイルス（HIV）増殖抑制作用（シアマイシン）など多様な生物活性が報告されている（図2）。各々の投げ縄ペプチドのアミノ酸配列には環化に関係するアミノ酸残基以外に共通性は見られず、生物活性の特徴はアミノ酸配列が決定しているものと考えられる。

マイクロシン J25 は初めて報告された投げ縄構造のペプチドで、RNA ポリメラーゼを阻害してグラム陰性菌に対して抗菌作用を示す。マイクロシン J25 は生合成についても詳しく研究されています。また、カピストリンは *Burkholderia thailandensis* E262 のゲノムより発見された生合成クラスターを大腸菌で発現させ、生産された投げ縄ペプチドである。

投げ縄ペプチドの生合成

投げ縄ペプチドの生合成については、マイクロシン J25 が最も明らかにされている¹⁰⁾。マイクロシン J25 の生合成遺伝子は4つのオープンリーディングフレーム (*mcjA* ~ *mcjD*) からなり、ポリシストロニックなオペロンを形成している。その生合成機構は *mcjA* からマイクロシン J25 前駆体ペプチドが翻訳されたのち、*mcjB* 産物と *mcjC* 産物により、シグナルペプチドの切断と環化反応が進行し、最後に *mcjD* がコードする ABC トランスポーターによって菌体外に分泌される。我々もラリアチン生合成遺伝子を取得することに成功しており、マイクロシンとほぼ同様のメカニズムであると推定している（未発表）。

投げ縄ペプチドを化学合成する方法はまだ確立されていない。しかし、ラリアチンの生合成遺伝子を利用すれば、アミノ酸配列を改変した変異ラリアチンを容易に作成することが可能となる。今後、ラリアチンのファーマコフォアの解明を目指して展開していきたいと考えている。

微生物ゲノムに見られる投げ縄ペプチドの可能性

多くの生物の全ゲノムが解析され、マイクロシン J25 生合成遺伝子クラスターと類似した構造が微生物のゲノム中に発見されている。Severinov らはマイクロシン J25 の生合成遺伝子のうちペプチダーゼと環化酵素のホモログを blast 検索したところ、 α 、 β 及び γ -

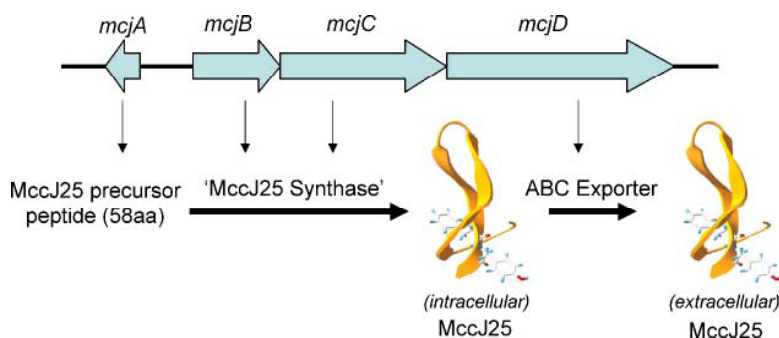


図3 ミクロシン J25 の生合成¹⁰⁾

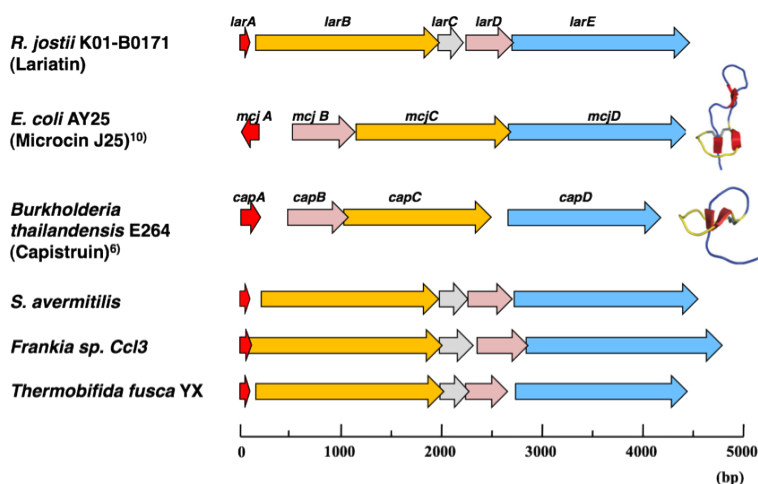


図4 ゲノム上に見出された投げ縄ペプチド生合成遺伝子
カピストリンは Blast 検索で発見された遺伝子クラスターを大腸菌で発現させ、投げ縄ペプチドが単離された。

ロテオバクテリア群やアクチンバクテリア群に分類される微生物のゲノムにミクロシン J25 生合成遺伝子と類似した遺伝子群が存在することを見出した¹¹⁾。図4にその構造を示したが、アクチノバクテリア群に属する *Streptomyces avermitilis*, *Frankia* sp., および *Thermobifida fusca* YX から見出されたクラスターは、ラリアチン生合成遺伝子クラスターと同じ構造であり、各遺伝子の並ぶ順番も同じであった。これらの生合成遺伝子産物はまだ同定されていないが、前駆体ペプチドはそれぞれ固有のアミノ酸配列を有しており、その生物活性に興味を持たれる。

おわりに

ラリアチンは強い抗結核菌活性と高い結核菌選択性を持つペプチド化合物である。既存の抗結核薬にも同様の結核菌選択性を示す化合物があるが、それらとは異なる標的分子に作用していることがわかってきた。今後、ラリアチンの生合成機構を解明し、アミノ酸置換体による構造活性相関と標的分子の解明を進め、新しい抗結核薬の創薬研究につなげて行きたいと考えている。

投げ縄構造のペプチド化合物は多様な生物活性が報告されている。一方、微生物ゲノムには未知の投げ縄ペプチドが眠っていることが分かってきた。ゲノム情報から予測される投げ縄ペプチドを効率よく発現させて構築した化合物ライブラリーは、新しいタイプの分子プローブや創薬研究のシーズとして期待される。

本研究は北里大学薬学部と北里生命科学研究所の共同研究で行われたものである。

参考文献

- 1) Iwatsuki, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7486 (2006)
- 2) Iwatsuki, M. *et al.*, *J. Antibiot.*, **60**, 357 (2007)
- 3) Weber, W. *et al.*, *J. Antibiot.*, **44**, 164 (1991)
- 4) Morishita, Y. *et al.*, *J. Antibiot.*, **47**, 269 (1994)
- 5) Kimura, K. *et al.*, *J. Antibiot.*, **50**, 373 (1997)
- 6) Knappe, T. A. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 11446 (2008)
- 7) Bayro, M. J. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12382 (2003)
- 8) Nishio, M. *et al.*, *J. Antibiot.*, **48**, 433 (1995)
- 9) Helynck, G. *et al.*, *J. Antibiot.*, **46**, 1756 (1993)
- 10) Solbiati, J. O. *et al.*, *J. Bacteriol.*, **181**, 2659 (1992)
- 11) Clarke, D. J. *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2564 (2007)
- 12) Severinov, K. *et al.*, *Mol. Microbiol.*, **65**, 1380 (2007)

いのこし じゅんじ
北里大学薬学部 微生物薬品製造学教室 准教授
inokoshij@pharm.kitasato-u.ac.jp

糖脂質マイクロドメインと膜受容体の相互作用解析

1. はじめに

膜の不均質性が生体膜において重要な役割を果たしていることがこれまでの研究で実証されており、Lipid Raft (マイクロ



樺山 一哉

ドメイン) の概念がその基盤となっている。しかしながら、Lipid Raft 研究の分野では解析手法が手詰まりの状態、生体膜を時空間に支配された液層として研究する物理的手法はまだ開発途中である。これが実際の細胞を解析する際の生物学的手法、物理化学的手法との間に大きな溝を作っている。

Lipid Raft の一種、糖脂質マイクロドメインの構成成分として知られているガングリオシドは、シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質 (GSL) ファミリーの総称であり、GM3 はその生合成経路における最初の分子である。GM3 はヒトを含む哺乳動物の種々の細胞に広く発現していることから、その生理機能および病態生理学的意義が注目されている。ガングリオシドは細胞膜表面に発現し癌細胞の接着や浸潤、受容体活性、増殖因子様活性、細胞間認識などに関与しており、癌の悪性度との関連においても多数の報告がある。これらの作用機序の一つとして膜受容体分子の糖脂質マイクロドメインへの集積あるいは解離が想定されている¹⁾。しかしながらその解析手法は、ショ糖密度勾配遠心法を主軸とした「界面活性剤に不溶性か可溶性か?」によって細胞膜上の不均質な局在を評価する方法にとどまり、この域を脱していない。また汎用される TRITON™ のような非イオン性界面活性剤は脂質-タンパク質相互作用を切る性質を持つため、静電的相互作用も考慮にいった「膜受容体分子の糖脂質マイクロドメインへの集積あるいは解離」の評価は困難であると考えられる。

そこで筆者は糖脂質マイクロドメインと膜受容体の相互作用解析に「界面活性剤」を使わない別の手法として、蛍光顕微鏡を用いた分子動態解析を導入することを考えた。近年、蛍光標識分子を用いた可視化技術の発展は目覚しく、基礎研究のみならず臨床応用も視野に入れた分子動態解析が注目されている。

筆者らは以前に、脂肪細胞のインスリン抵抗性作用機序として、カベオリン 1 (Cav1) に結合してカベオラに局在するインスリン受容体 (IR) が GM3 との静電的相互作用によりカベオラから解離し、シグナルを抑制することが原因の一つであることを、共焦点顕微鏡を用いた光退色後蛍光回復 (FRAP) 法および全反射顕微鏡を用いた膜分子の動態観察法を用いて実証している²⁾。今回はこの手法を簡単にご紹介し、これからの糖脂質マイクロドメインと膜受容体の相互作用解析について展望する。

2. FRAP 法を用いた分子動態解析

FRAP 法ではターゲットとなる分子に蛍光標識を施すことが必要である。その標識分子を発現させた細胞において解析したい領域 (ROI) に強いレーザーを短時間照射し、分子の機能を壊すことなく蛍光のみを退色 (ブリーチ) させる。もし目的分子が不動ならば、ブリーチ領域の蛍光は回復しない。動的な分子ならば、拡散することで、周囲の未退色分子が混ざり合い、ブリーチ領域の蛍光は回復していく。この時間経過にともなう蛍光回復率をグラフにプロットすることで、目的分子の動的成分比率や拡散速度を算出することができる (図1)。

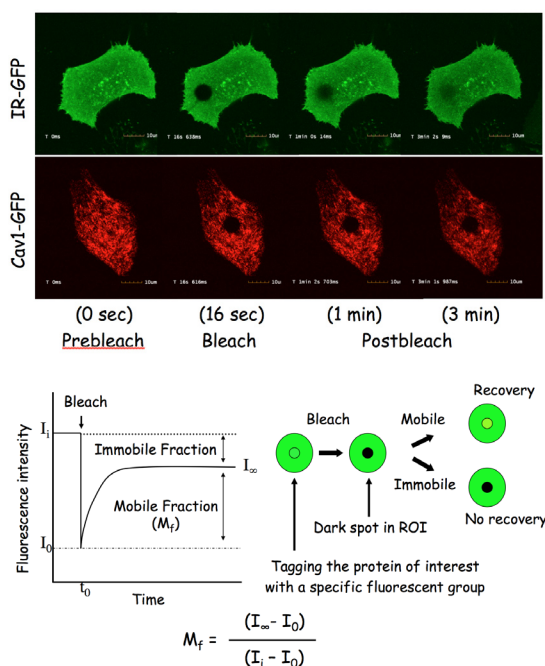


図1 (上図) FRAP 法の実例:HeLa 細胞にインスリン受容体 (IR) およびカベオリン 1 (Cav1) の GFP 融合タンパク質 IR-GFP および Cav1-GFP を発現させ、それぞれ膜表面を共焦点顕微鏡により時系列的に観察した。測定開始 16 秒後に ROI (測定領域) をブリーチし、1 分後、3 分後の画像を取得した。IR は細胞膜上に拡散するので ROI の蛍光強度が時間と共に回復している。一方 Cav1 はカベオラ構造を形成し不動化しているため、蛍光強度が回復しない。(下図) 蛍光回復率の時間経過を示すグラフと FRAP の概念図: 回復曲線の終了点 (カーブフィッティングにより予測可能) から目的分子の動的成分比率を求めることができる。また曲線の立ち上がりの度合いから拡散速度を (拡散係数として) 算出することもできる。

3. Cav1 と IR の相互作用解析

この手法を用いて細胞に発現させた IR-GFP 融合蛋白質および Cav1-RFP 融合蛋白質の動的成分の比率を測定した。IR-GFP 融合蛋白質のみを発現させた HEK293 細胞において、IR-GFP の蛍光回復率は 60 % であった。一方、IR-GFP と Cav1-RFP を共発現させた場合、Cav1-RFP が形成するドット状の構造体 (Cav1 が形成するカベオラ構造と推定される) が含まれる領域においては、IR-GFP の蛍光回復率は 25% 程度まで減少した。この減少効果は、IR との結合ドメイン (スキヤフォールドドメイン) を不活化した変異体 (Cav1^{F92A/V94A}-RFP) との共発現では起こらなかった (図 2)。以上のことから、FRAP 法によって IR の動的比率すなわち不動化した Cav1 との結合比率を測定できることを確認した²。

4. GM3 と IR の相互作用解析

次にこの解析法を用いて、細胞表面上の酸性糖脂質 (この場合は GM3) の発現変化が IR の結合比率に影響を及ぼすのかを検討した。まず、筆者らが以前に構築していた GM3 再構成細胞 (GM3 + 細胞) とその親細胞 (GM3 - 細胞) において

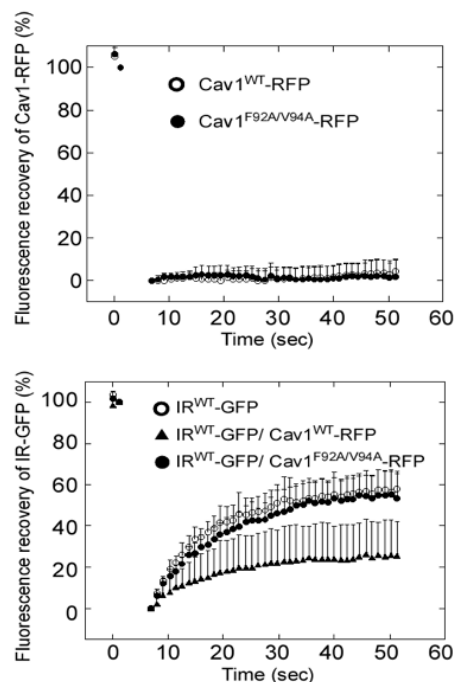


図2 IR-Cav1 複合体の相互作用解析

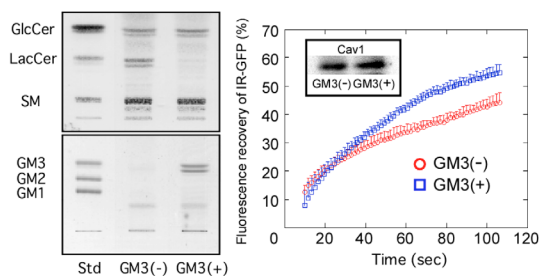


図3 GM3 再構成細胞を用いた検討

FRAP 法を行った。その結果、GM3+細胞において IR-GFP の蛍光回復率が 10% 程度高かったことから、細胞膜上で GM3 の発現上昇が IR-Cav1 複合体の解離を促進することが示された (図 3)。

細胞において、IR と Cav1 は細胞膜内側で結合して存在している。一方、GM3 は外膜側に存在し、非還元末端に酸性基であるシアル酸を有している。IR は膜貫通領域の細胞外側直上に塩基性アミノ酸のリジンを持つ。ところで、膜近傍には電荷の勾配が存在しており、細胞内膜では膜脂質 (酸性リン脂質ホスファチジルセリン) と C-キナーゼタンパク質のリジnkラスターとの静電的相互作用が細胞内のシグナル制御に関与していることが物理化学的に実証されている³。このことから、外膜においても GM3 が IR-Cav1 複合体に与える影響として、GM3 と IR の静電的相互作用が考えられた。そこで、IR の膜貫通領域直上のリジンを他のアミノ酸残基に置換して FRAP 法を行った。その結果、中性アミノ酸であるバリン、セリン、グルタミンに置換した IR-GFP 変異体全てにおいて、蛍光回復率の低下が見られた (図 4)。以上の結果から、GM3 の発現上昇によって (GM3 の形成する糖脂質マイクロドメインの出現頻度が上昇したと筆者は推察している) IRβ サブユニットの細胞膜直上のリジン残基

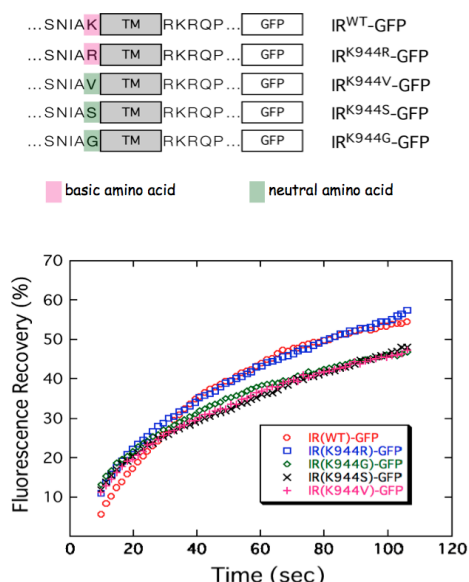


図4 IRの膜直上アミノ酸変異体を用いた検討

と GM3 のシアル酸残基の静電的相互作用が増大した結果、IR-Cav1 複合体が解離する分子機構が明らかにされた²。

5. 全反射顕微鏡を用いた膜分子の可視化

全反射顕微鏡も膜受容体の側方拡散を解析する上で有用な装置である。以前に筆者らは、全反射顕微鏡を用いて細胞膜上の IR-GFP と Cav1-GFP の動態観察を行った²。しかし、拡散速度を測定する上では GFP は退色が激しいため条件設定に制約が生じる。そこで現在は、GFP の代わりに低分子リガンドと特異的な共有結合を形成するタグタンパク質を利用した Halo-Tag テクノロジー (プロメガ社) を用いて、テトラメチルローダミン (TMR) を標識した IR-TMR および Cav1-TMR を作成し、解析を行っている。これにより標識分子の形成する粒子 (1 分子であるかどうかは検証の必要がある) の拡散係数をヒストグラムとして表示することが可能になる。つまり、ウエスタンブロットなどの生化学的データが反応の平均を示しているのに対して、各々の分子の反応パラメータの分布をみることができる。このことは、カベオラや糖脂質マイクロドメインなどが存在する不均質な膜分子環境において、受容体の動態を調べるのに適した手法であると筆者は考えている。

また、拡散係数の計測においては、輝点追跡ソフト「G-Track (ジートラック)」(ジオングストローム社) を使用することにより、画像取得後の解析までの行程をスムーズに進めることが可能になった (図 5)。具体的な使用法などはジオングストローム社の HP にユーザー事例として記載しているので興味のある方は参照されたい。
(http://www.g-angstrom.com/contact/user_kabayama.php)

6. おわりに

このところ蛍光顕微鏡装置は、超解像の原理を模索し実用化していく新たな潮流がある一方で、既存の装

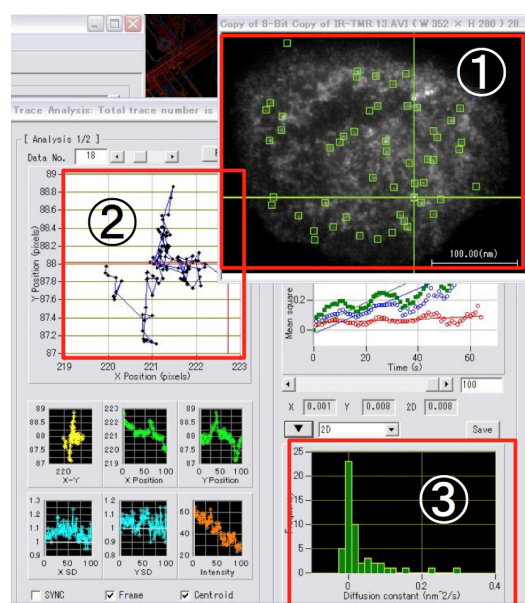


図5 1 粒子解析の実例 ① IR-TMR を発現させた細胞の AVI 画像。② 1 粒子のトレース結果 (①の緑線が交差した輝点)。③ 追従可能な輝点全ての拡散係数のヒストグラムプロット

置をさらに使いこなすべく、解析手法やアプリケーションソフトの改良が施され、イメージングの機器から計測機器へと日々発展を遂げている感もある。上述したように FRAP 法も蛍光回復曲線に対し非線形カーブフィッティングを行うことで、異なる速度成分に分離することが可能であり、そこから膜の質的变化を予想することもできる (現在解析中)。また最近では、蛍光相関スペクトル法 (FCS) の概念を二次元に拡張した画像相関スペクトル法 (ICS) が話題に上るようになってきた。とりわけ筆者は、既存の共焦点顕微鏡を用いて解析できるラスタ画像相関スペクトル法 (RICS) が膜分子の拡散測定や相互作用解析に有用であると考えており、糖脂質マイクロドメインの生命現象への積極的な関与をこの手法で実証できないかと試行錯誤の日々である。

最後に本研究は札幌、仙台と場所を移しながら常に暖かくも厳しくご指導頂いた井ノ口仁一教授 (東北薬科大学 分子生体膜研究所) の下で、多くの共同研究者と共に実施した研究、およびそれを進展させたものである。共同研究者各位にこの場を借りて感謝申し上げます。またこの雑文がペプチド分野の皆様の目にとまり、ご研究の一助にでもなれば幸甚である。

参考文献

- 1) Inokuchi J and Kabayama K, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **20**, 353-371, 2008
- 2) Kabayama K, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 13678-13683, 2007
- 3) McLaughlin and Murray, *Nature* **438**, 605-611, 2005

かばやま かずや
東海大学 糖鎖科学研究所・准教授
kaba@tokai-u.jp

シカゴ大学留学記

私は2006年10月より2009年9月までの3年間、米国シカゴ大学のStephen Kent教授の研究室に留学する機会を得ました。2005年秋にKent教授より一通のメールを頂戴し、国際学会で仲良くなった当時Kent研の大学院生が私を薦めてくれた縁で、博士研究員としてお誘いをいただきました。その後、2006年春にKent研を訪問・セミナー発表をさせていただき、同年秋にKent研での研究がスタートしました。

シカゴ大学はこれまでにノーベル賞受賞者を87名輩出し、私の留学中にも南部陽一郎先生が2008年ノーベル物理学賞を受賞されました。(図1)

Kent研は、化学的アプローチにより蛋白質の新しい機能を捉えることに専念しています。化学的な蛋白質合成により、様々な非天然構造を分子に導入することができ、例えば鏡像体蛋白質、翻訳後修飾された蛋白質、ラベル化蛋白質などを調製することができます。そしてそれらを利用することで蛋白質の新しい機能が明らかになる可能性があります。

Kent研では1991年、ペプチド鎖C末端のチオカルボン酸ともう一つ別のペプチド鎖N末端プロモアセチル基との化学選択的なライゲーション反応によりHIVプロテアーゼの全合成を達成しました^[1]。この場合、縮合点はチオエステル結合になりますが、Kentらはその後1994年に「native chemical ligation法」を発表しました^[2]。本法は、ペプチド-チオエステルとN末端システイン-ペプチドとの化学選択的な反応と続くS-to-N分子内アシル基転位反応により、ペプチド鎖同士をアミド結合により縮合するものであります。重要なビルディングブロックであるペプチドチオエステルは大阪大学・蛋白質研究所の相本三郎先生、北條裕信先生(図2)のグループにより初めて開発されました^[3]。Kent研では現在でもライゲーション法を基盤とした化学合成法に様々な角度から改良を重ねており、より高分子量の蛋白質も効率的に合成可能になりました。得られた合成蛋白質は、X線結晶構造解



相馬 洋平

析、物理化学的性質の解析、構造-活性相関解析などへ供することが一般的です。

私自身のテーマの一つにインスリンを扱った研究がありました。インスリンの全合成は1960年代には、Zahnグループ、Katsoyannisグループ、上海生物化学研究所のグループ、Merrifieldグループによってそれぞれ達成されました。しかしながら、これらの合成法においてはA鎖とB鎖間におけるフォールディング/ジスルフィド結合形成効率の低さが大きな問題となります。一方、生体内においてはプロインスリン(C-peptideを含む一本鎖蛋白質)における効率良いフォールディング/ジスルフィド形成反応とそれに続くC-ペプチドの酵素的切断によりインスリンが生合成されています。本プロセスを模倣して1970年代に、Brandenburg-Wollmer, Geiger-Obermeier, Busse-Carpenterのグループがそれぞれ、A鎖N末端とB鎖C末端付近を化学的なリンカーで結合したミニプロインスリンを合成し、それらの分子における効率的なフォールディングを報告しました。我々は、本概念を発展させることによりインスリンの効率的な化学合成法の開発を目指しました。

まずはオキシムライゲーション法に基づき化学的なミニプロインスリン分子を合成することでインスリンの全合成を達成しましたが、本法では化学リンカーの構造が複雑であり、またミニプロインスリンからインスリンへの変換は酵素反応に依存していました^[4]。そこでさらに実用的な合成法を模索する中で、我々はThr^{B30}側鎖とGlu^{A4}側鎖が立体的に隣接していることに着目し、それらを直接エステル結合で連結した「エステルインスリン」をデザインしました。エステルインスリンのポリペプチド分子は、native chemical ligation法を利用して合成しました。得られたポリペプチドをredox bufferに溶解したところ、プロインスリンと同様、効率良くフォールディング/ジスルフィド形成反応が進行し、エステルインスリンを高い収率で与えることがわかりました。また、エステルインスリンは鹼化反応によりほぼ定量的にヒトインスリンへと化学変換でき、得られたインスリンは完全な受容体結合活性を示しました。このように、Thr^{B30}-Glu^{A4}間のエステル結合は、プロインスリンのC-ペプチド(35残基)と同等、効率の良いフォールディングを可能としました。本成果は、シンプルかつ効率的なインスリン

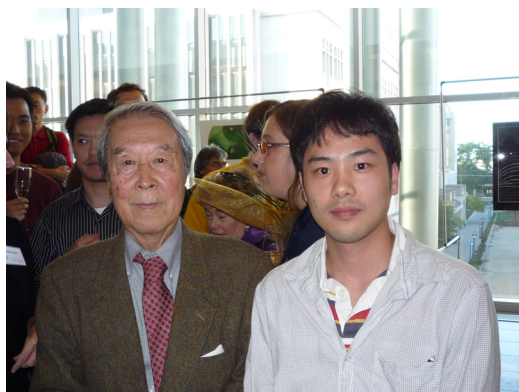


図1 ノーベル物理学賞受賞 南部陽一郎先生と。シカゴ大学 Gordon Center for Integrative Science 内にて。



図2 21st American Peptide Symposium (Bloomington)にて。左より著者、北條裕信教授、Stephen Kent教授、Paul Alewood教授

化学合成法の実現に貢献できる可能性があり、非天然構造を有する新しいタイプのインスリン誘導体の効率的創製に繋がるものと期待しています^[5,6](図3)。

Kent 研はペプチド・蛋白質の化学合成分野において脈々と蓄えられてきた独自の知識と経験があります。私も、そのような息吹を感じ、感銘を受けながら、楽しく留学生活を送ることができました。最後になりましたが、本留学に際しては、恩師である木曾良明教授(京都薬科大学)、Stephen Kent 教授を始めとして多くの先生方に大変お世話になりました。この場をお借りして心より御礼を申し上げます。また、本留学は日本学術振興会の(海外)特別研究員制度の助成によるものです。本留学記が、これから留学する方々にとって一助になれば大変幸いに存じます。

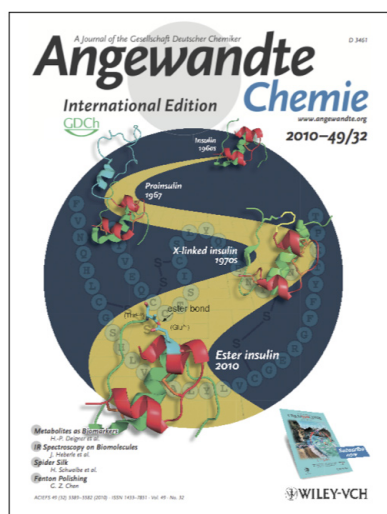


図3 *Angew. Chem. Int. Ed.*, year 2010, volume 49, issue 32 の表紙にハイライトされたエステルインスリン研究。

参考文献

- 1) M. Schnölzer and S.B.H. Kent, *Science*, **256**, 221-225 (1992).
- 2) P.E. Dawson, T.W. Muir, I. Clark-Lewis, S.B. Kent, *Science*, **266**, 776-779 (1994).
- 3) H. Hojo and S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 111-117 (1991).
- 4) Y. Sohma and S.B.H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 16313-16318 (2009).
- 5) Y. Sohma, Q.-X. Hua, J. Whittaker, M.A. Weiss, S.B.H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 5489-5493 (2010).
- 6) H.-J. Musiol and L. Moroder, *Angew. Chem. Int. Ed.*, Highlights, published online at 16 AUG 2010 (DOI: 10.1002/anie.201003018).

そうま ようへい
京都薬科大学 薬品化学分野 助教
ysohma@mb.kyoto-phu.ac.jp

芝先生追悼文



芝哲夫先生(財団法人蛋白質研究奨励会・ペプチド研究所所長、大阪大学名誉教授、ペプチド学会名誉会員)は、去る2010年9月28日肺炎のため86歳でお亡くなりになりました。先生は広島県尾道市にお生まれになり、ご幼少のころから大阪で過ごされました。大阪府立浪速高等学校、大阪帝国大学理学部化学科をご卒業後、大阪大学理学部の助手、助教授を経て1971年からは金子武夫先生の後をついで教授に就任されました。先生は大学入学以来定年退職されるまで2年余り米国のNIHへ留学されましたが一貫して大阪大学に籍をおかれました。

芝先生は長距離を歩いてどこへでも行かれるお元氣な先生という印象をお持ちの方が多くと思います。しかし2010年始めからは体調を崩され、ご自宅と病院での療養を繰り返されながら、病床から何度かの講演に出向かれ、最後まで意欲的に日本のペプチド化学、糖質化学、化学史研究など発展のために貢献されました。私、一番に思い出されることは、今年6月の始めに行われました芝研究室の同窓会(離合会)において弟子たちに一言お話ししたいという強いご希望で不自由なお体を押して出席され、十数分間お話をされたことです。次の世代を担う者へ叱咤激励のお言葉を一同大変感慨深く伺いました。それから3ヶ月余りで先生のご逝去の報に接し、先生のご指導を受けた者の一人として大変残念に思います。

先生のお仕事は特異な構造のアミノ酸を含む生理活性ペプチドの合成研究を中心に幅広く行われ、数多くペプチド討論会にて発表されました。また教授に就任後は糖質の分野にも研究の領域を広げられ、輝かしい成果を数々残されました。1958年に赤堀先生の発案で尼崎のキリンビールの工場内で第1回のペプチドシンポジウム¹⁾として研究会が行われ5件の発表があったそうで、そこで芝先生は *Glutamyl- α , γ -diglutamic acid* の合成と題して発表されています。その後、大阪で行われた第15回ペプチド化学討論会(1977年)を主催され、さらに特筆すべきこととして最初のペプチド国際学会として神戸で行われた JASPEC '87 の開催に組織委員長として尽力され、その中心的な役割を果たされたことであります。この国際会議は欧・米ではペプチドシンポジウムが毎年交互に開催され国際学会的要素を持っていた時期に日本のペプチド化学のレベルを海外に示すことが出来た画期的な出来事と思われます。また1990年には泉屋信夫先生、矢島治明先生と共に日本ペプチド学会の最初の名誉会員になられてお

ります。このように芝先生は日本のペプチド化学の黎明期から国内のペプチド討論会の発展のみならず、国際学会の開催にも多大のご努力をされ日本のペプチド化学の発展にご尽力されました。

ここにあらためて芝哲夫先生のペプチド化学へのご貢献を感謝し、またこれまでご指導頂きましたことにお礼を申し上げ、ご冥福をお祈り申し上げます。

- 1) 正式には 1962 年に大阪大学蛋白質研究所で行われたセミナーがペプチド討論会の第 1 回とされている。

豊島 正 (株式会社ペプチド研究所)

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)