



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.81

2011 年 9 月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

膠コラーゲンの文化財・歴史科学への応用

はじめに

哺乳類中に最も多く存在するタンパク質であるコラーゲンは、結合組織に必須の強度と弾性を与えるだけでなく、細胞分化・成長に重要な働きを示すことから、近年バイオマテリアルとして医療分野への応用が注目されている。しかしながら、古代文明以来、人類がコラーゲンを接着剤や顔料の固着剤の主成分、すなわち膠（ニカワ = animal glue）として工芸や美術などの幅広い分野に利用してきた素材であることはあまり知られていない。我々は、現代に残る様々な文化財試料中のコラーゲンの自然科学的分析に基づく歴史学の研究を試みている。古代 DNA が直面している経年劣化の問題と同様に、数千年の時を経てタンパク質が分析可能な状態で存在することは一般的に難しいと考えられるが、八千万年前の骨中から抽出したコラーゲンのアミノ酸配列解析により恐竜の進化上の位置を特定する報告がある^{(1), (2)}。このような安定性はコラーゲンの特徴的な三重螺旋構造及び繊維構造が関係すると考えられる（図 1）。ここでは、コラーゲンを含む文化財試料として、古代において唯一の筆記用具であり、職人の知恵と技術の結晶とも呼べる墨をとり上げ、その墨に含まれる膠の分析によって得られる歴史情報とその意義について考察する。



河原 一樹

1. 墨と膠

墨は、漢字を発明した中国で誕生し、『日本書紀』によれば、日本には 610 年に高句麗からの渡来僧曇徴によって伝えられたとされる。煤と溶かした膠を練り合わせ、成型、乾燥させる過程を踏む製造法は、古代から現代まで基本的に変わらない。膠の原料となった動物種として、古代中国では、6 世紀北魏の『齊民要術』に、牛、水牛、豚、ロバ、馬、ラクダ、ラバが挙げられており、前漢の『列女伝』には、河魚の浮き袋の記載がある⁽³⁾。また、宋代の『墨譜法式』には、鹿膠の記載も発見できる。一方、日本では、平安中期の『和名抄』、『延喜式』に牛皮の記載が確認できる。

このように、古代の人々は、様々な動物の皮や骨からコラーゲンを抽出し、接着力のある膠で煤を固めることで、文化の象徴と言える文字を書くための墨という洗練された筆記用具を考え出した。コラーゲンの種類は墨の性質に影響するものと考えられるが、後に述

べるように原料を同定するのが困難なほど、アミノ酸配列は動物種によらず極めてよく似ている。それにもかかわらず古代から多様な動物が原料に用いられてきたことは、何を意味しているのだろうか？この謎を解くためには、まず幅広い地域・年代に渡る墨を収集し、その墨の中に含まれる膠のコラーゲンの原料となった動物種を明らかにする必要がある。次項では、江戸時代に製造された墨の分析を通して、我々のアプローチを紹介する。

2. 江戸時代の墨の質量分析

今回分析した墨は（図 2）、室町時代末期に創業した日本最古の墨屋である（株）古梅園所蔵の墨で、西暦 1741 年（清・乾隆 6 年）に清国徽州の印工が作ったものであることが『古梅園墨譜』に記載されている。図 3 には我々が用いた分析手順の概要を示してある。文化財試料は、極微量（可能な限り非破壊）分析が望まれるため、表面から極少量（約 1mg）の粉末を削り取り分析に用いた。動物種の同定には、プロテオミクス分野で微量タンパク質の同定法として標準的

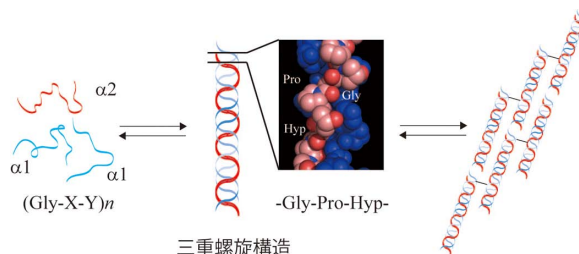


図 1 コラーゲンの三重螺旋構造。皮や骨の主成分である I 型コラーゲンは、2 本の $\alpha 1$ 鎖と 1 本の $\alpha 2$ 鎖からなる三重螺旋構造を形成し、さらに高次の繊維構造を形成する。配列中の多くの Pro は翻訳後修飾によって水酸化されヒドロキシプロリン [Hyp=P(O)] に変換されることが知られる。配列中に Gly-Pro-Hyp- のトリプレットが多いこともコラーゲンの特徴である。

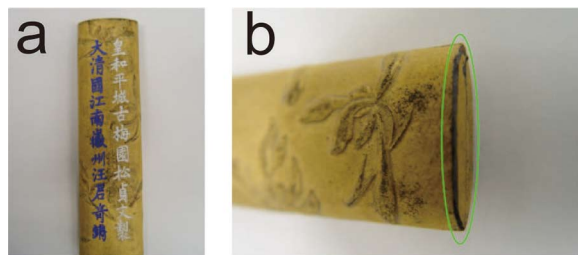


図 2 1741 年に製造された（株）古梅園所蔵の墨。(a) 全体図、(b) 分析試料として、約 1mg を削り取った部分。

に用いられているマトリックス支援レーザー脱離／イオン化 (MALDI) 質量分析法を採用した。コラーゲンの抽出は、乳鉢上で炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) と試料を混合することで行い、フィルター (0.2 μm) でろ過した溶液を 60 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間程度静置しコラーゲンを変性させた後、トリプシンで消化した。得られたペプチド断片は、Ziptip-C18 固相抽出カラムで脱塩・濃縮した後、MALDI タンデム飛行時間型 (MALDI-TOF/TOF) 質量分析計で分析を行った。

MALDI-TOF スペクトルに示すように、江戸時代の墨試料から多くのペプチド由来の信号を観測することができた (図 4a)。そこで、観測された各ペプチドに He ガスを衝突分解させることで得られる MS/MS スペクトルの分析によってアミノ酸配列の解析を行った (図 4b)。Mascot データベース検索の結果、図 4a に示す比較的強度の強い 14 本の信号の全てが、データベースに配列情報が登録されている牛の I 型コラーゲン ($\alpha 1$ 鎖もしくは $\alpha 2$ 鎖) のものと一致した (表 1)。この結果は、わずか 1mg の分析試料からアミノ酸配列解析ができたことを示すもので、今後更なる微量化も可能である。

しかし、文献に記載の原料動物種の内、2011 年 8 月の時点でデータベース上にコラーゲン (少なくとも I 型コラーゲン) の配列情報が登録されているものは牛以外に存在せず、馬や豚などは部分配列が登録されて

いるのみである。そのため、たとえ MS/MS 分析の結果が牛を支持したとしても、各ペプチド配列の I 型コラーゲン全長配列に対するカバー率が高くないことから、完全に牛と断定することは難しく、現時点では、文献に記載のある動物種の膠をそれぞれ独自に調製し、それらの質量分析を実施し標準試料のデータの蓄積を行う必要があった。

3. 動物膠の質量分析

現在までに、牛および鹿の皮、そして魚 (ニベ) の浮き袋から抽出したコラーゲンを原料とした膠を調製し、それぞれの MALDI-TOF スペクトルを取得した。その結果、江戸時代の墨に観測された全ての信号は、牛皮より抽出したコラーゲンの消化ペプチドに由来する信号のいずれかで説明できることが明らかとなった (図 5a)。更に、動物種間のスペクトル

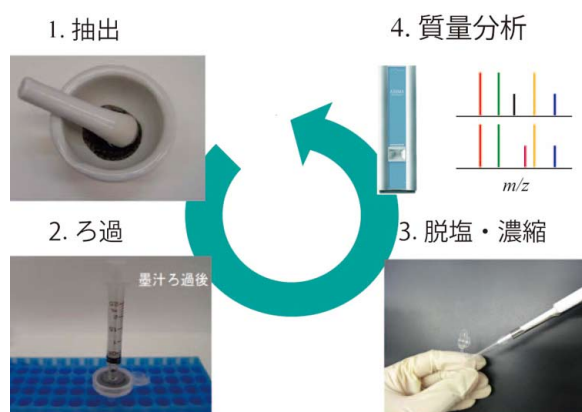


図 3 墨試料の分析過程。

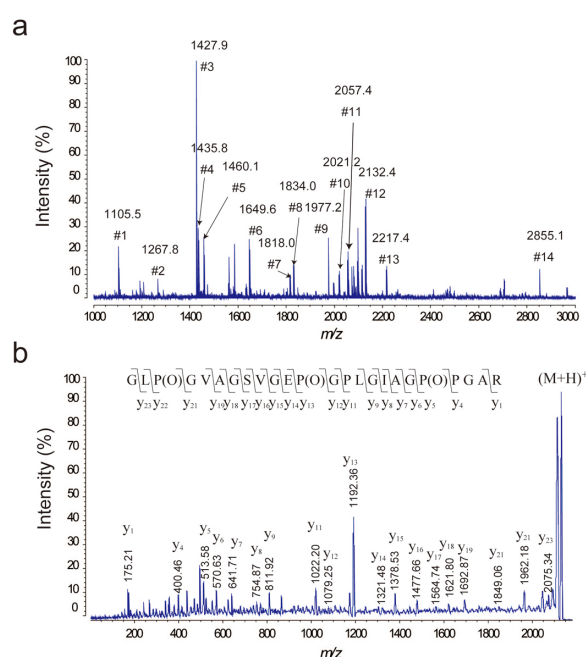


図 4 1741 年に製造された (株) 古梅園所蔵の墨の質量分析結果。(a) MALDI-TOF スペクトル。(b) m/z 2132 の信号に対する MALDI-TOF/TOF スペクトル。

表 1 江戸時代の墨のコラーゲンのアミノ酸配列解析結果

m/z (#)	アミノ酸配列 ^a	鎖 (型)
1105.5(1)	G(685)VQGPPGP(O)AGPR(696)	$\alpha 1$ (I)
1267.8(2)	G(326)IP(O)GPVGAAGATGAR(340)	$\alpha 2$ (I)
1427.9(3)	G(572)IP(O)GEFGLP(O)GPAGAR(586)	$\alpha 2$ (I)
1435.8(4)	G(472)EP(O)GPAGLP(O)GPPGER(486)	$\alpha 1$ (I)
1460.1(5)	G(865)SAGPP(O)GATGFP(O)GAAGR(881)	$\alpha 1$ (I)
1649.6(6)	G(380)STGEIGPAGPPGPPGLR(397)	$\alpha 2$ (I)
1818.0(7)	G(994)P(O)PGPMGPPGLAGPP(O)GESGR(1013)	$\alpha 1$ (I)
1834.0(8)	G(994)PP(O)GP(O)MGP(O)PGLAGPPGESGR(1013)	$\alpha 1$ (I)
1977.2(9)	S(1062)GDRGETGPAGPAGPIGPVGAR(1083)	$\alpha 1$ (I)
2021.2(10)	G(448)EP(O)GPTGIQGP(O)GPAGEEGKR(468)	$\alpha 1$ (I)
2057.4(11)	E(463)GPVGLPGIDGRPGPIGPAGAR(484)	$\alpha 2$ (I)
2132.4(12)	G(881)LP(O)GVAGSVGEP(O)GPLGIAGP(O)PGAR(904)	$\alpha 2$ (I)
2217.4(13)	G(910)ETGPAGRP(O)GEVGP(O)P(O)GPPGPAGEK(933)	$\alpha 1$ (I)
2855.1(14)	G(763)LTGPIGPPGP(O)AGAP(O)GDKGEAGP SGPAGPTGAR(795)	$\alpha 1$ (I)

^a 各ペプチドの先頭と末尾のアミノ酸配列番号は、牛 (*Bos taurus*) の N 末端からの順番に従って付した。

の詳細な比較から、各動物種に特有のペプチドマーカーを見出すことが出来た。例えば、牛および鹿の m/z 値が 1460 に観測されるペプチド (GSAGPP(O)GATGFP(O)GPPGER) に相当するペプチドは、魚 (ニベ) の場合、 m/z 値が 1486 に観測され、その配列は GPSGPP(O)GATGFP(O)GPPGER であり下線部の 2 残基のみ異なる (図 5b)。また、牛において m/z 値が 2853 を持つペプチド (GLTGPIGPPGP(O)AGAP(O)GDKGEAGPSGPAGPTGAR) は、鹿では m/z 値が 2884 として観測されており、そのペプチドの配列は、相当する牛のペプチドの下線部の Ala が Thr に置き換わっただけであった⁽⁴⁾。魚 (ニベ) では、それらに相当するペプチドを観測することはできなかった。結果的に、江戸時代の墨の MALDI-TOF スペクトル中で、牛に特異的なマーカーペプチド (m/z 値が 1460 と 2853) が観測されており、これらのマーカーペプチドによって、使用された原料は牛皮であると断定できる。

ここで、これまで述べていなかったが、配列の至る処に見受けられるプロリン (P) の翻訳後修飾に注意したい。コラーゲンは、プロリンが高い割合で翻訳後修飾され、ヒドロキシプロリン [Hyp = P(O)] に変換されることが知られる。その変換率は、同じ I 型コラーゲンでも皮や骨、腱で異なり⁽⁵⁾、また同じ配列であっても動物種間で差があることが我々のデータからも明らかである (図 6)。このような修飾数の差は、個々のコラーゲンの物性の差を決める要因として興味深く、今後より詳細な解析を行う必要がある。更に、本稿では紹介しなかったが、コラーゲンには、経年に伴い脱アミド化や分子内架橋などの修飾が起こることが知られ^{(6), (7)}、それらの考古学分野への応用も興味深い。但し、動物種の同定の観点から考えると、これら

の修飾はスペクトルの複雑化を起し、データベース検索の際の誤差を生じさせる原因ともなる。そのため、コラーゲンの場合は、既存のアミノ酸配列データベースが充実したとしても、独自に膠試料のライブラリを作製し、上記のマーカーペプチドを用いながら、個々のデータを精査していくことが必要となるだろう。

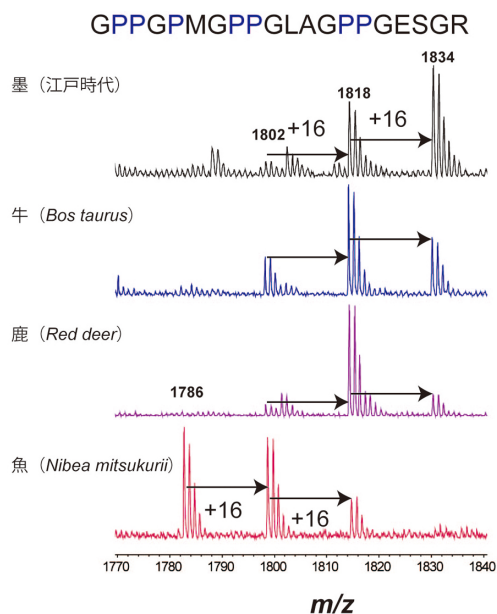


図 6 MALDI-TOF スペクトル (図 5a) の m/z 1770~1840 の領域の拡大図。図中で、 m/z 1818 の信号は、MS/MS 分析の結果、GP(O)PGPMGPPGLAGPP(O)GESGR と帰属される。その信号の前後に、 ± 16 の差を示す一連の信号が観測されているが、それらはペプチド中の翻訳後修飾の数の差に由来する。

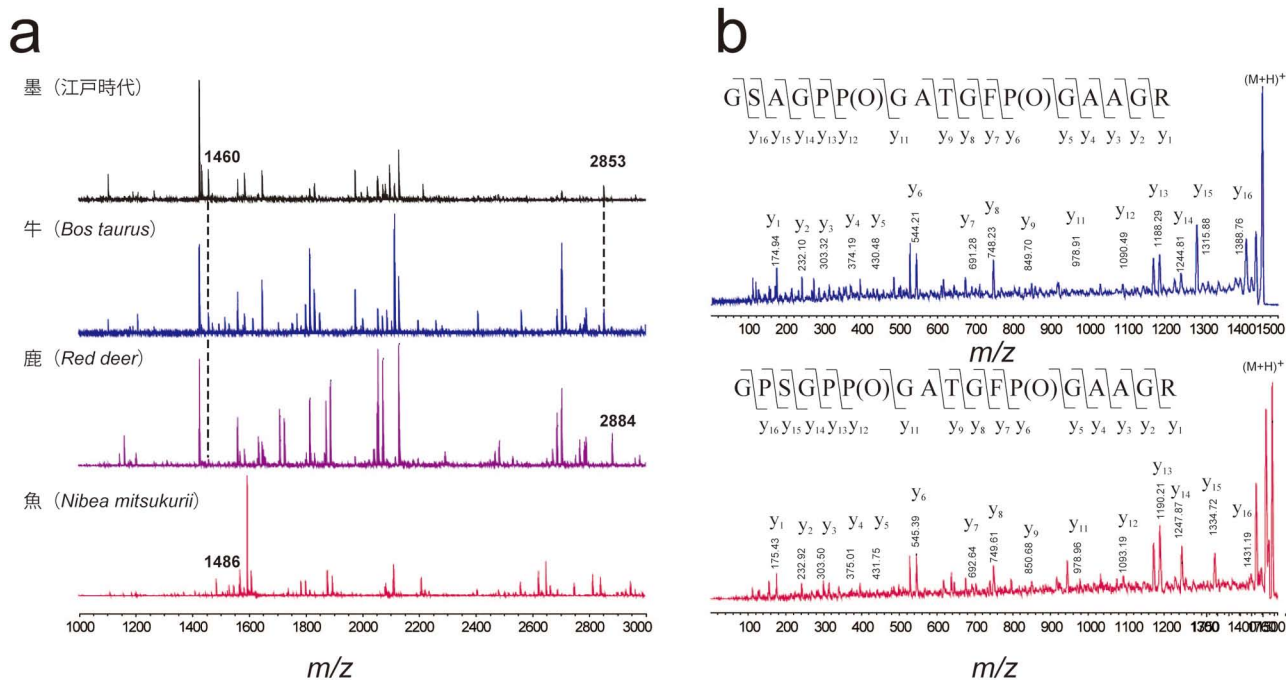


図 5 1741 年に製造された墨および各種動物膠の質量分析結果。(a) MALDI-TOF スペクトル。(b) MALDI-TOF/TOF スペクトル。 m/z 1460 の信号 (牛、鹿、墨試料) に関して測定した結果を上段、 m/z 1486 の信号 (魚) に関して測定した結果を下段に示す。 m/z 1460 に関しては、牛のスペクトルのみ示した。

おわりに

今回対象とした1741年に製造された(株)古梅園所蔵の墨に含まれるコラーゲンの分析結果から、およそ270年の歳月を経ているにも関わらず、我々の提案する方法で、墨中の膠に用いられたコラーゲンの動物種の特定が可能であることが示された。この結果は、コラーゲンの分子構造が現代の牛皮由来のコラーゲンと違いがなかったことによるものである。したがって、本法によって、今後さらに数百年から数千年時代を遡った古代史試料中のコラーゲンの解析にも期待が持てる。墨に含まれる膠の分析法の研究対象は、墨だけでなく、墨書や水墨画などにも広げられる。日本には、平城京から出土した多くの墨を始めとして、アジア大陸から仏教とともに墨と紙が伝わったとされる7世紀の推古朝以来、各地に分析可能な膠試料が多く保存されていると考えられる。今後出来る限り多くの墨試料を分析し、得られる情報(例えば、用途、地域、年代ごとに用いられた原料膠の違い)を整理し、日本を含むアジアの文化史・技術史の一端を明らかにしていきたい。

本研究は、奈良女子大学理学部化学科の中沢隆教授を中心とした奈良女子大学古代史・環境史プロテオミクス研究創成事業の一環として行われたものである。質量分析一般は、島津製作所の山崎雄三博士との共同研究である。膠試料に関しては、(財)元興寺文化財研究所の植田直見氏、山内章氏に協力頂いた。関係の皆様へ深く感謝致します。尚、最新の成果に関しては、プロジェクトホームページ(URL: <http://www.nara-wu.ac.jp/proteome/aprp/index.html>)を参照されたい。

参考文献

- 1) J. M. Asara, M. H. Schweitzer, L. M. Freemark, M. Phillips, L. C. Cantley, *Science*, **2007**, 316, 280.
- 2) M. H. Schweitzer, W. Zheng, C. L. Organ, R. Avci, Z. Suo, L. M. Freemark, V. S. Lebleu, M. B. Duncan, M. G. V. Heiden, J. M. Neveu, W. S. Lane, J. S. Cottrell, J. R. Horner, L. C. Cantley, R. Kalluri, J. M. Asara, *Science*, **2009**, 324, 626.
- 3) 中沢隆, 山崎雄三, 古代学, **2010**, 2, pp. 17-27.
- 4) K. Kawahara, Y. Yamazaki, A. Ogami, H. Kuyama, M. Muruguma, N. Ueda, A. Yamauchi, A. Miyaji, Y. Matsuo, O. Nishimura, T. Nakazawa, *Proceedings of the 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **2011**, THP29.
- 5) D. R. Eyre, M. Weis, D. M. Hudson, J. Wu, L. Kim, *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 7732.
- 6) G. Leo, I. Bonaduce, A. Andreotti, G. Marino, P. Pucci, M. P. Colombini, L. Birolo, *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 2056.
- 7) L. Knott, J.F. Bailey, *Biochem. J.*, **1997**, 322, 535.

かわはら かずき
奈良女子大学
古代学学術研究センター・特任助教
kawahara@cc.nara-wu.ac.jp

蛋白質間相互作用ネットワークの 解明と制御を目指した蛋白質工学

1. はじめに

蛋白質間相互作用とそれが発揮する細胞内の生命現象の解明を目指した研究はあまた存在するが、こういった手法を用い、どこまでを理解しようとするのか(理解したつもりになるのか)は、個々の研究者のバックグラウンドや、大仰に言えば研究哲学に大きく左右されることであろう。筆者は、2010年4月より、蛋白質工学の技術を基盤とした研究を推し進めているシカゴ大学のKoide研究室で研究する機会を得ている。本稿では、蛋白質間相互作用の中でも、ペプチド配列モチーフとそれを認識する「蛋白質相互作用ドメイン」間で起こる相互作用に焦点をしばり、Koide研究室で開発され、その解析に威力を発揮する二つの蛋白質分子ツール、“monobody”と“affinity clamp”の概要を解説する。そして、蛋白質相互作用ドメインとペプチド配列モチーフ間の相互作用とそれが発現する生命現象を、蛋白質工学者がどのようなアプローチと哲学で明らかにしようとしているのかを述べたい。



安井 典久

2. 蛋白質間相互作用ドメインとそれによるペプチド配列モチーフの認識

蛋白質相互作用ドメイン(protein interaction domain)は、蛋白質を含む広範な生体分子を認識する蛋白質中のアミノ酸配列単位であり、種々の生物現象に必要な個々の蛋白質の活性制御や細胞内での蛋白質間相互作用ネットワークの中心をなしている¹⁾。数ある蛋白質相互作用ドメインの中には、10アミノ酸前後から構成される短いペプチド配列モチーフを認識するものも多く知られている¹⁾。ペプチド配列モチーフの中には、リン酸化やメチルなどの翻訳後修飾を受けることによって、蛋白質の活性制御に関わるものも少なくない。そのような蛋白質相互作用ドメインとペプチド配列モチーフの組み合わせとして、SH2ドメインとリン酸化チロシン残基を含むモチーフ配列、SH3ドメインとPro-X-X-Pro配列、PDZドメインと蛋白質のC末端配列などがよく知られた例であろう。ここにあげた相互作用ペアに限っても、それらの構造機能相関研究において、ペプチド合成化学が大きく貢献してきたと、本ニュースレターの多くの読者も認識されていることと思う。

ゲノム情報の取得、質量分析などの様々な分析技術や取得した大量のデータの処理方法の開発と発展にともない、いわゆるinteractome解析という蛋白質間相互作用を網羅的に解析する研究がなされるようになってきた。蛋白質相互作用ドメインとペプチド配列モチーフ間の相互作用の場合、相互作用のペアの片方がペプチドということもあって、マイクロアレイを用いた解析でも成果が得られている²⁾。このような大規模な相互作用解析で、細胞内の多数の蛋白質間相互作用が同定されたが、それらのすべてが、生物機能の発現

に重要であるかどうかは疑わしいところがある。一方で、蛋白質間相互作用が発揮する生物機能を明らかにするために、対象とする蛋白質の遺伝子を破壊したり、その発現を抑制したりする遺伝学的方法も採用され、数多くの成果があげられてきた。しかし、interactome 解析で明らかになってきたように、個々の蛋白質や蛋白質相互作用ドメインには、細胞内で多数の結合相手が存在する(図1)。ある特定の蛋白質相互作用ドメインを遺伝学的方法で欠失させてしまうと、研究の対象とする特定の蛋白質とペプチド配列の相互作用以外にも、多数の蛋白質間の相互作用も切断されてしまうことになり、何らかの表現系が観察されたとしても、もはやどの相互作用に起因するのか分からなくなってしまう(図1とその説明を参照)。ある特定の蛋白質相互作用ドメインとペプチド配列モチーフが発揮する生物現象を解明するには、遺伝学的アプローチには決定的な欠陥があると言わざるを得ない。

では、個々の蛋白質相互作用ドメインとペプチド配列モチーフ間で起こる結合の細胞内での機能を明らかにするためにはどのようなアプローチが有効なものであろうか? 少なくとも蛋白質工学に基盤をおいた研究を行う我々は、ある特定の蛋白質相互作用ドメインやペプチド配列モチーフと特異的に結合する人工結合蛋白質の創製とその利用に活路を見出そうとしている。そのような特性を持つ人工蛋白質を細胞内に導入すれば、個々の蛋白質間相互作用を、選択的に阻害することが可能となると考えられるからである。

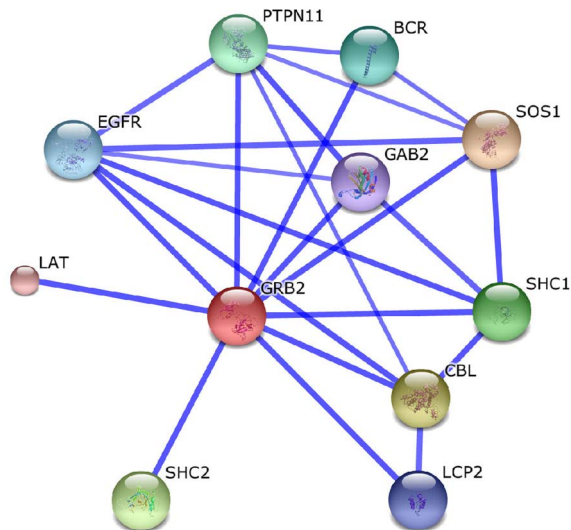


図1 蛋白質間相互作用ネットワークの一例。Grb2(赤い丸印)を中心として、実験的に同定されたヒトの細胞における蛋白質間相互作用(青い実線)を図示した。単純化のためにGrb2を含むわずか11種類の蛋白質(それぞれ異なる色の丸印で表示)に限って描画している。STRING サーバー (<http://string-db.org/>) を用いて作成した。Grb2は一つのSH2ドメインと二つのSH3ドメインとから構成される。例えばGrb2の真上にあるPTPN11との相互作用が発揮する生物現象を調べる目的でGrb2ないしPTPN11を遺伝学的方法で欠失させると、Grb2-PTPN11間以外の多数の蛋白質間相互作用も切断されてしまうことが容易に想像される。

3. 人工蛋白質スキャフォールド

蛋白質をはじめとする生体分子に特異的に結合する蛋白質として、抗体が最もよく知られている。抗体の取得技術は確立され、多くの研究で利用されているものの、①分子量が比較的大きいこと(〜150 kDa)、②分子内に分子の安定化に重要なSS結合が存在すること、などから還元的な細胞内に導入して利用するのには不向きであると考えられる。そこで、抗体に替わる「人工蛋白質スキャフォールド」が開発されてきた³⁾。

抗体の多様な分子に対する特異的な認識能は、抗体分子の表面に露出した6本の短いループ領域、complementary determining regions (CDRs) が担っている。免疫系は、CDRsにアミノ酸配列の多様性を持たせ、特定の抗原に特異的に結合できる抗体分子を選択する。人工蛋白質スキャフォールドでは、安定な蛋白質フォールドを抗体分子の替わりに用い、CDRsを模倣して蛋白質フォールド中のループ領域のアミノ酸配列を多様化して、ライブラリーを構築する。ライブラリーは遺伝子(DNA)のレベルで作製し、ファージなどの表面にライブラリー蛋白質を提示させて、*in vitro*でスクリーニングすることにより、ある特定の抗原に結合する人工蛋白質の集団を濃縮することができる。アミノ酸配列はそれをコードするDNAの配列から知ることができる上に、DNAの増幅によって、濃縮された蛋白質分子種も増幅できる。ライブラリー構築と選別、その増幅を繰り返すことにより、特定の分子に特異的に結合する人工蛋白質を作製することができるのである。このような、アミノ酸配列の多様化、選別および増幅をくり返すことにより、新しい機能を付与した蛋白質を作製する方法を、進化分子工学(directed evolution)と呼んでいる。

4. Monobody: FN3ドメインをスキャフォールドとする抗体を代替する蛋白質

これまでに複数の研究室から様々な蛋白質のフォールドからなる人工蛋白質スキャフォールドが報告されてきたが³⁾、Koide研究室においては、第10番目のヒトフィブロネクチンIII型ドメイン(FN3)を蛋白質スキャフォールドとする“monobody”の開発に成功した⁴⁾。FN3ドメインは、約100アミノ酸残基からなるβ-サンドイッチフォールドの安定な構造で、合計3本のアミノ酸配列を多様化することができる(図2、ちなみに有名なRGD配列はFGループに存在する)。

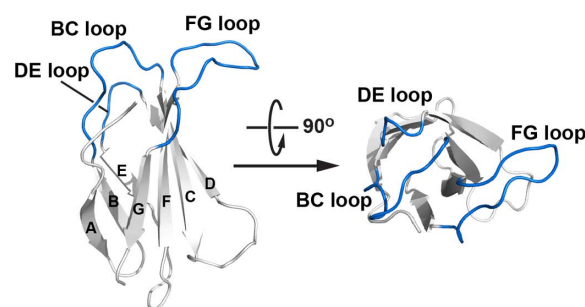


図2 FN3ドメインの結晶構造(PDB ID: 1FNF)。Monobodyライブラリーにおいて、アミノ酸配列を多様化する3本のループを青色で示した。

実際、進化分子工学の手法により、これまでに様々な蛋白質に解離定数で数十 nM 以下という高い親和性で、なおかつ特異的に結合する **monobody** が作製されてきた⁵⁾。

中でも Wojcik らは、**monobody** のファージディスプレイライブラリーの選別によって、**Abl kinase** の SH2 ドメインに、7 nM という高い親和性で結合する **monobody**, HA4 を作製することに成功した⁶⁾。**Abl** の SH2 ドメインと HA4 の共結晶構造から、HA4 は **Abl** のキナーゼ活性を阻害するものと予想されたが、実際に HA4 を白血病細胞株 K562 で発現させることにより、**Abl** のキナーゼ活性は抑制され、それにとともに下流のシグナリング分子 **STAT5** の活性化も抑制された⁶⁾。この成果は、**monobody** の利用による特定の蛋白質相互作用ドメインとペプチド配列モチーフ間の相互作用が発現する細胞機能の解明に、道筋をつけたことになる。

5. Affinity clamp

蛋白質相互作用ドメインに結合する人工蛋白質の作製とその利用に成功したら、次の関心事は、蛋白質相互作用ドメインの相手方、すなわちペプチド配列モチーフに特異的に結合する人工蛋白質の作製である。この目的の場合にも、進化分子工学を適用できる。単純には、上述の人工蛋白質スキフォールドの利用や、蛋白質相互作用ドメインを出発材料として、そのドメイン中のペプチド配列モチーフ結合部位の周辺に変異を導入したライブラリーを構築することを真っ先に考える (図 2A, 上)。しかしながら、①単独の蛋白質ドメインとペプチドの結合インターフェイスは小さいことと、②ペプチドが蛋白質に結合する際には大きなエントロピーロスをともなうこと、から単独の蛋白質ドメインを用いたのでは、ある特定のペプチド配列モチーフに高い親和性で特異的に結合する人工蛋白質を作製することは極めて困難である。

この問題を克服する技術として、Huang らは“**affinity clamp**”を開発した⁷⁾。**Affinity clamp** は、リンカーで連結されたペプチドモチーフを認識する相互作用ドメインと先に述べた **FN3** ドメイン (**monobody**) とから構成される (図 3A, 下)。二つの蛋白質ドメインを連結することで、より大きなペプチド配列モチーフ結合インターフェイスがドメイン間に新たに生じ、ペプチド配列モチーフに対する親和性と特異性が、蛋白質相互作用ドメインに比べて飛躍的に向上することが期待

される。実際に、Huang らは、**PDZ** ドメインと **FN3** ドメインを連結した。そして、① **FN3** ドメインの 3 本のループのアミノ酸配列を多様化したライブラリーを構築し、②ファージディスプレイ法によりライブラリーを選別してドメイン境界のペプチド結合インターフェイスの最適化を行い、**PDZ** ドメインの認識するペプチド配列モチーフに高い親和性と特異性で結合する **affinity clamp** の作製に成功した⁷⁾。結晶構造を見れば、**affinity clamp** の高い親和性と特異性は、設計通り、「リンカーを蝶つがいに **PDZ** ドメインと **FN3** ドメインがペプチドを二枚貝の様に挟み込む」という特徴的なペプチド認識モードに起因することが一目瞭然である (図 3B)。また、**affinity clamp** の N 末と C 末に蛍光共鳴エネルギー転移用の蛍光タンパク質 **CyPet** および **YPet** をそれぞれ連結させることによって、細胞内のペプチド配列モチーフ濃度を定量可能なセンサー蛋白質を作製できることも示した⁸⁾。

この **affinity clamp** 技術は、**PDZ** ドメインの例に留まらず、他の蛋白質相互作用ドメインとペプチド配列モチーフのペアにも応用可能であることを強調しておきたい。実際、筆者は細胞内アダプター蛋白質 **Grb2** の SH2 ドメインが認識する、リン酸化チロシン残基を含む配列モチーフに高い親和性と特異性で結合する **affinity clamp** の取得に成功している。今のところ、**affinity clamp** を利用して、特定の蛋白質相互作用ドメインとペプチド配列モチーフ間相互作用の細胞内での役割を解明するまでには至っていないが、近い将来にそれが達成されるものと期待される。

6. おわりに

以上のように、人工蛋白質の作製とその利用は、大規模な蛋白質間相互作用解析でも遺伝学的アプローチでも達成できない、特定の蛋白質間相互作用の機能的意義の解明に貢献できることを述べた。我々は、人工蛋白質の活用により、「知識」を得た先には、特定の蛋白質間相互作用の調節を通して細胞機能を「制御」することも視野に入れている。人工蛋白質ツールが、遺伝学的手法の様に汎用されることを望むが、ほとんどの研究と同じく、人工蛋白質の作製にも、多大な時間と努力を注がなければならない。有用な人工蛋白質の作製はまだまだ難しく、とりあえず一つ一つ作製することで精一杯というのが現状である。それでも、ゲノムがコードする全蛋白質に結合する人工蛋白質を網羅的に取得しようという壮大な計画ははじまっており⁹⁾、遺伝学的アプローチを補完する形で、人工結合蛋白質が、蛋白質間相互作用とそれによる細胞機能制御メカニズムの解明に、広く使われるようになると確信している。

最後に、寄稿の機会を与えていただきました、早稲田大学の小出隆規先生に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Pawson T, Nash P. (2003) *Science* **300**, 445-452.
- 2) Jones RB, Gordus A, Krall JA, MacBeath G. (2006) *Nature*. **439** 168-174.
- 3) Koide S. (2009) Design and engineering of synthetic recognition interfaces using non-antibody scaffolds. in

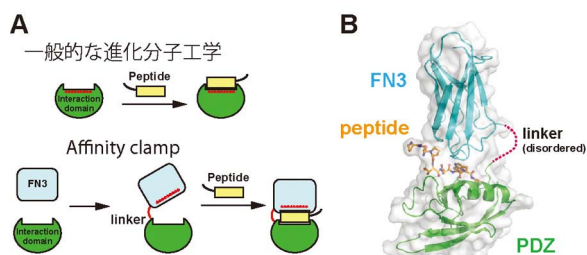


図 3 (A) **Affinity clamp** の概念とその設計。(B) **Affinity clamp** とその標的ペプチド複合体の結晶構造 (PDB ID: 2QBW)。

Protein Engineering and Design (Ed. Cochran J & Park S).
Taylor & Francis.

- 4) Koide A, Bailey CW, Huang X, Koide S. (1998) *J. Mol. Biol.* **284**, 1141-1151.
- 5) Gilbreth RN, Truong K, Madu I, Koide A, Wojcik JB, Li NS, Piccirilli JA, Chen Y, Koide S. (2011) *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**, 7751-7756.
- 6) Wojcik J, Hantschel O, Grebien F, Kaupe I, Bennett KL, Barking J, Jones RB, Koide A, Superti-Furga G, Koide S. (2010) *Nature Struct Mol Biol* **17**, 519-527.
- 7) Huang J, Koide A, Makabe K, Koide S. (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 6578-6583.
- 8) Huang J, Koide S. (2010) *ACS Chemical Biology* **5**, 273-277.
- 9) Colwill K; Renewable Protein Binder Working Group, Gräslund S. (2011) *Nat Methods*. **15**, 551-558.

やすい のりひさ
シカゴ大学生化学分子生物学科
nyasui@uchicago.edu

PAGE で Affinity 精製

はじめに

天然物を研究対象にしている人は、精製で苦労した経験がある人も多いのではないのでしょうか？そんな時、特定の構造が示す性質（親和性）を利用する Affinity 精製法は格段に精製ステップを減らすのに役立ちます。私自身は、昆虫の体液から酵素蛋白質を精製する際に、基質類似物質を用いた Affinity 精製による劇的な比活性増加をみて、これが非常に強力な精製の武器となることを肌で感じました。



栗田 ちひろ

しかし、一方で Affinity 精製は、特異性を上げるための担体の選択、アフィニティーリガンドの選択、溶媒の組成、溶出溶液の組成など非常に繊細な条件が必要で、それらの最適化に費やす労力と時間は莫大なものになります。そして、たとえ標品でこの条件をクリアしても、生体試料中の微量成分の精製となると、他の大量成分によるリガンド・目的蛋白質間の相互作用の妨害や担体への非特異的な吸着に悩ましい思いをした人も多いのではないのでしょうか？さらに、リガンドに対して類似の親和性を示す複数の物質などが拮抗してリガンドと反応する場合、互いにリガンドとの結合を邪魔しあい微量成分は精製出来ないということも考えられます。従って、事前の分画操作は Affinity 精製成功のための一つのポイントになります。

私たちは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 法が蛋白質の分離に優れ、多次元展開が容易であることに着目し、「生体試料の分画」と「アフィニティー精製」を一連の PAGE 操作で行う方法「アフィニティートラップポリアクリルアミドゲル電気泳動 (AT-PAGE) 法」を考案しました。

今回は、この AT-PAGE 法について紹介させていた

だきたいと思います。

アフィニティートラップポリアクリルアミドゲル電気泳動 (AT-PAGE) 法

本方法は、質量分析の前処理のための微量タンパク質の精製方法として開発しました。AT-PAGE は以下のような流れで行います。

- 1) リガンドをポリアクリルアミドゲルに固定化する (→リガンド固定化ゲル: Li-PAG)
- 2) 生体から得られた蛋白質試料を通常の PAGE を利用して分離する (→サンプルゲルとする)
- 3) サンプルゲル中の蛋白質成分を 1) で調製したリガンド固定化ゲルに電気的に一斉に転写する (このとき、リガンドに親和性を示さない蛋白質は素通りさせる)
- 4) リガンドと特異的に相互作用し、リガンドゲルに捕捉 (トラップ) された蛋白質群を一挙に検出する (リガンドが蛋白質の場合は、メンブレンへブロッティングの後、検出する)
- 5) 検出した蛋白質を質量分析により解析する

一例として、トリプシンをリガンドとしてゲル内へ固定化し、トリプシンに対して高い親和性を示す大豆トリプシンインヒビターを標的蛋白質として AT-PAGE で特異的に検出および単離精製することを試みました。

ポリアクリルアミドゲルへの蛋白質の固定化

トリプシンの固定化は、ポリアクリルアミドゲルの調製に用いる架橋剤である N,N'-Methylenebisacrylamide (BIS) に着目し、SH 基含有化合物のマイケル付加反応を利用して行いました。具体的には図 1 の 1) に示すように、蛋白質の表面のアミノ基に 2 価性リンカー (N-succinimidyl-3-(2'-pyridyldithio)propionate) を用いて遊離の SH 基を導入し、SH 基を直接 BIS と反応させることによりトリプシン-BIS 付加体を作成し、その後に、モノアクリルアミド/BIS とのラジカル共重合によりトリプシンをゲル中に固定化しました。このとき、トリプシンへの SH 基の導入やアクリルアミド共重合などに用いる弱アルカリ緩衝液条件下ではトリプシンの自己消化が一部起こってしまいます。そこで、この自己消化を防ぐために、低分子ペプチド性の可逆的な拮抗阻害物質である Leupeptin 存在下で一連の固定化操作を行っています。そして最後に、未固定化トリプシンおよび Leupeptin を界面活性剤存在下で電気泳動的に除去しています。

蛋白質固定化の評価

固定化率はどれくらいか？酵素活性はあるのか？蛋白質成分は結合できるのか？

固定化トリプシンゲルを評価するために、ゲル中の蛋白質定量とトリプシン活性測定を行いました。その結果、固定化率は 98.7 % であり、酵素活性 (比活性) は 95 % 以上の高い収率で効率よく固定化することができました。

しかし、トリプシンの固定化は共有結合によって行うことから、架橋試薬の導入に伴う蛋白質の高次構造変化や電荷状態の変化、また共有結合している

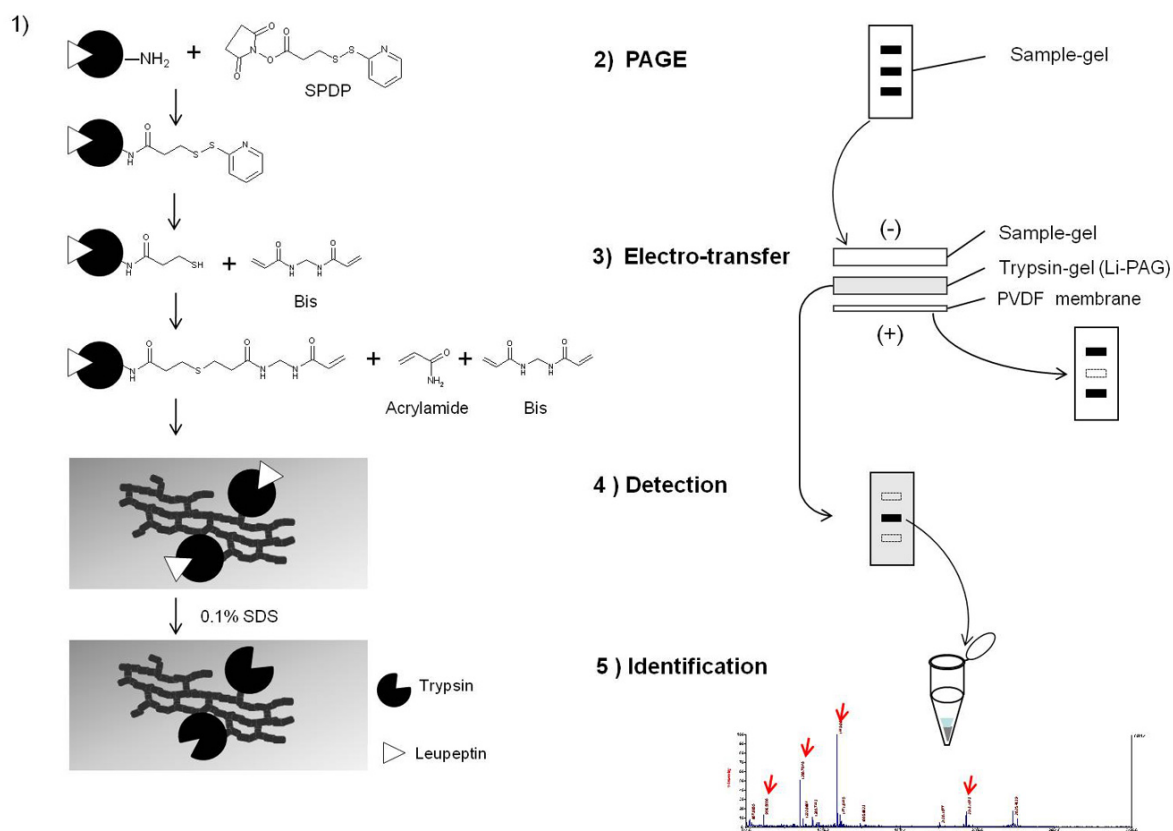


図1 アフィニティートラップポリアクリルアミドゲル電気泳動 (AT-PAGE) 法の概要

ことによる立体障害など様々な理由により高分子である標的蛋白質とリガンドとの親和性低下が懸念されます。よって、ゲル内に固定化したトリプシンの捕捉能力と特異性を確認する必要がありました。そこで、トリプシンに親和性を示す蛋白質の例として、トリプシン阻害蛋白質として性質のよく知られている大豆由来 Kunitz 型トリプシンインヒビター (SKTI: 20.1kDa) を用いて、ゲル内での相互作用が可能かどうかを調べることにしました。SKTI はトリプシンに対し高い親和性を持ち、トリプシンとモル比 1 : 1 で結合することが知られています。SKTI を SDS-PAGE に供し、トリプシン固定化ゲルとコントロールとして (トリプシンインヒビターに対する親和性がない) RNase を固定化したゲルそれぞれに対して同時に転写し、リガンドゲルの透過量を比較しました。その結果、RNase ゲルでは全く捕捉されずに通過した SKTI を、トリプシン固定化ゲルでは定量的 (固定化トリプシンのモル数 : トラップできる SKTI のモル数 = 1 : 1) に捕捉できることを確認しました。

Affinity 精製できるか？

では、生体試料などの複雑な蛋白質混合物から本 AT-PAGE 法を用いて蛋白質の単離精製が可能かどうか？確認するために、同じトリプシンインヒビターを実際的大豆抽出物から精製した例を示します。

試料として大豆粉末より得られた粗抽出画分 (約 100ug) を用いました。これを SDS-PAGE で分離し、この分離ゲルをサンプルゲルとしました。このサンプルゲルとトリプシン固定化ゲル、PVDF メンブレンを

図 2 の B のように重ねサンプルゲル中の蛋白質を電気的に転写することでトリプシンゲルに親和性蛋白質をトラップしました。

このときの、図 2 の A と B 中のゲルおよび PVDF メンブレンを CBB 染色し蛋白質を検出すると、転写前のサンプルゲル (A) 中の蛋白質成分がサンプルゲル (a) から抜けトリプシン固定化ゲル (b-1) を通過し、その先の PVDF メンブレン (c) へ移動していく様子が確認できました。

その過程で、トリプシン固定化ゲルに着目すると、矢印で示す 1 本のバンド (後に SKTI と同定される) のみとそのゲル上で検出されました (b-1)。さらに、トリプシン固定化ゲルはトリプシン活性染色に供することで阻害活性 (トリプシン活性が抑制された透明なバンド) が検出でき (b-2)、この結果からも矢印のバンドが特異的な相互作用によってトラップされていることを確認することができました。また、トラップされた SKTI はバンドの面積から約 32.8pmol (0.7ug 相当) と概算することができ、これは元の試料中の SKTI の 1/9 に相当します。

この b-1 でトラップした蛋白質成分は、界面活性剤を含む緩衝液でその次の PVDF メンブレンへブロットティングでき (C)、酵素消化→質量分析によって SKTI と同定することが可能でした。

おわりに

本稿では、私たちが開発した PAGE を用いた Affinity 精製方法”アフィニティートラップポリアクリルアミドゲル電気泳動法”について紹介しました。

A) PAGE

B) Electro-transfer

C) Detection

D) Identification

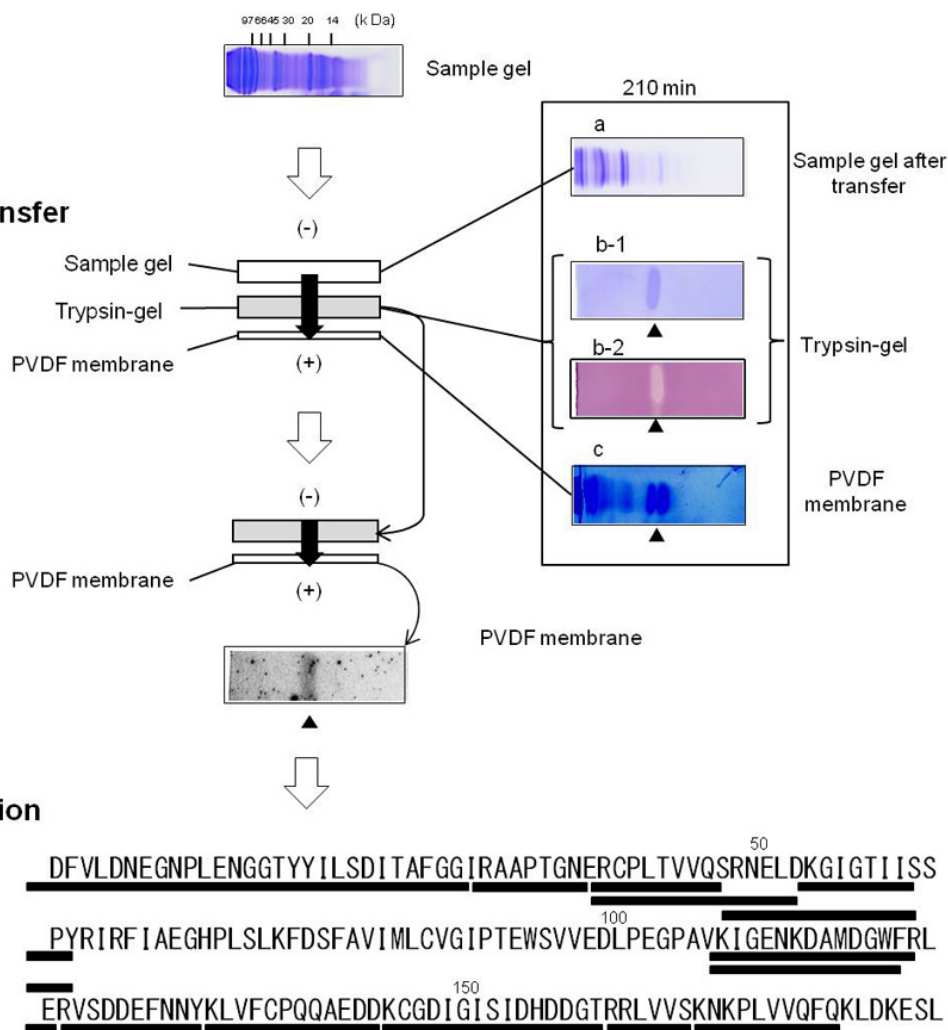


図2 大豆粗抽出溶液からSKTIの精製。粗抽出溶液のSDS-PAGE (A)；Aで得られたサンプルゲルのアフィニティトラップポリアクリルアミドゲル電気泳動 (B)；トリプシゲルにトラップした蛋白質 (b-1) のPVDFメンブレンへのエレクトロブロッティング (C)；SKTIのアミノ酸配列とMALDI-TOF MS/MSで同定されたペプチド (下線で示す) (D)；ゲル (A, a, b-1), PVDF membranes (c) はCBB染色；トリプシゲル (b-2) はトリプシン酵素活性染色；PVDF membrane (C) はSYPRO Ruby protein blotによる染色。矢印はSKTIと同定されたバンドを示す。

さて、このPAGEでのAffinity精製法は、もとは佐賀大学農学部修士課程においてイェバエ体液中から見出したフェノールオキシダーゼ阻害蛋白質の検出方法として開発したものから発展した方法です。いわば、冒頭に述べたような精製の問題点を解決するための必要に迫られて開発した方法で、ハエと過ごした学生時代の苦労話共々ご紹介したいところですが、字数の制限もあり今回泣く泣く省くことにしました。これについては、いつかどこかで紹介させて頂きたいと思っています。

現在は、この方法を翻訳後修飾解析、特にリン酸化蛋白質の網羅的解析に応用したいと考えています。そのため、リガンドにリン酸基を特異的に捕捉する低分子化合物を用い、リン酸化蛋白質の特異的精製および検出、またこれを利用したリン酸化ペプチドの選択的回収法を開発を行っているところです。そして、この方法を利用して、例えば細胞刺激によって変化する新たなリン酸化蛋白質の検出およびそのリン酸化部位の

決定に応用できればと思っています。さらに、将来的には診断マーカー候補の検出方法の一つとしてバイオマーカー探索にも応用展開したいと考えています。

最後になりますが、今回このような寄稿の機会を与えて頂きました小出隆規先生には深く感謝しています。また、この研究においてご指導いただきました大阪大学蛋白質研究所 高尾敏文先生、佐賀大学農学研究科 佐藤孝先生 (現 Agilent) にこの場をお借りして心より感謝を申し上げます。

【参考文献】

- 1) Awada, C.; Sato, T.; Takao, T. *Anal. Chem.* **82**(2) 755-761 (2010)

あわだ ちひろ
大阪大学蛋白質研究所
機能・発現プロテオミクス研究系
awawa@protein.osaka-u.ac.jp

高校の教育現場に立って思うこと

私は今、高校で理科教育に携わっています。2年前まで、新潟薬科大学 北川研究室で博士研究員として仕事をしていました。早稲田大学先進理工学部 小出隆規先生との共同研究で、コラーゲンとコラーゲン結合タンパク質の結合認識配列を同定するべく、スクリーニングシステムを構築しました (Okano-Kosugi, H., Matsushita, O., Asada, S., Herr, A. B., Kitagawa, K., and Koide, T. (2009) *Anal. Biochem.* 394, 125-131)。私は、元々理学部生物学科の出身ですので、長く分子生物学が専門でしたが、薬科大学での研究で、有機化学やペプチド科学の知識を習得しました。ケミストリーの知識を得たことで、バイオロジー中心の知識から幅が広がり、色々な角度から物事を見られるようになりました。その後、縁あって、高校の教育職に就くことになりました。今回、小出先生から執筆の機会をいただきましたので、研究者当時感じていた高校教育、あるいは高校生に対する妄想? と、実際現場に出て感じている事について書きたいと思います。



小杉 日登美

基準は自分の高校時代

高校を卒業して20年近くになります。卒業後は大学に進学し、大学院に進学し、その後も研究の道を歩んできた私にとって、高校生と接する機会はほとんどありませんでした。それゆえ、現代の高校生は全く未知な存在で、想像の基準・比較の基準は、高校生の頃の自分でした。

私はどんな高校生だったかといえますと、大学進学が約9割(当時)の普通科進学校に通い、運動部に所属し、3年生の6月まで活動していました。勉強と部活の両立は当たり前、もちろんアルバイトは禁止(こっそりやっていた生徒は少数名いましたが)、それが「普通」だと思っていました。友人関係の悩みもありましたし、ボーイフレンドの悩みもありましたが、そのような悩みを学校の先生に相談したか、保健室に駆け込んだか、と問われれば、否です。それから、親との関係を振り返りますと、相談すべきことは相談しましたが、意見がぶつかり喧嘩になることもありましたが、「親と子」の関係は出来ていたと思います。自分の親が学校に来たのは、個人懇談くらいでしょうか。体育祭や文化祭等の学校行事も、保護者が観覧に来たという記憶はほとんどありません。今は、勉強に力を入れている進学校ほど、大勢の保護者が観覧に来るようです。親が過干渉、それを子供も嫌がらない、という現実にとっても違和感を覚えました。生徒の決断力の無さ、行動力の無さは、こういうところに原因があるのか、と納得しました。

いまどきの高校生、そして大学生

2年前の4月、全日制普通科の県立K高校に赴任し、理科(生物)を教えることになりました。ここでの一年間は、様々な意味で新鮮で、驚きの毎日で、私

にとってかけがえのないものとなりました。普通科なのに3割程度の生徒しか進学せず、残りは就職!(この就職難の時代に)進学先といえども、ほとんどが専門学校。いわゆる「大学」に進学する生徒は十数名。この高校では、教科を教える以前に、教わる「態度」から指導しなければならず、どんな日常であったかのご想像のとおりです。そしてこの4月から、現在の高校に勤務しています。この高校も全日制普通科ですが、卒業後の進路は3割程度の生徒が就職(公務員を含む)で、残りは進学です。ここでも圧倒的に専門学校への進学が多いですが、前任校と比べると、授業を受ける態度にクレームをつけることはあまりなく、教科を教えることは出来ています。2校の生徒たち、また、部活指導を通じて関わった他校の生徒たちと接して感じたことは、「彼/彼女らは、社会に出て生きていけるのか!？」ということです。

高校生ともなれば、先生や目上の人に対して正しい言葉遣い(敬語でなくとも)で会話ができるのは当然で、自分の意見は自分の言葉で伝えられるのは然るべきだと思います。と、ここでふと思い出したのは、大学で研究をしていた頃、指導していた大学生に同じことを感じたな、ということです。高校生でこれらの事を身に付けていなければ、大学生ができないのは当たり前です。もちろん、全ての高校生や大学生に当てはまるわけではありません。きちんとしている生徒や学生はたくさんいます。さらに、もうひとつ感じていることは、生活態度や礼儀がきちんとできている子は、女子に多いということです。しかも圧倒的に。

今、学校は夏休みに入りますが、教員はとても忙しいです。補習はもちろん、多様化した大学入試に対応するために、面接指導や小論文指導があります。私もそれらの指導にあたっているのですが、志願理由(大学、もしくは学部学科)が言えない、志望動機が言えない、そして自己アピールができないのです。ここでも感じたのは、同じことが就職活動をしている大学生にも当てはまる、ということです。なぜこうなってしまったのでしょうか。高校生も大学生も「とりあえず」思考で、将来を見据えていないからです。どこかの政治家のように。いえ、逆ですね。高校生が「とりあえず」大学に入り、その大学生が「とりあえず」就職する。「とりあえず」政治家になった人もいれば、政治家になりたくてなった後、「とりあえず」この政策で行こう。そんな目先の利益で国民をごまかしているわけですから国が良くなるはずがありません。

今、高校理科で何を教えるのか?

指導要綱の改正によって、高等学校「理科」の科目編成はずいぶん変わってきました。内容は言うまでもありません。最新の科学情報が本当にたくさん詰まっているのです。例えば、タンパク質はアミノ酸がたくさんつながったポリペプチドから出来ていますが、私が教わった当時の教科書ではたった2ページの内容でした。今はどうかと言いますと、5ページに膨れ上がり、フォールディングのことまで触れています。日進月歩の科学ですので、情報量が増えていくのは当然です。それなのに、高校生が理科を勉強する時間は、理数科などを除き、減らされるばかりです。代わりに、

いわゆる「三教科」を勉強する時間が増えているのです（同じ理系科目でも、数学と理科のこの違いは何なのでしょう）。内容量が増えているのにもかかわらず、学ぶ時間が減れば、内容は広く浅くなるのは明らかです。先のタンパク質の話に戻りますが、私は研究員時代、ペプチド科学を専門としていましたので、自分の研究内容を少しでも伝えたいと思い教材研究に力を入れていますが、なかなか難しいです。

私が大学で学んだことはほとんど、さらには、研究者になってから得た技術や知識などが、今は高等学校の生物の教科書に載っています。高校生ながら、最先端の科学の知識を得ることができて羨ましく思う反面、内容をきちんと理解できているのだろうかとか疑問に思います。なぜなら、それを教えるのは「高校」の先生だからです。私が昔「大学」の先生から学んだ内容を、今の高校生は「高校」の先生から学んでいるのです。教える側には専門知識が深まるようなサポートを、教えられる側には理解が深まるようなサポートが必要だと思います。

高校理科教育に向けて

2011年4月の高校進学率は、98.2%になりました（文部科学省「平成23年度学校基本調査」より）。これは、勉強に対するモチベーションの低い子どもたちも、「義務教育ではない」高校へ進学することを意味します。大学進学に関しても同様のことが言えるでしょう。大学全入時代と言われ、何かを学びたいから大学へ行くのではなく、とりあえず大学に行ってから何を学びたいかを考える高校生が多くなりました。

このような社会事情を背景に、「大学の講義や研究の面白さを体験することで、高校での学習意欲の向上につなげる」「大学の学習内容を理解することで、進路選択に役立てる」ことを目的に、高大連携の取り組みが始まりました。オープンキャンパスや施設見学、模擬授業体験、出張講義といったプログラムが多く行われています。特にサイエンス分野では、国が支援する科学教育事業にSPPやSSHがあります。かなり浸透してきているプロジェクトですのでご存じだと思います。大学研究者と生徒たちが直接接することができ、コミュニケーションを持つことができます。これらのプログラムは、生徒が科学を身近に感じることができる良い機会でもあり、大いに利用すべきだと思います。

一方、教える側の教員についてはどうでしょうか。研修や研究の目的で、少なくとも年に1回以上、大学や研究機関などの専門家と会合することがある理科教員は、普通科で約3割、理数科で約5割、SSHで約7割と、取り組みの程度に大きな差があります（科学技術振興機構（JST）「平成20年度高等学校理科教員実態調査」より）。このことは、高等学校の7割を占める普通科高校に所属する理科教員にとって、自分の専門分野の知識を深める機会が十分にあるとはいえないです。そして機会だけでなく、上述したように、時間ありません。私は、高校の理科教員を増員すべきだと思っています。「生徒数減だから教員数減」それは数だけの話です。時間が無いのは人手不足だからです。理科には授業以外に実習があります。実習は生徒の質（基礎学力、理解力、行動力）によって、内容も準備

や実習そのものにかかる時間も変わってきます。多教科に比べ、教材研究に多くの時間を必要とします。一人の人間に与えられた時間は限られていますので、是非、人員を増やして欲しいと願っております。

将来、優れた科学者や技術者を育成するためにも、高等学校の理科教育はとても重要です。大学の先生方には、ぜひ、高校教員や高校生と積極的に関わって頂き、研究の魅力を伝えて頂けたらと思います。また、教員以外の大人と関わることで、生徒たちは新たな刺激を受けるだろうと思いますし、小さな社会経験にもなると思います。社会に出て生きていく術、ヒントなども、たくさん伝えてほしいと思います。そして、大学院で研究した後、研究者を目指すだけでなく、高校の理科教育にも貢献できるのだということを知っていただき、多くの方々にこの教育現場でも活躍して頂きたいと思っています。

2年前、初めて高校教育の現場に立った時、「高校生ってこんなに幼いの!？」というショックともいえる印象から、今もさほど変わっていません。ですが、学力の違いはあるにせよ、これが現代っ子なのだと割り切ってしまうと、なかなかやりがいのある仕事です。自分の指導は、生徒たちを通して全て自分に返ってきますので、責任の重さと同時に不甲斐無さも感じます。ですが、生徒たちの成長過程を間近で観られる、というのは教員の醍醐味だなと実感しているところです。

こすぎ ひとみ
新潟市立高志高等学校
hitomimi01@yahoo.co.jp

22nd American Peptide Symposium の参加報告



東 佑翼



広瀬 久昭

22nd American Peptide Symposium (22nd APS) が、去る2011年6月25～30日、アメリカ・サンディエゴにあるSheratonホテルにて開催されました。本シンポジウムのchairは、Scripps Research InstituteのPhilip Dawson先生とNational Cancer Instituteの



増田 朱美

Joel Schneider先生が務められました。シンポジウム開催地のサンディエゴはアメリカ・カリフォルニア州に属し、アメリカ最南西端に位置する街です。西は大西洋、南はメキシコに面する人口約122万人のアメリカ西海岸有数の世界都市です。サンディエゴは1年中温暖で湿度が低く気候に恵まれています。会期中も朝

晩は肌寒く感じましたが昼間は晴天で過ごしやすかったです。

シンポジウムは世界各国から参加者が集い、口頭発表・ポスター発表が行われました。口頭発表のセッショントピックスは、1) Peptide and Protein in Imaging, 2) Peptide Materials Science, 3) Post Translational Modification, 4) Peptide Discovery, 5) Peptide Therapeutics, 6) Peptides in Cancer, 7) Bioconjugation, 8) Peptide Mimetics, 9) Synthetic Methods, 10) Peptides in Action, 11) Peptide Natural Products, 12) Insights into Folding, 13) Interactions at Membranes の13テーマに分かれておりディスカッションも挟みながら盛況に発表が行われました。

以下はAPSを振り返って3人がそれぞれの感想を述べたものです。

京都大学化学研究所 生体機能化学研究系 生体機能設計化学領域 (二木研究室) 東 佑翼

カリフォルニアの温暖でドライな気候と海や山など自然豊富な土地柄は、世界中から愛される理由を感じさせるものでした。こんなところに住んでみたいなど、自分の今後の行き先にも影響を与える出張であったと振り返ります。

アメリカのみならず、世界中から著名なスピーカーが集まるAPSには、予てより行ってみたいというあこがれがありました。また、西海岸には、知り合いのポスドクの方が何人かいらっしゃるの、機会があれば訪ねたいと考えていました。今回このようなチャンスが頂けたことは、本当にうれしく思います。

私は、金属イオンを用いたペプチドの二次構造制御の研究を行っているのですが、類似研究を行う海外の研究者や全く別の視点を持つ方々と議論を交わすことができました。また、同世代の研究者が、数年間でとてもたくさんの仕事をしているのを見て、自分も負けてはいられないという刺激を受けました。あわよくば、海外のPIの先生にポスドクの可能性も打診したかったのですが、残念ながら議論を交わしたのは、ほとんど学生かポスドクの方でした。しかしながら、同世代の研究者と交流を持つことができたことは、私にとって非常に大きな財産になったのではと感じております。

初めて海外の学会に参加したときは、わからないことだらけで、ほとんど周囲とコミュニケーションをとることができなかったのですが、今回は3回目ということもあり、以前に学会であった人たちや初めて会う人たちと、より打ち解けることができました。余談ではありますが、懇親会の後連れて行かれたバーでテキーラをグラスで2回一気飲みさせられたときは、死ぬかと思いました。一方で、一緒に行ったアメリカ人とドイツ人は平気な顔をしていて、お酒も訓練しないと、と少し思う今日このごろです。

サンディエゴは、地ビールで有名らしく、各店がオリジナルのビールをつくっているそうです。一度ビールの種類が豊富なレストランに連れて行っていただいたのですが、パスポートをコピーしか持ち合わせておらず、ビールが飲めなかったことが今回の唯一の心残りでしょうか。免許証を見せて、昭和59年は1984年

であることを訴えましたが、和暦ではダメだと言われてしまいました。これを読まれた方は、パスポートの原本を持って食事に行くことをおすすめします。

本記事では、書ききれないほど非常に充実した1週間でした。この渡航を期に、海外で研究をやってみたいという気持ちはますます強くなりました。これまでに参加した学会の中でも、今後の私の研究活動に大きく影響した学会だったのではないのでしょうか。

京都大学化学研究所 生体機能化学研究系 生体機能設計化学領域 (二木研究室) 広瀬 久昭

蛍光顕微鏡、蛍光小分子化合物や蛍光タンパク質も使いつつ膜透過ペプチドの移行様式に関する研究を行っている私にとって、憧れの研究者の一人であるRoger Tsien博士がOpening Lectureを行うということで楽しみにしながらサンディエゴへと足を運びました。しかも蛍光Ca²⁺指示薬開発や2008年ノーベル化学賞のGFPに関する研究で有名なTsien博士は最近、膜透過ペプチドを用いたin vivoイメージングも行っているので自分自身の研究との関連もあるため非常に楽しみにしていました。

しかし、開始時刻になっても主催者からの開会挨拶もはじまらず、会場はざわざわとしていました。日本の学会とは違って適当だなーと思いながら待っていると、ようやく主催者からの挨拶がはじまり、いよいよRoger Tsien博士の登場と思いきやTsien博士は会場には現れなかったのです。そこで急遽別の方に講演を依頼していたということでした。

いきなり出鼻をくじかれ愕然とした感じで(私だけでしょうか?) 始まったAPSでしたが、ポスター発表も含めバラエティに富み、質の高い研究内容ばかりで非常に刺激を受けました。2010年12月に京都で開催された5th IPSにおいてはスタッフの仕事があり聴きたかった講演はあまり聴けなかったのが心残りでしたが、今回のAPSでは興味のある講演やポスターをまわることができ、有意義な質疑応答もできたと思います。また、5th IPSで知り合った外国のポスドク、学生とも再会する舞台となったAPSではさらに輪が広がり楽しめました。

また、せっかくアメリカ西海岸まで行くということで、アメリカ西海岸でポスドクとして研究し活躍されている知り合いの方たちを訪問し、アメリカでの生活や日本との違い等々、いろんなお話を聞けてこれも楽しい思い出になりました。皆さん共通していたのがサンディエゴの環境は本当に最高ということで、私自身も個人的に過去に二度訪れていますが、寒いのが苦手な私にとってはまさに憧れの地となっています。

学会も積極的に参加でき、海外で活躍する日本人研究者とお話することで、自分の将来についても改めて考える機会となり、今回の出張は本当に充実したものとなりました。

ただ、講演会場となったホテルの冷房の温度設定が17-18℃と、日本では考えられない冷房の寒さにやられ最終日前日に思い切り風邪をひきました。その状態で飛行機に乗ると航空性中耳炎なるものになりやすらしく、帰国後一週間くらい左耳が聞こえない状態

だったのは内緒です。

東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
メディシナルケミストリー分野
(玉村研究室) 増田 朱美

私は今回初めて海外で行われる国際学会に参加しました。本学会では私の所属する玉村研での主要な研究テーマのひとつであるペプチド関連の学会でしたのでとても楽しみにしていました。私の研究テーマはジンクフィンガーを用いた人工酵素を作製し、その反応効率の最適化を行うことなので、講演や口頭発表はスライドを追うのが精いっぱいでしたが、私でも知っているような有名な先生が発表なさっていたので感動しました。私自身のポスター発表は上手くアピールできなかったのが残念でしたが、ポスター会場では思い切って数人の学生に話しかけてディスカッションをしました。ポスターは自分のペースで見ることができるので勉強になりました。3日目の夜には Student Mixer があり、各国の学生、ポスドクが集まって話せる場が設けられました。学生やポスドクの方達と研究のことや将来のこと、プライベートな話まで色々話すことができて新鮮でした。今回の学会での私の一番の驚きは Banquet でのダンスです。日本の学会では見ない光景だったので楽しく拝見しました。

学会以外にも Scripps 研究所の見学をさせて頂き、研究所の日本人のポスドクの方にラボの案内や研究など、日常生活について詳しくお話しを伺う機会を先生方が作ってくださいました。話をお伺いして、サンディエゴの気候の素晴らしさと住みやすさ、モチベーショ

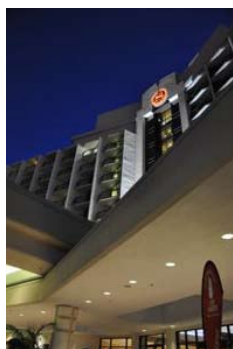
ンの高い仲間がいることを考えると研究生生活をするには素晴らしい環境であるということが分かりました。玉村先生が学会中に腰を痛めたこともあり、Scripps 研究所を2回も見学することができました。しかし、ジンクフィンガーを研究されている Barbas 先生にお会いできなかったことは心残りです。

その他観光・ショッピングなども十分楽しむことができ、サンディエゴを満喫することができました。毎晩先生方や他の研究室の学生の皆さんと楽しく飲めたこともとても良い思い出です。

海外の学会に参加される学生の方は合わせて大学や研究所のラボ見学をされることを強くお勧めします。将来の参考になることは間違いありません。

末筆ではございますが、今回の 22nd APS への参加をご支援して頂きました日本ペプチド学会の学会役員及び選考委員会の先生方に、この場をお借りして深く感謝申し上げます。

あずま ゆうすけ
京都大学化学研究所
yusuke.a@hx4.ecs.kyoto-u.ac.jp
ひろせ ひさあき
京都大学化学研究所
hisaaki.hirose@f03.mbox.media.kyoto-u.ac.jp
ますだ あけみ
東京医科歯科大学生体材料工学研究所
masuda.bio@tmd.ac.jp



会場となった Sheraton ホテル



サンディエゴのダウンタウンを望む



Opening Reception の様子





Student Mixer にて



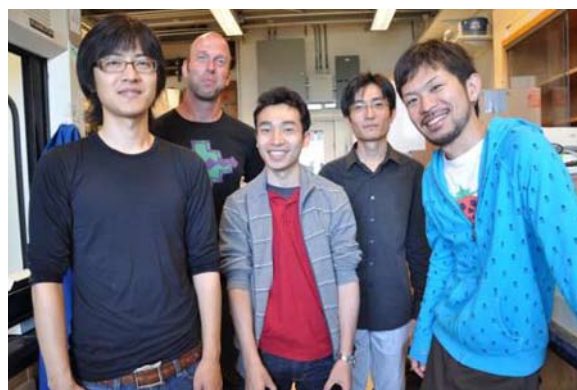
皆で中華料理も食べました



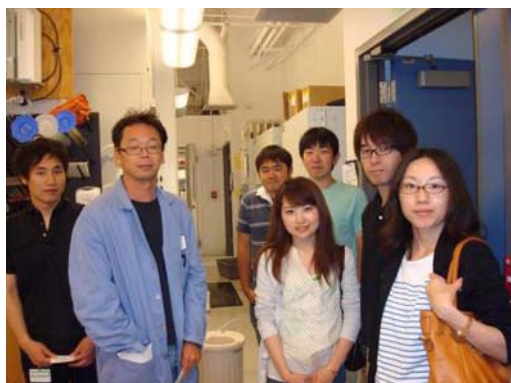
最終日の Banquet の様子



～番外編～
スタンフォード大学にて
山添紗有美博士（右から2人目）と



～番外編～
UCSD にて石川文洋博士（左から1人目）と



～番外編～
Scripps 研究所見学。東京薬科大学の山崎先生（右）と山田さん（右から2番目）と日本人研究員の方々と（左2人、右奥2人）。

第14回ペプチドフォーラムのお知らせ

第14回ペプチドフォーラムを本年12月に、鹿児島にて開催する運びとなりました。フォーラムのテーマは、“ペプチドサイエンスの最前線～機能性ペプチドのデザインと評価～”です。多くの学会員を含めたペプチド研究者の皆様のご参加をお待ちしています。

主 催：日本ペプチド学会
共 催：日本化学会, 日本薬学会, 日本生化学会
会 期：2011年12月16日(金) 9時～15時30分
会 場：鹿児島大学産学官連携推進機構 1階
ディスカッションルーム

〒 890-0065

鹿児島市郡元 1 丁目 21-40

[交通] JR 鹿児島本線「鹿児島中央」駅より、市電「郡元」行き「工学部前」下車 (所要時間約 10 分)、鹿児島大学郡元キャンパス内徒歩 5 分

ホームページ:

<http://www.sci.kagoshima-u.ac.jp/~yito/pf14/peptideforum14.html>

参 加 費: 無料

参 加 登 録: 事前参加登録が必要です。下記の世話人あて、参加希望の旨、電子メールにて御申し込みください (申し込み締め切り 2011 年 10 月 31 日)。

発表申し込み: ペプチドサロンにおける一般講演とポスター発表を募集しています (英語での発表が基本です)。参加登録の際、発表希望と明記の上、発表演題 (日本語と英語) をお知らせください。但し、枠が一杯になり次第締め切らせていただきます。

懇 親 会: 会場外での懇親会を予定していますが、場所等は参加者の皆様に直接ご案内します。

特別講演:

1. 黒木良太 (日本原子力研究所)「蛋白質・ペプチドの水素原子を観測する」
2. Sihyun Ham (Korea)「Drug Design Targeting Protein-Protein Interactions」(予定)



鹿児島中央駅前にある“若き薩摩の群像”

一般講演 (ペプチドサロン):

予定演題を下記に示しますが、まだ発表枠に余裕があります。皆様の発表申し込みをお待ちしています。

1. 次世代抗体医薬: 立体構造規制ペプチドライブラリーによる分子標的ペプチドの創出 (大阪府大, 藤井郁雄)
2. 人工基底膜の創製 - ペプチド科学からの挑戦 - (東京薬科大学, 野水基義)
3. 金属によるペプチドの構造と機能スイッチ (京都大学, 二木史朗)
4. ペプチド化学を基盤としたケミカルバイオロジー (東京医科歯科大学, 玉村啓和)
5. リン酸化タンパク認識ペプチドの創製とその抗腫瘍作用 (大阪大学, 深瀬浩一)
6. ペプチドライゲーションを指向する N-S アシル基転位反応を用いたペプチドドオエステルの合成 (大阪大学, 川上徹)
7. 低分子ペプチドによるアフィニティリガンドの設計 (鹿児島大学, 伊東祐二)
8. コラーゲンペプチドの創薬への応用 (早稲田大学, 小出隆規)

ポスター発表:

1. P-糖タンパク質と Gramicidin S 類縁体との相互作用 (京都大学, 赤松美紀)
2. マイトクリプタイド: ミトコンドリアタンパク質由来新規生理活性ペプチドによる生体調節 (長浜バイオ大学, 向井秀仁)

問合先・世話人: 伊東 祐二

鹿児島大学理工学研究科生命化学専攻 (理学系)

〒 890-0065 鹿児島市郡元 1 丁目 21-35

TEL/FAX: 099-285-8110

Email: yito@sci.kagoshima-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

小出 隆規 (早稲田大学先進理工学部)

TEL 03-5286-2569, FAX 03-5286-2569

e-mail: koi@waseda.jp

川上 徹 (大阪大学蛋白質研究所)

TEL 06-6879-8602, FAX 06-6879-8603

e-mail: kawa@protein.osaka-u.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

(本号編集担当: 小出 隆規)