



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.80

2011 年 5 月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

この度の東日本大震災におきまして
被災されました方々に
心よりお見舞い申し上げますと共に
一日も早い復興をお祈りいたします。

東日本大震災：山形からの通信

3月11日午後2時46分宮城県三陸沖を震源とする巨大地震が発生しました。宮城県北部では震度7を記録しマグニチュードは9.0と報告されています。そしてそれに続く余震、高さ25メートルを越える大津波により東北から関東500kmにもおよぶ太平洋沿岸地域は戦後最悪の被害をうけました。死者、行方不明者は3万人に迫る勢いです。しかしこれだけにとどまりません。この大災害によって福島第一原子力発電所の制御機能が失われることになり、福島県民はもとよりその周辺に緊張が走っています。



今野 博行

このような災害において亡くなられた方々にお悔やみ申し上げます。また被災者の方々にはお見舞い申し上げますと共に一日も早い復興をお祈り申し上げます。このニュースレターを読んでいる方の中にも不自由な生活、研究環境を強いられている方も多いかもかもしれません。力を合わせてがんばってまいりましょう。本稿は山形在住の筆者からの報告です。

地震発生時、私は山形県米沢市にある研究室でHPLCを眺めていました。Aβをうまく作れたかうきうきしていたのを覚えています。私(宮城県人)にとって地震は日常で、またか、くらいの気持ちでした。しかし揺れが止まりません。3階にある研究室では、揺れが大きくて立っているのがやっとでした。大きく揺れる機器類を必死に手で押さえつつも、建物が崩れるかもしれないという恐怖もありました。2分後、幸いにも私の研究室はケガ人、大きな被害もなく、その余韻だけが残っていました。直感的に震源は宮城あるいは福島沖、山形でこれなら太平洋側は大変だろうと思

いましたが、まさかこれほどまでとは。その後緊急避難となり、余震、停電、降雪の中の帰路となりました。

ライフラインが途絶えた状況で、津波が三陸の街を飲み込んだこともほとんど知らずに2日間家で過ごしました。状況把握後、水と食糧を持って安否確認のため宮城に入りました。故郷である宮城には両親、兄弟をはじめ多くの親族や友人が暮らしています。道中、信号は機能せず、段差、陥没、うねりだらけ、出歩く人はおらず、すべて閉店、屋根や壁が落ちた民家多数、そして多くの災害派遣車が往来しており、今までに経験したことのない緊張感でした(私が通行した所は報道に出て来る被災地ではありません)。両親と兄弟家族の無事を確認して宮城を後にしました。山形に戻ると大学が2週間閉鎖となり自宅待機になりました。被害はないものの、食糧、ガソリン不足、交通機関の停止では行動も制限され、結局家のテレビで惨状を見ることができず、生きていることへの感謝と同時に自分の無力さを痛感する日々でした。

連日の報道にもありますが、未だ原発などは小康状態で、東日本各地で余震が続いています。山形にも避難生活を送られている方が多数おります。東北地方も電力不足から計画停電が予定され、スーパーの棚にはまだ隙間が見受けられます。しかし少しずつ復興に向けて動き出していると感じています。山形大学も節電第一で活動を再開しており(暗くなったら帰らなければいけない。現在薄暗い部屋で執筆中です。また朝5時に起きて、一人サマータイム実施中です!)機器類の半分も稼働できず研究活動に制約はありますが、HPLCを動かした時は新鮮な感動を覚えました。私の研究室は無傷でしたが、学内でも多数の機器類、建物に被害があり今後全容が明らかになると思われます。また本学は東北、北関東出身者で学生の9割を構成し多数の被災者がおります。これから新年度がスタートする中で精神的、経済的なケアを大学全体で行う準備

を進めています。

山形は直接の被災地ではありませんが、宮城、福島との結びつきが強く以前通りの生活、研究環境に戻るにはしばらく時間がかかるかと予想されます。そのため、7月31日から8月2日に山形蔵王で開催予定の「若手ペプチド夏の勉強会」を中止にすることにいたしました。今年で44回目を迎えるはずであった伝統ある本集会を中止せざるを得なかったこと、ただ残念でなりません。深くお詫び申し上げます。近い将来、皆様をお招きできる日が必ず来ると信じております。

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

仙台からの報告

3月11日（金）に起きたマグニチュード9.0の大地震とその後の津波により、東北地方、特に岩手、宮城、福島は大きな被害を受けた。ニュースや新聞で報道されているように、津波により壊滅的な被害を受けた沿岸部では、2ヶ月近くたった今もなお、多くの行方不明者がみつからず、10万人を超える被災者が市民センターや体育館等で避難生活を送っている。体育館で支援をしている知人の「避難所は、まだ3月11日のままほとんど変わらない」との言葉が印象的である。長期的な支援の中、支援者側も含めた心のケアが重要となりつつある。

東北大学も、女川にある農学研究科の施設が直接津波の被害を受けたほか、青葉山の工学部の電子系、マテリアル系をはじめ、28棟の建物が危険のため立ち入り禁止となるほどの被害を受けた。学内での人的被害はなかったものの、残念ながら学外で2名の学生、3名の入学予定者の方が亡くなった。また、建物や研究室によって被害は異なるが、大学全体で被害は770億円にもなった。

地震発生時、ちょうど研究室（居室）でデータを解析していた時であった。大きな揺れを感じ、すぐに部屋のドアを開けたが、立っていることができずに近くのテーブルの下にもぐった。書棚の本、書類が全て落下、散乱していた。ゆっくりだが2～3mの大きな激しい揺れが長い間（2～3分だが、それ以上の感覚）続き、建物が大きく揺る。なにかのアトラクションに乗っているような錯覚と倒壊するのではないかと不安もよぎるほどであった。仙台に来てから14年（筆者は九州出身）、これまでも仙台で大きな地震（震度5～6）を何度か体験したことがあったが、今回の地震はこれまでにないものだった。

揺れが収まり、研究室にいた学生・メンバーの無事と研究室内の危険の有無（火災、試薬類、ガス栓、ボンベ）を確認し、建物外に一時避難した。HPLCなどいくつかの装置が落下、CO2 インキュベータも実

験台から落下しCO2 ボンベを倒していた。研究室は、ちょうど1年前に新しい建物に移転し、棚や実験装置の固定などを徹底して行っていたため、けが等人的被害もなく被害が少なかったが、建物の上階ほど揺れの影響が大きく、固定していても被害が大きかったようだ（しかし、別の大学の免震建物にある研究室では8階でもまったく落下しなかったそうだ）。

今回の震災に際し、多くの大学からカップラーメン、飲料水、乾電池など支援物資を送っていただいた。それらは大学、研究科を介して配布されたが、ちょうど水（トイレ1回分）や食べものを3～4時間列んでやっと得ていた時期にあたり、非常にありがたかった。あらためて感謝したい。

仙台では地震に対する防災意識は高く、また女川など沿岸部では津波に対する意識も高かった（農学研究科の施設を利用する際は、毎回最初に地震の際の津波に対する説明、避難先、避難経路の確認をおこなっていた）にも拘らず、非常に大きな被害を受けた。また原発事故などもあり、日本全体が落ち着いた状況にある今、少しでも平静に戻れるように願うと同時に、他の地域での同様な危機に対してより安心、安全になるよう今回の教訓を生かしてもらいたいとも思っている。

このような時に自分はいったい何ができるのだろうかかと問い続けていたが、装置やサンプル、試薬に多少の被害はあったものの、幸いにも研究活動が続けることができる。これまで以上に研究を進め、元気になるため少しでも役にたてればと思っている。

この連休明けに約1月遅れの入学式を迎え、やっと新年度のスタートをきる。

今回この記事の依頼を受けるにあたって、この拙い文章で震災のなにを伝えることができるのか疑問であるが、震災後、国内、海外を含め多くの大学、多くの方々に温かい支援をいただいたことに対する御礼を少しでも伝えたく、筆をとった次第である。皆様方に深く感謝いたします。

最後に執筆の機会をいただいた編集委員の九州工業大学坂本寛先生に感謝いたします。

おがわ ともひさ
東北大学大学院生命科学研究科
ogawa@biochem.tohoku.ac.jp

ファージライブラリによる 機能性ペプチドのデザイン

はじめに

近年、抗体医薬品が、医療の分野で急速に使われ始めている。現在の抗体医薬品は、ガンに対する治療薬として抗体依存性細胞障害活性（ADCC）を利用したものもあるが、例えば、リウマチの治療に使われる抗IL-6レセプター抗体や抗TNF- α 抗体は、アンタゴニストとして機能するい



畠中 孝彰

わゆる阻害型の抗体である。この阻害型抗体は、ADCC 活性を基本的には必要とせず、標的分子に結合することでその機能を発現する。そのため、このような抗体の次世代型として、結合ドメインだけを持つ Fab 抗体、単鎖 Fv 抗体、さらには、ヒト VH ドメイン抗体や ラマ由来の抗体である ナノボディといった小型化抗体が研究され、開発も進んでいる¹。このような抗体（様）分子の低分子化は、生産の低コスト化を含め、高い組織浸潤性や分子デザインのし易さといったメリットがあるが、更なる低分子化の一つの方向として、我々は、抗体に限らずレセプタータンパク質の構造・機能を模倣する低分子のペプチドをデザインする研究を、バクテリオファージディスプレイ技術を用いたランダムペプチドライブラリを用いて行ってきた^{2,3}。本稿では、これらの研究手法の概略と、最近の成果について概説する。



伊東 祐二

1. ファージライブラリ

ファージディスプレイ（ファージ提示）法は、大腸菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ（あるいは単にファージと呼ぶ）のコートタンパク質の遺伝子の末端に外来遺伝子を連結することで、ファージ表面にその遺伝子産物であるタンパク質やペプチドを提示する技術である。提示分子としては、抗体や酵素、あるいは cDNA 産物が用いられてきたが、我々は、混合ヌクレオチド等による数十塩基の合成オリゴヌクレオチドを導入することで作製される（ランダム）ペプチドファージライブラリを用いている。一般的に、提示用のファージとして、M13 (fd) 繊維状ファージがよく用いられるが、ここでは我々が使用している溶菌性 T7 ファージを用いた提示系の概要を図 1 に示した。詳細なファージ提示系の違いについては、拙著の総説を参考願いたい⁴。

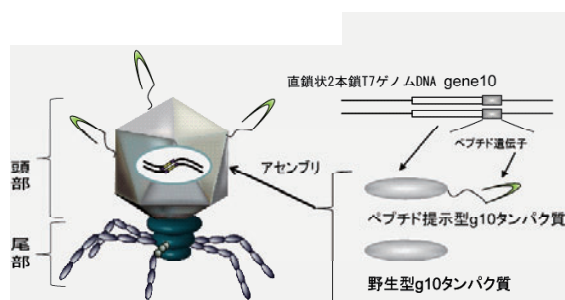


図 1 T7 ファージディスプレイシステムの概要

現在までに、様々なペプチドファージライブラリが作製され、標的タンパク質に対する種々のペプチドリガンドが報告されている⁵。一般にファージライブラリから、標的分子に特異的に結合するファージの分離手法をバイオパニングと呼んでいる。このバイオパニングが、特異的結合分子（を提示するファージ）を単離する上では重要なステップであるが、大まかには以下のステップの繰り返しとなる。1) 標的分子（又

は抗原）を固定化した固定層へのファージライブラリの反応、2) 洗浄による非結合ファージの除去、3) 固定相（標的分子）に結合したファージの回収と大腸菌による増殖。これらを通常 3-5 回程度繰り返すことによって、標的分子に結合するファージの濃縮が起こる。その後は、ファージをクローン化して、ELISA 等による結合活性を指標にスクリーニングを行い、高い結合活性を持つファージを特定し、その提示分子の遺伝子配列の解析から、結合ペプチドの配列を決定する。

2. ラクトフェリン結合ペプチド

このような手法により、我々は、いくつかのペプチド性のアフィニティリガンドを同定してきた。ヒトラクトフェリン (hLF) は、初乳中に多く含まれる非ヘム型の鉄結合タンパク質で、従来から様々な生物活性が報告されてきた。炎症抑制活性や抗ウイルス活性、がん転移抑制活性等々であるが、これらの活性がどのような機構で発現されるのか、はっきりとした機構は報告されていなかった。我々は、hLF と結合するペプチドをファージライブラリによって単離したところ、細胞接着に関わる RGD を含む特徴的な配列が hLF との結合に関与していることを見出した²。これをもとに、hLF とフィブロネクチンやビトロネクチンとの結合活性を検証し、さらに、これらの細胞外接着タンパク質と細胞 (CHO 細胞, Hela 細胞, RAW 細胞) との接着を、hLF が用量依存的に阻害することを明らかにした。このことから、hLF の生物活性を議論する上では、特に細胞外マトリックスと細胞表面のインテグリン間の結合阻害が、重要な要素になることを提案した。

3. IgG 抗体結合ペプチド

我々は、一方で、ファージライブラリを用い、抗体医薬開発の研究を行っている。その中で、IgG 抗体の精製にアフィニティリガンドとして用いられる *Staphylococcus* バクテリア由来のプロテイン A にも、色々と問題点があることが分かってきた。抗体医薬の精製には、GMP 対応の精製用カラムが必要であり、特にエンドトキシンの混入には特に注意を要する。そのため、用いるプロテイン A は高度に精製する必要から高価であり、また、プロテイン A 自身の高い抗原性のため、精製抗体中のプロテイン A の混入チェックも義務づけられている。さらに通常プロテイン A カラムからの溶出は pH3-3.5 の酸性 pH 領域で行うことが多く、従来から、抗体の酸性 pH への暴露による変性や凝集を伴う構造変化の問題が議論されてきた⁶。

このような問題を解決する手段として、低分子リガンドやペプチドによる抗体精製用のアフィニティリガンドの開発研究がおこなわれてきた。我々も、新しい IgG 精製用のアフィニティリガンドの開発を試みようと、ペプチドファージライブラリを用いて、ヒト IgG に特異的に結合するペプチドの単離を試みた。用いたライブラリは、CX₆₋₁₀C または、X₃CX₆₋₁₀CX₃ であり、2 つの Cys がジスルフィド結合を形成するようにデザイン導入されている（但し、X は NNK の混合ヌクレオチドのコドンでコードされるランダムなアミノ酸配列

を意味する)。このライブラリを使って、ヒト IgG-Fc に対するバイオパニングを行ったところ、CX₆₋₁₀C のタイプから特異的な結合を示すファージの濃縮が見られ、結果として、CTGYWPKAWGLC (G4 モチーフ) の配列を持つペプチド (タイプ II ペプチド) が単離された。特に下線部は、単離された 6 個のモチーフで保存された配列である。この配列を有するビオチン化合成ペプチドを用いて、結合の特性を ELISA で検討した結果、このペプチドは、ヒト IgG に対する極めて高い特異性を持つことが分かった³。

そこで、このビオチン化ペプチドをストレプトアビジン (SA) を介し固定化したマグネットビーズを用い、ヒト血清から IgG の精製を行った。ところが、ほとんど IgG は回収されなかった。バイオパニングに用いた市販の精製ヒト IgG と血清中のヒト抗体との違いを検討するうちに、抗体精製の際の精製プロセスの影響が考えられた。そこで、ヒト血清からプロテイン A カラムを使って精製を行い、精製前 (血清) と精製後 IgG とのタイプ II ペプチドの反応性を比べた結果、精製前には反応性が見られないのに対し、精製後では極めて強い結合活性が見られた。このことは、プロテイン A カラムからの溶出に用いる酸性溶液が抗体に何らかのダメージを与え、これによる構造変化で生じた分子種 (酸変性構造体) をタイプ II ペプチドが認識していることが示唆された。このことは、抗体溶液を酸性 pH で処理すると、タイプ II ペプチドの反応性が急速に増強されることから支持された (図 2)。

タイプ II ペプチドが認識する酸変性構造体は、抗体の凝集物形成と深く関わっていることを示唆するデータが得られている。酸変性構造体を含む溶液は、低温では変化はないが、温度が 20℃ を超えると急速に凝集を引き起こす。このことは、酸変性構造体が、凝集形成を引き起こす一つの因子であることを示唆している。タイプ II ペプチドは、正常なヒト IgG 抗体には

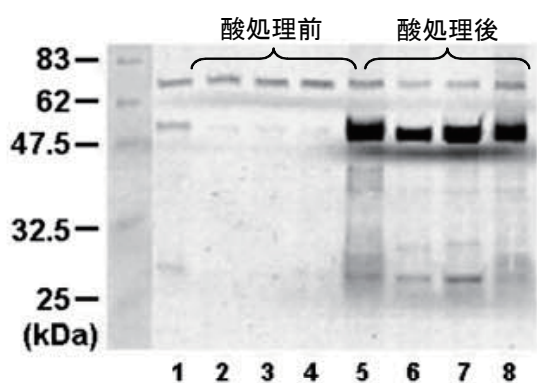


図2 IgG 結合ペプチド (Type II) の酸処理したヒト IgG に対する反応性の増強
ヒト抗体溶液を、4℃にて5分間、酸性 (pH2.5) に暴露後、中和し、Type II ペプチドを固定化したビーズと反応させた。マグネットによる回収、洗浄後、還元条件下で SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを行った。約 50kDa のバンドは、回収されたヒト H 鎖を示す。レーン 1, 5 : ポリクロナールヒト IgG, レーン 2, 6 : 抗ヒト IL6 受容体 IgG1 抗体, レーン 3, 7 : 抗 Her2 IgG1 抗体, レーン 4, 8 : ヒト血清

全く結合しないため、抗体溶液中に僅かでも含まれる酸変性構造体を SPR 法等により高感度に検出、あるいは除去にも応用が可能であり、このペプチドによる凝集反応の抑制や除去の研究を進めている。

4. IgA 結合ペプチド

最後に、IgA 結合ペプチドについて紹介したい。現在、抗体医薬で主流となっているのは、IgG1 であるが、これはヒト IgG レセプター、特に、NK 細胞上に発現する FcγIIIa レセプターの働きによって、ADCC 活性によるガン細胞等への殺傷能力を発揮できるためである。一方、IgA は、体内では腸管などで最も多量に生産される抗体でありながら、粘膜免疫における重要性やワクチン誘導についての研究はあるものの、その ADCC 活性についてはあまり重要視されていなかった。しかし、近年、IgA が、好中球上に発現する IgA レセプター (Fcαレセプター) を介し、IgG1 と同様な ADCC 活性を発現することが報告されるようになった。特に、Fcαレセプターを発現する好中球は、血液リンパ球の 60-70% を占め、この好中球をエフェクター細胞として用いることは、抗体治療において大きな利点と考えられる。しかし、IgA の抗体医薬化を阻む理由として、IgG1 におけるプロテイン A の様な工業的に利用できる精製システムがないことが挙げられる。従来、IgA の精製法として、IgA1 特異的な糖鎖を認識するレクチン (Jackalin) カラムや、イオン交換やゲルろ過カラムを組み合わせた方法が報告されているが、いずれも産業利用には至っていない。我々は、IgA に対する特異的な結合ペプチドによる精製システムの構築を目的に、ヒト IgA に対する特異的なファージの濃縮を試み、その単離に成功した。図 3 に、単離されたファージクローンの IgA に対する ELISA による結合活性と提示するペプチドモチーフの配列を示す。最も結合活性の強かった A2 モチーフの配列を基にペプチド合成を行い、その親和性評価を SPR によって行ったところ、Kd 値で、1.3μM と結合力が弱かったが、A2 モチーフを基に部分変異ライブラリを使って改良を行い、親和性が増強されたペプチドのデザインに成功した (現在論文投稿中)。

Invivogen 社 (<http://www.invivogen.com/>) は、ペプチド性のリガンドによる IgA 精製カラムを、*Staphylococcus* 由来の IgA 結合タンパク質の結合ドメインペプチドを基に製品化している。我々のペプチドは、サイズも 16 残基と短く (Invivogen 社のペプチドは、51 残基のペプチドの 2 量体構造)、親和性も高いため、現在、

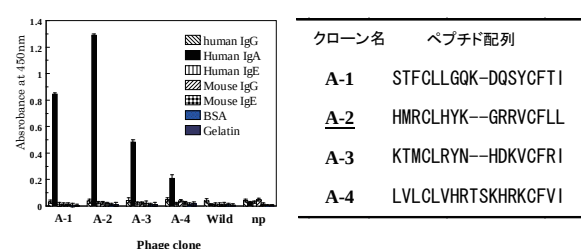


図3 単離された IgA 結合ファージの ELISA による結合活性 (左) と提示するペプチドのアミノ酸配列 (右)

このペプチドを用いたヒト IgA の精製システムの構築研究を、JST の研究事業の中で推進している。この新しい IgA 結合ペプチドを用いた、IgA の精製システムの確立によって、IgA 抗体医薬の実用化が近づくことを願いたい。

おわりに

多くのペプチド研究者の共通する願いは、思い通りの機能をもつペプチドを設計することであろう。今回紹介した精製・検出用のアフィニティリガンドとしてのペプチドだけでなく、受容体や細胞特異的な結合ペプチドは、医薬への応用への期待が高い。しかし、そこには、我々の様なペプチドライブリからのアミノ酸配列の設計だけでなく、さらに、人工アミノ酸の導入やミメティック手法の導入により、体内での安定性や機能性を高めるための工夫が必要である。是非、ペプチド学会の先生方の御協力を、この場を借りてお願いしたい。

本稿で紹介した研究の多くは、鹿児島大学理工学研究科、杉村和久教授との共同研究の成果であり、この場を借りて厚く感謝いたします。また、このような寄稿の機会を与えていただきました九州工業大学の坂本寛先生に、心よりお礼申し上げます。

参考文献

1. 橋口周平, 他, ファージディスプレイと Beyond antibody: ~抗体様分子による分子標的~, 生化学 **82**, 710-726 (2010).
2. Sakamoto, K., Ito, Y., Mori, T. & Sugimura, K. Interaction of human lactoferrin with cell adhesion molecules through RGD motif elucidated by lactoferrin-binding epitopes. *J Biol Chem* **281**, 24472-24478 (2006).
3. Sakamoto, K. et al. Discovery and characterization of a peptide motif that specifically recognizes a non-native conformation of human IgG induced by acidic pH conditions. *J Biol Chem* **284**, 9986-9993 (2009).
4. 伊東祐二, 坂元孝太郎, 前田政敏, 村岡賢 & 杉村和久 ファージディスプレイによる分子デザイン—抗体から低分子ペプチドまで—, 生物物理 **48**, 294-298 (2008).
5. Szardenings, M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res* **23**, 307-349 (2003).
6. Ejima, D. et al. Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins* **66**, 954-962 (2007).

はたなか たかあき

k7808291@kadai.jp

いとう ゆうじ

yito@sci.kagoshima-u.ac.jp

鹿児島大学大学院理工学研究科

生命化学専攻 (理学系)

<http://www.sci.kagoshima-u.ac.jp/~yito/>

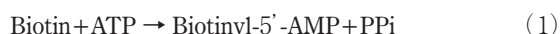
特異な酵素反応を利用した タンパク質の蛍光ラベル化技術

はじめに

近年、タンパク質の蛍光ラベル化法として、蛍光タンパク質を用いたラベル化法を代替あるいは補完する、様々な新しい技術が提案されている。中でも標的タンパク質に遺伝子工学的に連結したアミノ酸配列(タグ)と、蛍光プローブ間の特異的な結合反応を利用したラベル化法が注目されている¹⁻³⁾。このラベル化法では、タグを有する標的タンパク質を細胞内で発現させた後に、人工的に調製した様々な蛍光プローブを作用させることにより標的タンパク質のラベル化を行なう。その様式から翻訳後ラベル化(posttranslational labeling)反応と呼ばれることがある。このラベル化反応では、様々な発光特性を有する蛍光団を標的タンパク質に導入することができ、またラベル化のタイミングを制御できることなどから、蛍光分析の応用範囲を広げることが可能である。しかしながら、提案されている翻訳後ラベル化反応は、いずれの系についてもまだその研究実績が蛍光タンパク質を用いた系と比較すると少なく、種々の生命現象を解明するために活用できるかどうか検証する段階にあると言える。最近、筆者の研究室でも、この翻訳後ラベル化反応に分類される、蛍光ラベル化法の開発を行なったので⁴⁾、それについて本稿で紹介する。本手法では、筆者らが偶然発見した、古細菌由来の特異なビオチン化反応を利用している。

ある古細菌由来の特異なビオチン化反応

ビオチン化反応は、ビオチン化酵素(biotin protein ligase, BPL)がその基質タンパク質(biotin carboxyl carrier protein, BCCP)の特定のリジン残基にビオチンを付加する反応である。この反応は2段階の部分反応からなっており、1段階目の反応でビオチンとATPからビオチニル-AMPが生じ、2段階目の反応でアポ型のBCCPにビオチンが付加され、ホロ型のBCCPが生じる。



このビオチン化反応は、その有用性からこれまでに様々な生物種由来の反応系が調べられてきたが、ほとんどの生物種間で交差反応性が見られ、生物種が異なってもほぼ同様の反応挙動を示すことがわかっている。しかし、筆者らは偶然に古細菌の *Sulfolobus tokodaii* 由来の同反応系が、他の生物種には見られない、いくつかの特異な性質を有していることを見出した^{5,6)}。そのうちの1つが酵素であるBPLが、ビオチン化された基質タンパク質(BCCP)と極めて安定な複合体を形成するという性質である(図1-A)⁶⁾。通常のビオチン化反応では、BCCPにビオチンが付加されたのち、反応生成物であるHolo BCCPはすみやかに

BPL から解離するのであるが、この古細菌由来のビオチン化反応では、Holo BCCP と BPL が極めて安定な複合体を形成するため、常温付近では反応が 1 サイクル目で止まってしまうことがわかった。このような、酵素がその反応生成物と非常に安定な複合体を形成するという性質は他に例を見ない特異な現象である。

筆者らは、この古細菌由来の特異なビオチン化反応系を利用して、新たなプロテインタグシステムの開発が可能ではないかと考えた。すなわち、BCCP 部位をタグとして標的タンパク質に導入し、BPL との相互作用を利用して標的タンパク質の分離・分析を行なうというものである (図 1 B)。実際に BPL を固定化した磁気ビーズを利用して、細胞破碎溶液から標的タンパク質を精製すること等に成功している⁷⁾。また、蛍光団を導入した BPL を利用してビオチン化反応を行なうことにより、標的タンパク質の蛍光ラベル化も可能である⁴⁾。本稿では、このビオチン化反応系を利用したタンパク質の蛍光ラベル化システムの開発について紹介する。

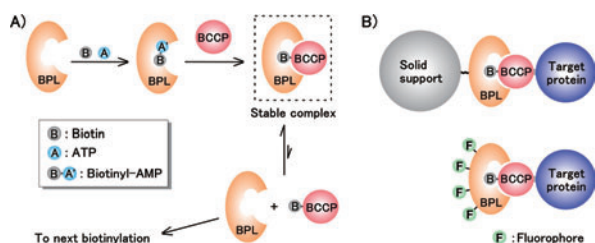


図 1 *S. tokodaii* ビオチン化反応の模式図 A), ならびにそのプロテインタグシステムへの応用 B)

ビオチン化酵素の蛍光ラベル化

ビオチン化反応を利用した蛍光ラベル化システムの構築に当たり、まず BPL の蛍光ラベル化を行なった。具体的には BPL に存在するシステイン残基を、蛍光色素のマレイミド体を利用して修飾を行なった。*S. tokodaii* 由来の BPL にはもともと活性サイトから離れた箇所にも 3 つのシステイン残基 (Cys-3, Cys-204, Cys-219) が存在しており、それらは BCCP との会合には関与していないことが推測された (図 2)。ま

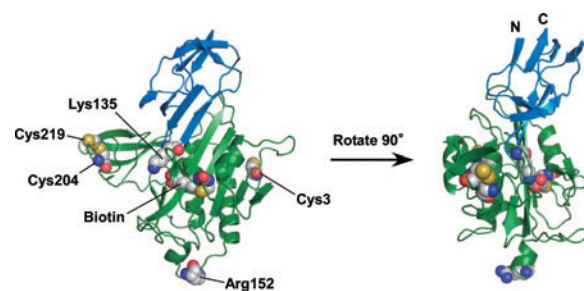


図 2 *S. tokodaii* 由来の BPL と BCCP の複合体のモデル構造。BPL と BCCP の構造はそれぞれ緑と青で示す。

た蛍光色素の導入量を増やすために、BCCP との会合面と反対に位置する残基 (Arg152) をシステイン残基に置換した変異体を構築した。作製した変異型 BPL 並びに野生型 BPL に対して、フルオレセイン及び DyLight549 のマレイミド体を使ってラベル化を行なった。その結果、野生型及び変異型 BPL に対してそれぞれ平均して 2.8 及び 3.6 分子の蛍光色素を導入することができた。またこれらのラベル化した BPL は、酵素活性や BCCP に対する強い結合活性を維持していることもわかった。

固相基板上での標的タンパク質の蛍光検出

まず蛍光ラベル化した BPL を利用して、固相基板上に固定化した標的タンパク質の蛍光検出を試みた⁴⁾。具体的には、標的タンパク質としてグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を選び、BCCP タグを導入した GST をグルタチオンプレート上に固定化した (図 3-A)。その後、蛍光ラベル化した BPL を作用させることにより、GST の蛍光検出を行なった。図 3-B にプレートの各ウェルに添加した GST の量と蛍光強度の関係を示すが、GST の添加量が增大するにつれて、蛍光強度も増大していくことがわかった。また、期待通り、野生型よりも変異型 BPL を使用した方が、強い蛍光強度が観察された。コントロールとして BCCP タグを有していない GST を使用して同様の実験を行なったが、この場合蛍光強度の増大はほとんど見られなかった。これより BCCP タグを有するタンパク質を特異的に蛍光ラベル化できることがわかる。

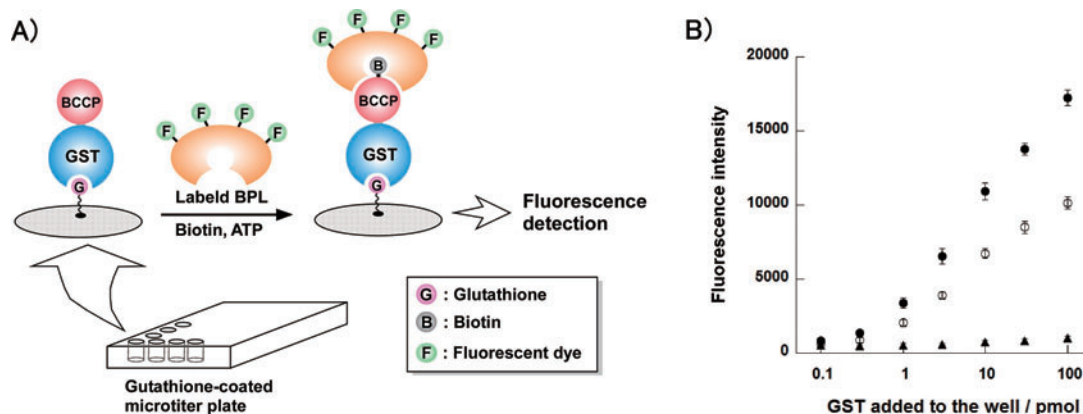


図 3 グルタチオンプレート上に固定化した GST の蛍光検出

A) 蛍光検出の模式図, B) プレートの各ウェルに添加した GST の量と蛍光強度の関係: ○野生型 BPL, ●変異型 BPL, ▲コントロール (BCCP タグを有していない GST)

細胞表面での膜タンパク質の蛍光イメージング

このビオチン化反応を利用したラベル化システムが、生細胞系にも適用できることを示すために、膜タンパク質の細胞表面での蛍光ラベル化を試みた（図4-A）⁴⁾。具体的には膜タンパク質として、Gタンパク質共役型受容体の1つである、ブラジキニン B2 レセ

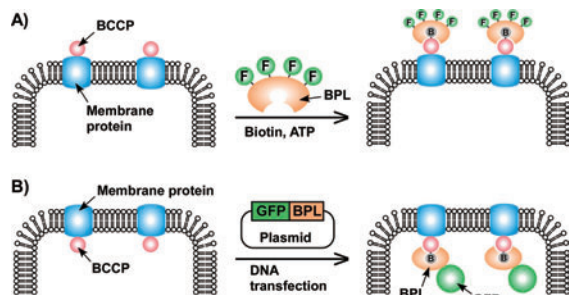


図4 *S. tokodaii* ビオチン化反応を利用した膜タンパク質の蛍光ラベル化

A) 細胞表面での蛍光ラベル化, B) 細胞内での蛍光ラベル化

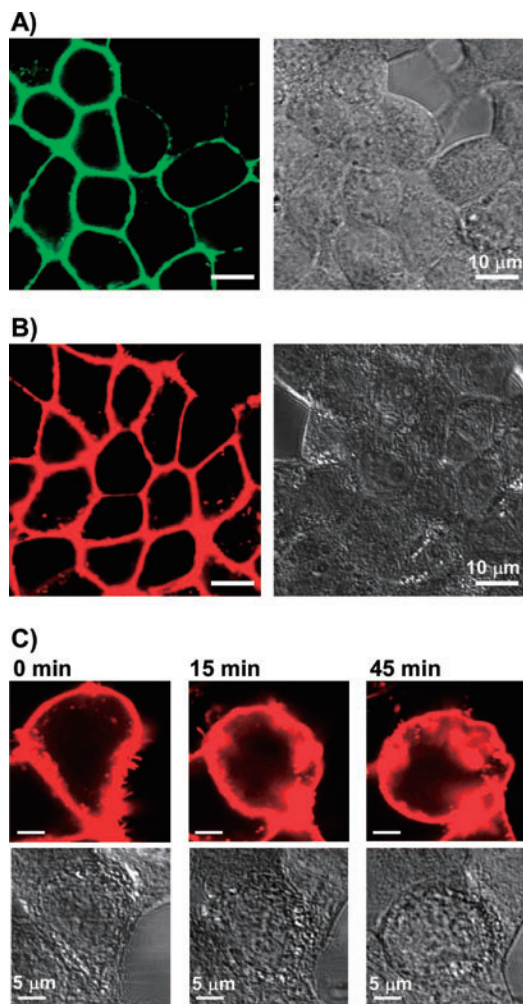


図5 細胞表面での蛍光イメージング

A) フルオレセイン修飾 BPL を用いたイメージング (左: 蛍光像, 右: 微分干渉像), B) DyLight549 修飾 BPL を用いたイメージング (左: 蛍光像, 右: 微分干渉像), C) ブラジキニン添加に伴うインターナリゼーション (上段: 蛍光像, 下段: 微分干渉像)

プター (B2R) を選び、その N 末端に BCCP タグを導入した融合タンパク質 (BCCP-B2R) をヒト細胞 (HEK293) に発現させた。その後、蛍光色素で修飾した BPL を作用させることにより、細胞表面でのラベル化を行なった。フルオレセイン修飾 BPL を使用してラベル化を行なった後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した結果を図5-A に示す。細胞の輪郭から明瞭な蛍光が観察でき、期待通り細胞の表面でラベル化が起きていることが確認できた。また同様に DyLight549 修飾 BPL を使用して蛍光ラベル化を行なった結果を図5-B に示した。

BPL でラベル化した B2R がその生理活性を維持しているかどうか確認するために、アゴニストの添加に伴うインターナリゼーションの観察を行なった。具体的には、HEK293 細胞に BCCP-B2R を発現させた後、DyLight549 修飾 BPL で蛍光ラベル化を行ない、その後、アゴニストであるブラジキニンを細胞に添加し、蛍光像の経時変化を追跡した（図5-C）。その結果、時間と共にエンドサイトーシスに伴うレセプターの細胞内部への取り込みが観察できた。したがって、ビオチン化反応でラベル化した B2R はそのリガンドに対する結合活性及び細胞内への移動能を維持していることが確認できた。

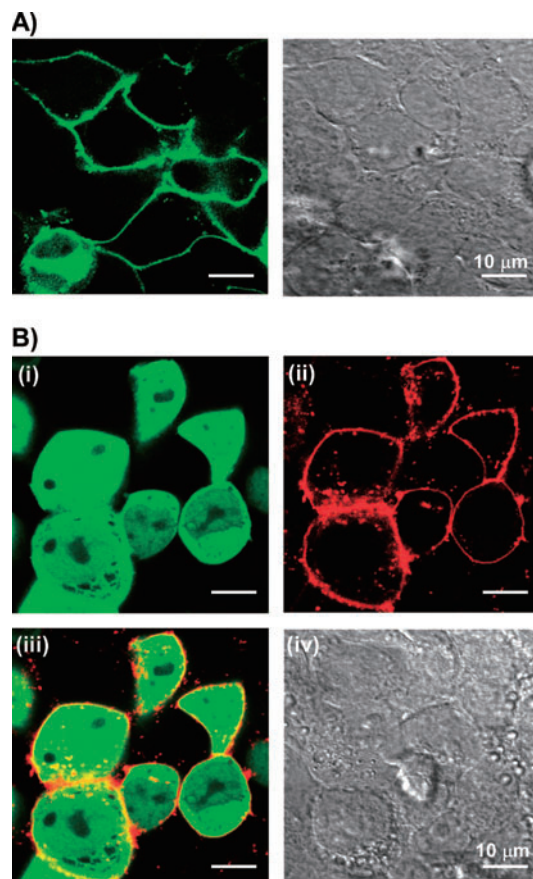


図6 細胞内部での蛍光イメージング

A) B2R-BCCP と GFP-BPL を共発現させた細胞 (左: 蛍光像, 右: 微分干渉像), B) BCCP タグを有していない B2R と GFP-BPL を共発現させた細胞 (i): 蛍光像 (green channel), (ii): 蛍光像 (red channel), (iii): (i) と (ii) を重ね合わせた画像, (iv): 微分干渉像)

細胞内部での膜タンパク質の蛍光イメージング

次にビオチン化反応を利用した細胞内部での蛍光ラベル化システムの構築を行なった(図4-B)⁴⁾。具体的には、蛍光プローブとしてGFPとBPLの融合タンパク質(GFP-BPL)を利用し、それを細胞内で標的タンパク質と共に表発現させることにより、蛍光ラベル化を行なった。ここでは標的タンパク質として同じくB2Rを選び、そのC末端側にBCCPタグを導入した融合タンパク質(B2R-BCCP)をHEK293細胞に発現させた。実際にB2R-BCCPとGFP-BPLを細胞内に共発現させた細胞について、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、GFPに由来する明瞭な蛍光が細胞の輪郭から観察できた(図6-A)。一方でコントロールとしてBCCPタグを有していないB2RをGFP-BPLと共発現させた場合には、GFPに由来する蛍光は細胞全体から観察された(図6-B-(i))。また、これらの細胞にB2Rが発現していることは、ローダミンでラベル化したB2Rのアンタゴニストで蛍光染色することによって確認ができた(図6-B-(ii)(iii))。これらの結果より、細胞内部でもBPLとHolo BCCP間の会合を通じて、蛍光ラベル化できることがわかった。

おわりに

本稿では特異なビオチン化反応を利用したタンパク質の蛍光ラベル化法の開発について紹介した。本手法ではBCCPを連結した標的タンパク質に、蛍光団を有するBPLを作用させることにより生細胞での蛍光イメージングが可能である。このようなタグと蛍光プローブを組み合わせた翻訳後ラベル化反応としては、これまでに様々な種類のものが提案されているが、本手法はいくつかの特徴を有している。まず1つとしてタグと蛍光プローブ間の結合特異性が高い点が挙げられる。本系ではHolo BCCPとBPL間の高い結合親和性を利用しているが、この高い結合親和性は、BPLとBCCP間及び、BPLとビオチン間の協同的な相互作用に基づいている。したがって既存の、アミノ酸残基間の相互作用のみに基づいた系や、アミノ酸残基と低分子の相互作用のみに基づいた系よりもその結合特異性は高いものと考えられる。また他の特徴として、タグとして利用するBCCPが、蛍光プローブと標的タンパク質間で剛直なスペーサーとして働き、両者の間での立体障害が回避できるという点が挙げられる。これはBCCPが69残基から構成されるコンパクトなタンパク質であり、またその両末端が共にBPLとの会合面と反対に位置していることに由来している(図2)。一方で、蛍光プローブとしてGFP-BPLを利用する系では、通常の翻訳後ラベル化反応とは異なり、そのラベル化反応が、DNAトランスフェクションだけで完了するため、操作が非常に簡便であるという特徴を有している。

今後本ラベル化系を利用して、機能がまだよく解明されていないレセプター等を対象として解析を行なっていきたいと考えている。最後に、今回このような執筆の機会を与えて下さった、九州工業大学の坂本寛先生に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) H. M. O'Hare, K. Johnsson, A. Gautier, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 488.
- 2) M. Z. Lin, L. Wang, *Physiology* **2008**, *23*, 131.
- 3) E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 6974.
- 4) S. Sueda, S. Yoneda, H. Hayashi, *ChemBioChem* **2011**, in press.
- 5) Y.-Q. Li, S. Sueda, H. Kondo, Y. Kawarabayasi, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1536.
- 6) S. Sueda, Y.-Q. Li, H. Kondo, Y. Kawarabayasi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *344*, 155.
- 7) S. Sueda, H. Tanaka, M. Yamagishi, *Anal. Biochem.* **2009**, *393*, 189.

すえだ しんじ
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生命情報工学部門
sueda@bio.kyutech.ac.jp

タンパク質・ペプチドの配列解析用 ツールとしてのマイクロ化学デバイス

1. はじめに

タンパク質の配列解析は、エドマン法から質量分析に主役が移って久しい。特に、プロテオミクス解析においては、質量分析は欠かせないツールとなっている。質量分析装置の性能が向上するにつれ、微量のサンプルでのハイスループットな測定が容易となってきたが、そのサンプルの前処理に精製、酵素消化、分離など、何段階もの労力を要する操作が必要という問題がある。マイクロ化学デバイスは微量サンプルのハンドリングに優れ、複数の単位操作を集約でき、なおかつパラレル処理も可能であることから、プロテオミクスの前処理デバイスとしての開発が進められている。マイクロ化学デバイスを用いたこれらの取り組み全般に関しては総説をご参照いただくとして[1]、本稿では、酵素消化の段階を取り上げ、我々が開発してきた酵素固定化マイクロ化学デバイス技術をタンパク質の配列決定へ応用した例を中心に紹介したい。



宮崎 真佐也

2. マイクロ化学デバイスを用いるタンパク質・ペプチドの酵素消化反応

効率的な酵素消化は、プロテオミクスではタンパク質配列決定のための重要な反応である。ゲル中での消化(in-gel digestion)や溶液反応での消化が多用されているが、in-gel digestionは自動化が容易でないため、専ら溶液反応の自動化が行われている。溶液反応では、溶液状態の酵素を用いた場合には酵素の自己消化反応の問題があるため、希薄な酵素溶液を用いる必要がある。このため、長時間反応が必要となるが、条件によっては非特異的な反応や脱アミド化反応が生じる。固相

担体に酵素を担持して反応を行えば、自己消化の問題は改善されるが、酵素分子の自由度が制限されるため、接触効率が悪くなる。これらを解決するため、マイクロ化学デバイスの流路内に酵素を固定化して反応を行うデバイスが用いられている。マイクロ流路は、一般にマクロスケールの反応と比べて、溶質分子の拡散距離が短く、また単位体積の反応溶液に対して器材等の表面積が大きい特長がある。このため、固定化酵素を用いた反応でも短時間で効率よく反応を行うことが理論的には可能となる。また、連続流通式の反応となるため、溶液状態よりも多量の酵素を反応に用いることが可能となるため、反応時間の短縮も期待できる。これらの特長を生かす目的で、プロテオミクス用に限らず、様々な酵素反応のマイクロ化学デバイスが開発されている[2]。しかし、これらマイクロ化学デバイスを用いた場合でも、いかに加水分解の効率を上げるかがいまだに課題として残っている。この課題を克服するため、反応溶液に有機溶媒等の変性剤を添加する[3]、あるいは反応液を加熱する[4]などの方法が試みられているが、これらの場合は酵素の安定性が問題となる。このため、酵素の安定性を高めるマイクロ化学デバイスへの固定化方法の開発が望まれる。

我々は、酵素分子をバラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合溶液で処理することにより、酵素分子間を架橋して凝集させ、これを流路の表面にチューブ状に成形する固定化方法を開発した[5]。この方法は単に別々の導入孔から酵素溶液とアルデヒド溶液を流路に流通させるだけで固定化できるシンプルな固定化方法である(図1)。また、アミノ基を表面に持たない酸性のタンパク質でも、予めポリリジンなどのカチオン性ポリマーと混合することで、固定化可能であり、汎用性の高い固定化方法である[6]。この方法で酵素を固定化したマイクロ化学デバイスでは、酵素分子の有機溶媒や変性剤に対する安定性が向上する。この特長は上述のタンパク質配列解析に有用と考えられたので、我々は作製したマイクロ化学デバイスを用いてタンパク質加水分解反応を行った[7,8]。まず、トリプシンを固定化したマイクロ化学デバイスを用いてBSA(582残基)とチトクロムC(104残基)の加水分解反応を行った。反応生成物を質量分析にかけ、スペクトルを解析した結果、滞留(反応)時間5.2分の反応で、マクロスケールの溶液で15時間

反応させた場合よりも高い配列の同定率(8→12%, 29→47%)を得た。キモトリプシンを固定化したマイクロ化学デバイスでは、5.2分の滞留時間で反応させた場合、全く加水分解を受けなかったが、マクロスケールの反応では46%の配列同定率を得た。キモトリプシンは疎水性残基に基質特異性を持つため、マクロスケールの長時間反応では部分的な変性が生じて酵素消化を受けたが、マイクロ化学デバイスの反応時間では全く変性していないため消化されていないと考えられた。そこで、反応液に3Mの塩酸グアニジンを追加してマイクロ化学デバイスでの反応を行った。その結果、高い配列同定率(62%)を得た。

次に、配列同定率を向上させるため、マイクロ化学デバイスの特長を生かし、異なる酵素を固定化したマイクロ化学デバイスを連結して連続反応を行う、いわゆるタンデムリアクタを作製し、配列同定率が向上するかどうかを検討した[9]。モデルとして β -カゼインの加水分解反応を行ったところ、マクロスケールでは18時間で45%、トリプシン・キモトリプシン固定化マイクロ化学デバイス単独ではそれぞれ14%・57%であったのに比べ、キモトリプシン-トリプシンのタンデムリアクタでは総滞留時間21分で、70%の配列を同定することができた。

このように我々の開発した方法で作製した酵素固定化マイクロ化学デバイスを用いることで、短時間で効率の良い加水分解反応を行うことが可能であった。そこで、次のステップとして、酵素固定化マイクロ化学デバイスをより複雑なタンパク質配列解析へ応用してみた。

3. タンパク質内のジスルフィド結合様式の解析

ご承知の通り、タンパク質中のジスルフィド結合は、折りたたみ後のタンパク質の立体構造を安定させ、活性を維持するのに重要である。ジスルフィド結合の欠損や組違いは、タンパク質のミスフォールディングなどにつながるため、その解析方法の確立が望まれるが、これまでに報告されている方法は、齋藤らの ^{18}O -標識を用いたin-gel digestion法など[10]、いくつかの報告しか無い。一般に直接ジスルフィド結合のかかったタンパク質を酵素消化する場合、その構造が強固なため、加水分解されにくい。このようなタンパク質を加水分解するためには、加熱するもしくは変性剤を添加する方法が考えられるが、前述の通り酵素の安定性が問題となる。そこで我々の開発したマイクロ化学デバイスを用いれば、ジスルフィド結合がかかったままのタンパク質を効率よく加水分解できると考え、実験を行った[11,12]。

まず、ジスルフィド結合を4個有するリゾチーム(128残基)をモデルとして、トリプシンおよびキモトリプシン固定化マイクロ化学デバイスによる消化反応を行った。サンプルの流量を一定とし(滞留時間22分)、30℃～50℃まで温度を変化させて反応を行ったところ、温度が高くなるにつれ、加水分解反応生成物の分子イオンピークが観測され、50℃ではジスルフィド結合がかかったペプチドフラグメントの分子イオンピークも観測された(図2)。その配列同定率はトリプシンで98%、キモトリプシンで42%であり、

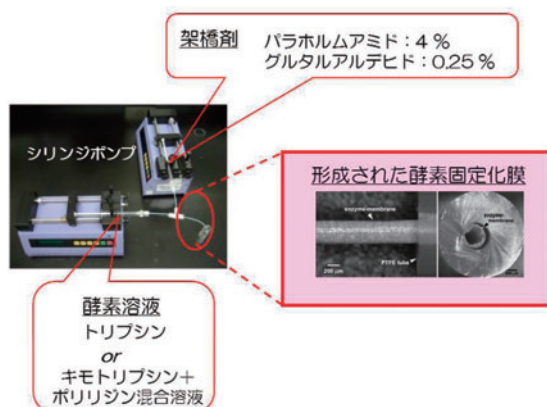


図1

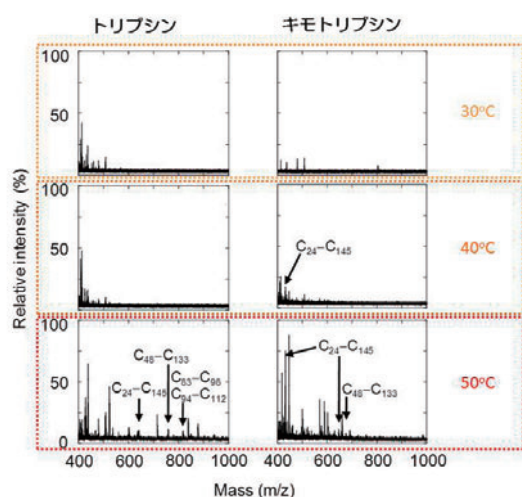


図2

トリプシン固定化マイクロ化学デバイスの加水分解反応生成物ではジスルフィド結合すべてを帰属することが可能であった。

次に、ジスルフィド結合を17個有するBSAの解析を行った。マクロスケールの反応（溶液、37℃、一晚反応）では26%の配列同定率で、6個のジスルフィド結合を同定できた。マイクロ化学デバイスでは、滞留時間22分、50℃で加水分解反応を行い、生成物の質量分析を行った。その結果、17個中10個のジスルフィド結合したペプチドフラグメントの分子イオンピークを観測することができ、その配列同定率は37%であった。このことから我々のマイクロ化学デバイスを用いることにより、高い配列同定率のみならず、短時間で効率よくジスルフィド結合を決定することが可能であった。また、50℃で使用したマイクロ化学デバイスの酵素活性を測定したところ、使用前と同等の活性を有し、またタンパク質の加水分解も同等の効率で行うことができた。このことからマイクロ化学デバイスを用いて連続で繰り返し加水分解反応を行うことができると考えられ、ハイスループットな解析への応用の可能性も示された。

4. タンデムリアクタによる翻訳後修飾の解析

タンパク質のリン酸化や糖鎖付加などの翻訳後修飾は、その機能発現に重要な役割を担っている。プロテオミクスにおいて、この翻訳後修飾を解析することは重要な技術である。従来はリン酸化ペプチドフラグメントをキレート樹脂等にいったん固定化して回収し、これを同定する方法が用いられていた[13]。しかしながら操作が煩雑であることと、樹脂からの回収率の問題があるため、簡便な分析方法の開発が望まれる。我々は、マイクロ化学デバイスの特長である機能集積化の容易さを利用し、プロテアーゼと翻訳後修飾部位を同定するための酵素（たとえばリン酸化の場合、ホスファターゼ）のタンデムリアクタを用い、この加水分解物とプロテアーゼ固定化マイクロ化学デバイスの加水分解生成物を比較すれば、翻訳後修飾の解析が容易になると考えた（図3）。モデルとしてβ-カゼインのリン酸化部位の同定を行うこととし、プロテアーゼのみのデバイスで得た加水分解物と、タンデムリアク

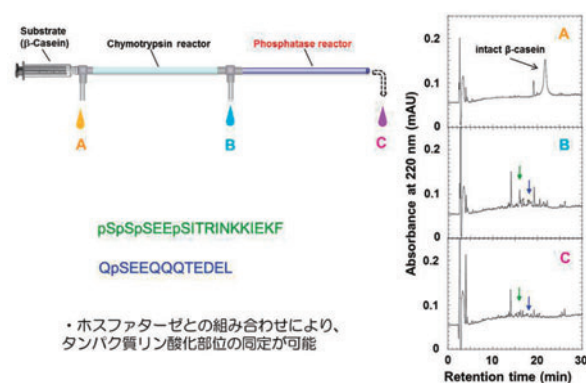


図3

タで得た加水分解物をHPLCおよび質量分析で比較したところ、ホスファターゼ処理によりHPLCクロマトグラム中の2つのピークが消失し、質量分析でそれぞれリン酸化ペプチド（pSpSpSEEpSITRINKKIEKFとQpSEEQQQTEDEL）であることがわかった[9, 14]。このようにタンデムリアクタを用いれば翻訳後修飾の解析も短時間で容易に可能になる。

5. おわりに

以上、本稿では加水分解反応に焦点を当ててマイクロ化学デバイスの紹介を行った。我々の開発したマイクロ化学デバイスを用いることにより、従来は数日かかっていたタンパク質配列解析が、最短1~2時間で加水分解から質量分析までを行うことが可能となった。また、ジスルフィド結合様式や翻訳後修飾への応用も可能な事を示すことができた。マイクロ化学デバイスの研究自体はキャピラリー電気泳動やクロマトグラフィーの微細化から派生した物であるため、これらを質量分析、特にESIのインターフェイスとしてオンラインで用いる研究は先行しており、すでに市販されている物もある[1]。また、マイクロ化学デバイスの特長である機能集積化の容易さを生かすことにより、分離・精製部と加水分解部を集積化した質量分析用のインターフェイス開発も進められている。我々も本稿で述べた独自の加水分解反応技術を切り口にして、機能集積化デバイスを開発して質量分析のインターフェイス化を進め、プロテオミクス解析の簡略化を目指していきたい。

最後に、本研究は産総研の以下の方々との共同研究で行ったものである。この場を借りて感謝申し上げたい。（敬称略）山口浩（現：東海大阿蘇教育セ）、本田健（現：山口大院医）、前田英明。

参考文献

1. Lee, J., Soper, S. A. and Murray, K. K., *J. Mass Spectrom.*, **44**, 579-593 (2009).
2. Miyazaki, M. and Maeda, H., *Trends Biotechnol.*, **24**, 463-470 (2006).
3. Liu, J., Lin, S., Qi, D., Deng, C., Yang, P. and Zhang, X., *J. Chromatogr. A*, **1176**, 169-177 (2007).
4. Park, Z.-Y. and Russell, D. H., *Anal. Chem.*, **72**, 2667-2670 (2000).

5. Honda, T., Miyazaki, M., Nakamura, H. and Maeda, H., *Chem. Commun.*, 5062-5064 (2005).
6. Honda, T., Miyazaki, M., Nakamura, H. and Maeda, H., *Adv. Synth. Catal.*, **348**, 2163-2171 (2006).
7. Yamaguchi, H., Miyazaki, M., Honda, T., Briones-Nagata, M. P. P., Arima, K. and Maeda, H., *Electrophoresis*, **30**, 3257-3264 (2009).
8. Yamaguchi, H., Miyazaki, M., Honda, T. and Maeda, H., *Peptide Science* 2008, 519-520 (2009).
9. Yamaguchi, H., Miyazaki, M., Kawazumi, H. and Maeda, H., *Anal. Biochem.*, **407**, 12-18 (2010).
10. Saito, K., Yasuo, I., Uchimura, H., Koide-Yoshida, S., Mizuguchi, T. and Kiso, Y., *Proteomics*, **10**, 1505-1509 (2010).
11. Yamaguchi, H., Miyazaki, M. and Maeda, H., *Proteomics*, **10**, 2942-2949 (2010).
12. Miyazaki, M., Yamaguchi, H. and Maeda, H., *Peptide Science* 2010, in press. (2011).
13. Sugiyama, N., Masuda, T., Shinoda, K., Nakamura, A., Tomita, M. and Ishihama, Y., *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 1103-1109 (2007).
14. Yamaguchi, H., Miyazaki, M., Yoshizuka, S., Kawazumi, H. and Maeda, H., *Peptide Science* 2009, 451-454 (2010).

みやざき まさや
産業技術総合研究所
生産計測技術研究センター
m.miyazaki@aist.go.jp

環状ジペプチド型微小管作用薬 Plinabulin の結合様式解析研究

1. はじめに

Plinabulin (**1**, NPI-2358/KPU-2) は, *Aspergillus ustus* から単離された天然化合物 (−)-フェニラヒスチン¹⁾ をリード化合物として当研究室の林らによって開発されたジケトピペラジン型の微小管作用薬であり, 強力な殺細胞活性 ($IC_{50}=15$ nM, HT-29 cells) を示す²⁾ (図1)。微小管作用薬といえば, コルヒチン, ビンカアルカロイド, タキサンなどの低分子化合物が古くから知られているが, その中でも, ビンカアルカロイドやタキサンは, 抗がん剤として既に臨床で使用されており, 患者の生存期間改善など癌治療に大きく貢献してきた。我々が開発した plinabulin は, そのような既存の微小管作用薬とは作用が少し異なっており, 腫瘍部位へ誘導・新生される未熟な血管内皮細胞に選択的に障害を与えて固形がん組織の壊死を引き起こす新しいクラスの抗がん剤「腫瘍部新生血管障害剤 (Vascular Disrupting Agent, VDA)」としての作用も有することが明らかとなった²⁾。この作用が評価され, 現在, 抗がん剤の医薬品候補化合物として米国を含む5カ国で第2相臨床試験が進行中である。この plinabulin は, 細胞骨格のひとつである微小管に直接作用し, 微小管の脱重合を引き起こすことで VDA の作用



山崎 有理

を発揮することが分かっている。微小管は α , β -チューブリンのヘテロダイマーが重合した生体高分子であるが, plinabulin の α および β チューブリンに対する分子レベルでの結合様式は明らかになっていない。我々は, plinabulin の結合様式を分子レベルで解明することは, 理論に基づいた創薬研究および臨床応用の観点から重要であると考え, 光親和性標識という化学的手法を利用して結合様式を解析することにした。

2. 光親和性ビオチン化誘導体の設計と合成

光親和性標識実験のスタートは, 対象となる生理活性化合物の「光親和性誘導体 (ケミカルプローブ)」を合成することである。ケミカルプローブの条件としては, ①光反応基を有すること, ②光反応進行の検出タグを有すること, ③本来の化合物が有する活性を有していることが必要である。我々は, 光反応基としては光親和性標識でよく利用されているベンゾフェノン, 検出タグにはビオチン構造³⁾ を選び, ケミカルプローブとして光親和性ビオチン化誘導体の合成を行うことにした。

まず, 我々が長年行ってきた plinabulin の構造活性相関研究の結果に基づき, plinabulin のベンジリデンのメタ位にベンゾイル基を導入することでベンゾフェノン構造を構築した誘導体 KPU-244 (**2**, 図1) を合成し, 活性を評価したところ, 誘導体 **2** は強力な殺細胞活性を示した ($IC_{50}=4$ nM, HT-29 cells)。このように, 活性の低下を伴うことなく光反応基を導入することに成功したので, 誘導体 **2** を基本構造として, 次に, ケミカルプローブとなる数種類のビオチン化誘導体を開発することにした。すなわち, ケミカルプローブとして, 誘導体 **2** のベンゾフェノン4位にビオチン構造を導入した KPU-244-B2 (**3**) と, そのビオチンリンカーを長くした KPU-244-B3 (**4**), さらに, ベンゾフェノンと反対側の位置にあるオキサゾール環上の *tert*-ブチル基にビオチン構造を導入した KPU-252-B1 (**5**) の複数の光親和性ビオチン化誘導体を設計し, これらの誘導体を合成した (図1)。

3. 光親和性ビオチン化誘導体の活性評価

次に, 合成した誘導体の生物活性を評価するために, チューブリン結合アッセイおよび *in vitro* 殺細胞活性評価を行った。その結果, 各誘導体は親化合物である plinabulin よりも活性が減弱したものの, 本来の化合物が有する活性を維持できていることが示唆された。このことから, 合成した誘導体はケミカルプローブとして機能できることが期待されたので, 続いて, チューブリン光親和性標識実験を行うことにした。

4. チューブリン光親和性標識

合成したプローブを用いてチューブリン光親和性標識実験を行った。精製したチューブリンと各プローブを MES バッファー中で 37℃ でインキュベートした後, 365 nm の UV を照射し, 光標識を行った。光標識の進行は, ストレプトアビジン-HRP を用いたウエスタンブロッティングで確認した。その結果, 全てのプローブ (**3-5**) において光照射時間依存的な光標識が検出された (図2A)。また, 興味深いことに, プロー

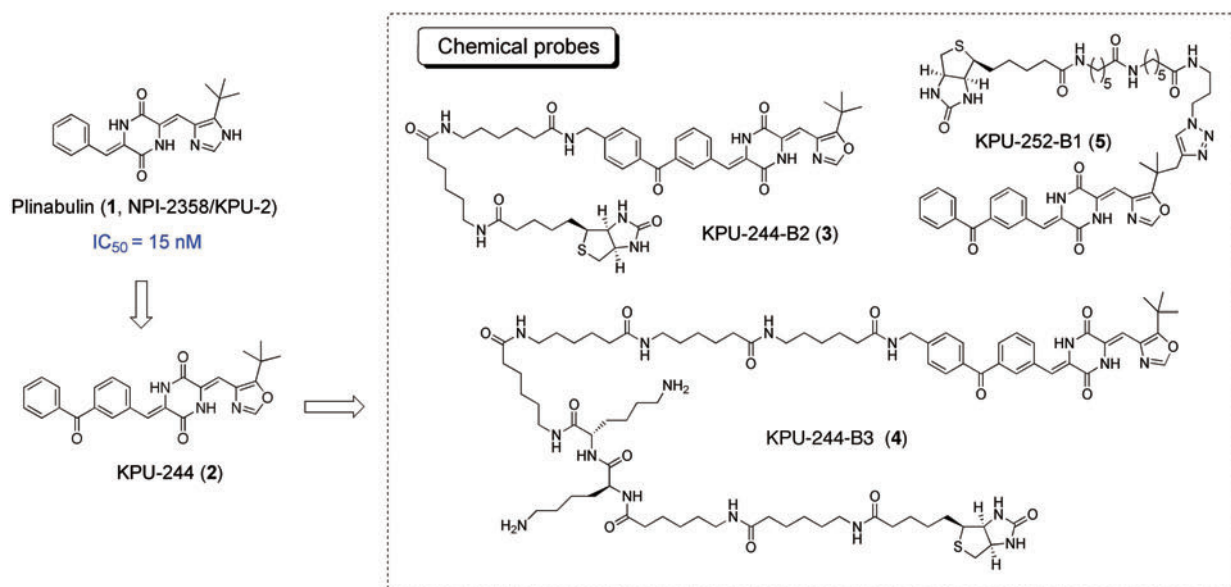


図1 Plinabulin (1), KPU-244 (2) と、光親和性ビオチン化誘導体 (3-5) の構造。

プローブ 3 とプローブ 4 を用いたときの光標識の検出結果を比べてみると、長鎖ビオチンリンカーを有するプローブ 4 を用いた実験では、リンカーの短いプローブ 3 のときの不鮮明な検出結果とは異なり、光標識されたチューブリンが 2 本のバンドとして検出された。検出された解像度の違いは、おそらく、ウエスタンブロットにおいて、リンカーを伸長したことによりビオチン-アビジン結合に基づく検出がよりされやすくなったためと考えている。これらの 2 本のバンドについては、イムノブロット解析の結果から、上方のバンドは α -チューブリン、下方のバンドは β -チューブリンであることが示唆され、このことからプローブ 4 は α, β -両方のチューブリンサブユニットを光標識したことが考えられた (図 2B)。

また、観察された光標識の特異性を検討すべく、plinabulin またはコルヒチンを competitor に用いて競合実験を行った。その結果、プローブ 3-5 による光標識は、plinabulin あるいはコルヒチンと濃度依存的に競合した。一方、コントロールとして用いたビオチンとは競合しなかった (図 2C)。以上の結果から、①合成したプローブはいずれも plinabulin の結合部位探索のための有用なプローブとして機能し、②それらはチューブリン上のコルヒチン結合部位周辺の、③ α, β -両方のチューブリンサブユニットを光標識していることも示された。また、④ビオチン構造をベンゾフェノン側に導入してもオキサゾール側に導入してもプローブは同じ様式でチューブリンを光標識したことが示唆された。③、④の結果から、プローブは α, β -チューブリン境界面の分子表面近くを認識していることが考えられた。

さらに、光親和性標識実験で得られた①から④の結果をもとに plinabulin 誘導体のコルヒチン結合部位周辺における結合様式を分子レベルで考察するため、カナダ CCG 社製 Molecular Operating Environment modeling package (MOE 2008. 10, Chemical Computing Group, Inc., Montreal, Canada) を用いて、チューブリンと plinabulin 誘導体のドッキングスタディを行っ

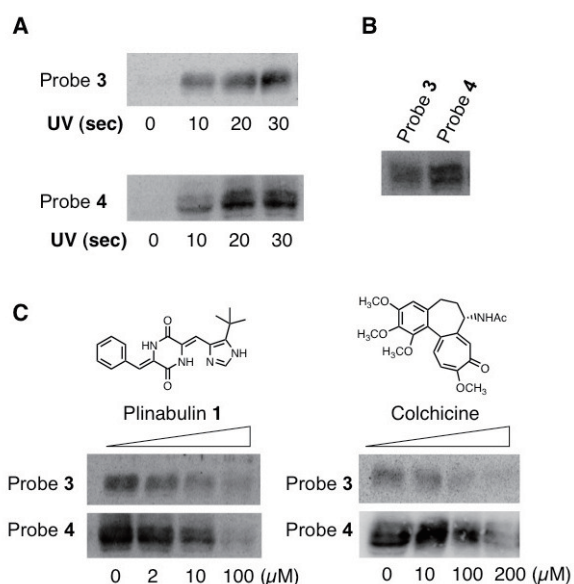


図2 ケミカルプローブ 3, 4 によるチューブリン光親和性標識の検出結果。(A) 照射時間依存的な光標識、(B) プローブ 3 と 4 による光標識の比較、(C) Plinabulin またはコルヒチンとの競合実験。

た。その結果、plinabulin 誘導体は、コルヒチン結合部位全体を認識しているのではなく、*tert*-ブチル基部分のみがコルヒチン結合部位を占めた状態で、より分子表面に近い α, β -チューブリンサブユニット境界面に作用していることが示唆された⁴⁻⁶⁾ (図 3)。

5. おわりに

以上のように、ビオチンリンカーの長さあるいは導入部位の異なる複数のケミカルプローブを設計・合成し、それらを用いて光親和性標識実験を行い、plinabulin の作用メカニズムを考察した。その結果、plinabulin やその誘導体はコルヒチン結合部位全体を認識しているのではなく、コルヒチン結合部位周辺の α, β -チューブリンサブユニット境界面に作用するこ

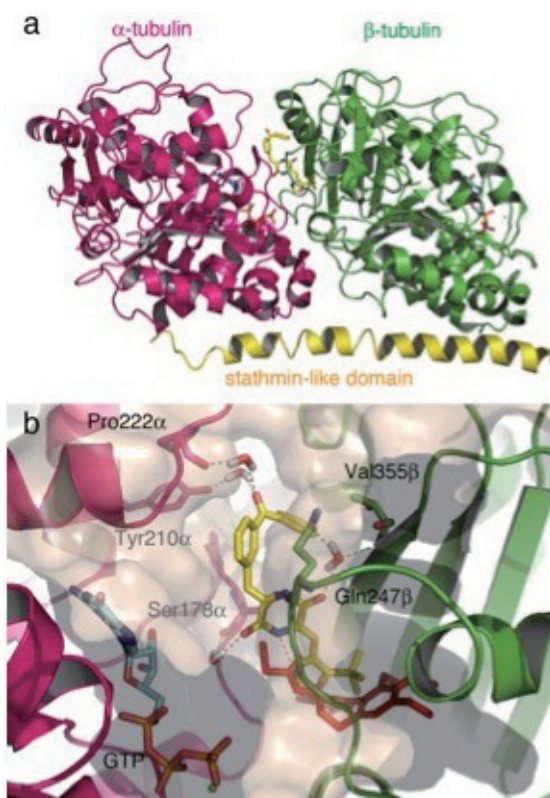


図3 光親和性標識実験の結果に基づいたチューブリンと誘導体2とのドッキングスタディ。

とで、微小管の脱重合を導いていることが示唆された。本研究は、これまで未着手であったジケトピペラジン型微小管作用薬の作用メカニズム解析の一戦略と、作用様式に関する新たな知見を提供するものである。しかし、結合様式をより詳細に、正確に解析するためには、質量分析などにより光標識されたアミノ酸残基を同定する作業が必要である。これまで光標識されたアミノ酸残基（フラグメント）の同定を行うべく、様々な方法を試みたが、期待する結果はまだ得られていない。本手法で、何とか光標識部位をより詳細に明らかにできないかと、試行錯誤を重ねている。

最後になりましたが、この度はPNJでの研究紹介の機会を頂き、ありがとうございました。本研究は、東京薬科大学薬学部 林良雄教授、京都薬科大学 木曾良明教授（現 長浜バイオ大学客員教授）を始めとする多くの先生方のご指導とご協力を得て実施したものです。お世話になった皆様に心から感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) Kanoh, K.; Kohno, S.; Asari, T.; Harada, T.; Katada, J.; Muramatsu, M.; Kawashima, H.; Sekiya, H.; Uno, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2847–2852.
- 2) Nicholson, B.; Lloyd, G. K.; Miller, B. R.; Palladino, M. A.; Kiso, Y.; Hayashi, Y.; Neuteboom, S. T. C. *Anti-Cancer Drugs* **2006**, *17*, 25–31.
- 3) Hofmann, K.; Kiso, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1976**, *73*, 3516–3518.
- 4) Yamazaki, Y.; Kohno, K.; Yasui, H.; Kiso, Y.; Akamatsu, M.; Nicholson, B.; Deyanat-Yazdi, G.; Neuteboom, S.;

Potts, B.; Lloyd, G. K.; Hayashi, Y. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 3074–3081.

- 5) Yamazaki, Y.; Sumikura, M.; Hidaka, K.; Yasui, H.; Kiso, Y.; Yakushiji, F.; Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3169–3174.
- 6) Yamazaki, Y.; Kido, Y.; Hidaka, K.; Yasui, H.; Kiso, Y.; Yakushiji, F.; Hayashi, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 595–602.

やまざき ゆり
東京薬科大学薬学部 薬品化学教室
yuyama@toyaku.ac.jp

第48回ペプチド討論会

会 期 平成23年9月27日（火）～29日（木）

会 場 札幌コンベンションセンター
（札幌市白石区東札幌6条1丁目1-1）

ホームページ <http://www.ec-pro.co.jp/48jps/index.htm>

主 催 日本ペプチド学会

共 催 日本化学会、日本生化学会、日本薬学会、
日本農芸化学会

発表申込・アブストラクト受付期間

6月1日（水）～7月29日（金）

（発表申込とアブストラクトの締切は同日です）

受諾通知 8月20日頃（E-mailにて通知予定）

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・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

発表形式

- 1) 口頭発表：日本語または英語による一般講演
- 2) ポスター発表：英語

発表申込方法

第48回ペプチド討論会の上記HPより「発表申込およびアブストラクト登録」フォームに情報を入力後、アブストラクトを郵送してください。詳細はHPを参照してください。

参加登録 事前参加登録締切 8月19日（金）

一般（含プロシーディング）：

（ペプチド学会員・共催学会員）6,000円、
（非会員）10,000円

学生（プロシーディング無し）：

（ペプチド学会員・共催学会員）3,000円、
（非会員）5,000円

（注）8月20日以降は当日登録となり、一般会員で、2,000円、学生会員で1,000円高くなります。

懇親会

9月28日（水）札幌コンベンションセンター



48JPS ポスター



クラーク博士像



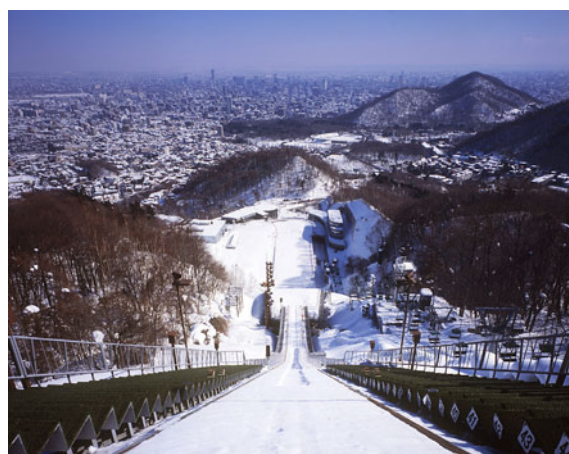
札幌コンベンションセンター



旧北海道庁（赤レンガ）



札幌市時計台



大倉山スキージャンプ台

参加費：一般 8,000 円，学生 4,000 円

市民フォーラム

日時：平成 23 年 10 月 1 日（土）午後

場所：北海道大学学術交流会館

（札幌市北区北 8 条西 5 丁目）

討論会世話人 坂口和靖

（北海道大学大学院理学研究院）

問い合わせ・申込先

〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目

北海道大学大学院理学研究院

化学部門 生物化学研究室

第 48 回ペプチド討論会実行委員会 坂口和靖

E-mail: 48jps@sci.hokudai.ac.jp

Tel: 011-706-2698 Fax: 011-706-4683

第 16 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会

一般演題募集中

演題応募〆切 平成 23 年 5 月 30 日（月）

応募案内 <http://jspp.kenkyuukai.jp/>

学術集会長： 木曾良明（長浜バイオ大学ペプチド科学研究室 客員教授）

会 期：平成 23 年 8 月 26 日（金）・27 日（土）

会 場：千里ライフサイエンスセンター
（大阪，豊中市）

学会参加費：会員 2,000 円

非会員 5,000 円 学生無料

本学会学術集会は日本ペプチド学会協賛のため，日本ペプチド学会員の参加費は会員扱いです。

連絡先：〒634-8522 橿原市四条町 840

奈良県立医科大学産婦人科学教室内

TEL：0744-29-8877

FAX：0744-23-6557

E-mail: cpipt@narmed-u.ac.jp

8 月 26 日（金）11：50～開会式 12：00～講演会

◆特別講演「化学生態学とタンパク毒」

上村大輔先生（神奈川大学理学部化学科 教授）

◆教育講演「日本人 2 型糖尿病において食後血糖上昇の意味するところ」

武田 純先生（岐阜大学大学院医学系研究科 内分泌代謝病態学 教授）

◆基調講演「考える腸，働く脾臓－臓器・細胞連関から見直す，2 型糖尿病の成り立ちとその対策」

難波光義先生（兵庫医科大学内科学糖尿病科 主任教授）

◆シンポジウム『糖尿病（2 型）の新しい治療法とプロテアーゼとその阻害剤』

はじめにオーガナイザーより

永津俊治先生：DPP-IV/CD26 の発見の歴史と糖尿病薬創薬：serendipitous discovery

池原征夫先生：DPP-IV/CD26 の生化学分子生物学

●「インクレチンの生理作用」

山田祐一郎先生（秋田大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝・老年内科学 教授）

●「DPP-IV 阻害薬の心血管に対する作用」

綿田裕孝先生（順天堂大学大学院医学系研究科 代謝内分泌学 教授）

●「DPP-IV 阻害薬の糖尿病治療薬としての展望と問題点」

寺内康夫先生（横浜市立大学大学院医学研究科 分子内分泌・糖尿病内科学 教授）

◆一般ポスター講演

8 月 27 日（土）9：00～講演会

◆会長講演「ペプチド化学を基盤とする創薬科学研究：難病克服をめざして」

木曾良明先生（長浜バイオ大学ペプチド科学研究室 客員教授）

◆ワークショップ『ホットトピックス 2011』

オーガナイザー(株)カネボウ化粧品 執行役員 井上紳太郎先生

SBI アラプロモ(株) 執行役員 CSO 中島元夫先生

●神谷直洋先生（田辺三菱製薬(株) 研究本部薬理第一研究所 薬理第一部）

●横山信治先生（名古屋市立大学医学部生化学 教授）

●川畑篤史先生（近畿大学薬学部病態薬理学研究室 教授）

●鈴木宏治先生（鈴鹿医療科学大学薬学部 教授）

◆“Young Investigator's Award of JSPP 2011” 選考結果発表

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）