



# PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.83

2012年1月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

## 新年のご挨拶

日本ペプチド学会の皆様、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。

2011年という我が国にとって想像を絶する試練の年が過ぎ、新しい年が始まろうとしております。数百年に1度という巨大震災と津波が東北地方を襲い、さらに高い安全性が詠われていた原子力発電所が制御不能となり、国民注視の中でその建家が水素爆発で無惨な姿になることなど、1年前に誰が想像できたでしょうか。夏には各地で集中豪雨による災害が起こり、秋には大打撃を受けた我が国の生産活動が徐々に回復してきたのもつかの間、タイで起こった大洪水で日本の生産活動は再び試練にたたされることになりました。

このような困難な状況の中で、厳しい財政状況を克服し、第48回ペプチド討論会ならびに第12回市民フォーラムを成功裏に運営してくださいました北海道大学の坂口和靖教授ならびに河野敬一教授に深く感謝申し上げます。

また、地震と原発事故に見舞われた日本に対し、中国、韓国、ヨーロッパ、アメリカ、オーストラリアの学会および会員の方から、心のこもった多数のメッセージが寄せられました。昨年のお年の挨拶で、第5回国際ペプチド討論会（第5回IPS）が成功裏に終了し、名実共に世界のペプチド科学を牽引する学会として認知されたと書きましたが、今回の大災害において、ペプチド仲間の輪が全世界に広がっていることを実感いたしました。

ところで、江戸時代末期に起こった4つの安政大地震とペリーの黒船来航が、時代に対応できなくなっていた江戸幕府の機能不全を顕在化させ、それを崩壊させて明治維新へと社会を押し進めて行ったと言われております。最近、現在の状況はそのころとよく似ているという話をよく耳にします。3.11を契機に様々な討論会が開催され、被災地域の復興を通して、新しい日本を作ろうという模索が始まっております。この際、私たちも向こう100年の我が国の姿を決するような新しい日本のあるべき姿について考える必要があるかと思っております。

ペプチド科学を専門としている自分たちには国家100年の計など直接関係ないと思わないでください。



相本 三郎

大いにあるのです。第4期科学技術基本計画では、我が国の目標として以下の項目を掲げております。

1. 震災から復興、再生を遂げ、将来にわたる持続的な成長と社会の発展を実現する国
2. 安全かつ豊かで質の高い国民生活を実現する国
3. 大規模自然災害など地球規模の問題解決に先進的に取り組む国
4. 国家存立の基盤となる科学技術を保持する国
5. 「知」の資産を創出し続け、科学技術を文化として育む国

これらの目標を実現するために様々な政策が立案され、膨大な国費（＝税金）が投入されることとなります。4と5はまさに我々がその実現に責任をもつべき項目です。

これらの目標を実現するために、若手研究員から国際的研究者までを対象とした、ニーズに合わせた多様な研究支援メニューが整えられております。しかし、経費の配分のあり方やその趣旨に必ずしも納得して応募されている方々だけではないのではないのでしょうか。現実の研究・教育行政に、なんだか変だ、何か足りない視点があるのではないかと、思われている方は少なからずいらっしゃるのではないのでしょうか。周囲を見回してみますと、博士課程への進学を希望する大学院生は減少気味ですし、外国への留学者数も減少気味です。首尾よく外部資金を獲得した教員からは、増加した雑務に追われ、学生との接触時間が少なくなったという声も聞きます。極貧に喘ぐ研究室もあれば、豊かすぎはしないかと思われる研究室もあります。

あれこれ見聞きしておりますと、若手研究者を国際的研究者に育て上げるには、支援政策の変革が必要のように思えますし、期限付きの大型プロジェクトには、もっと長期的視点が必要とも思えます。期限がくれば、プロジェクトが成果を出そうが出すまいが終了し、ポスドクは生活をかけて次のポジションを探さなければならぬというのはいかがかと思えます。

若者が研究者として社会に貢献したいと思う環境を作るこそ、お題目ではなく、真に「国家存立の基盤となる科学技術を保持する国。「知」の資産を創出し続け、科学技術を文化として育む国」を実現する上で必須ではないかと思えます。この国難にあたり、皆様、一人ひとりが坂本龍馬の目録で我が国の科学技術政策のあるべき姿について、身の回りの「なんだか変!」を基に、「こうすればもっと良くなるのでは!」という提案を発信されることを希望いたします。

最後になりましたが、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 理事・副学長  
(兼) 蛋白質研究所  
aimoto@protein.osaka-u.ac.jp

## 平成23年度日本ペプチド学会賞を受賞して

この度、「受容体分子機構解明のためのペプチドリガンド探索子」の研究課題で日本ペプチド学会賞を受賞する栄誉に浴し、大変光栄に存じます。日本ペプチド学会および会員の皆様に心より感謝申し上げます。また、これまでご指導いただきました諸先生、共に実験・研究に励んだ研究室の学生諸氏、さらには、共同研究して頂いた諸先生に、深く感謝申し上げます。この受賞を契機に、さらにペプチド科学の研究・教育に邁進したいと存じます。今後ともどうぞよろしくお願い申し上げます。



下東 康幸

受賞の対象になったペプチドリガンド探索子の研究の経緯について、特に若い人の参考になることがあればと思います。生理活性に力点を置いてご紹介します。研究内容については、その概要を既に札幌のペプチド討論会でお話ししましたので、ここでは少し回り道、寄り道をしながら、受容体応答の解析に如何に構造活性相関 (SAR: Structure-Activity Relationships) 解析研究が大切か、その実験にどのような準備をしたか、どのように学生諸君が、スタッフの皆さんが働いてくれたかを綴りたいと思います。特に、私たちは化学合成したペプチドをほとんど自らの手でアッセイすることで評価しており、この生理活性測定の研究実情については長くなることを厭わずに、皆様にご紹介しようと思えます。

### アミノ酸化学からペプチド化学へ

私がペプチド科学の世界に入ったのは、九州大学理学部化学科4年生の時に泉屋信夫先生の研究室に配属された時に始まります。卒論の研究テーマは、「 $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -ヒドロキシカルボン酸 (セリンおよびトレオニン) のワルデン転位」でした。日本のペプチド化学の黎明期にあつてパイオニアのお一人である泉屋先生は、グラミシジンSやAM-トキシンをはじめとする生理活性ペプチドのSAR解析で世界的に著名ですが、先生ご自身はアメリカNIHのGreenstein 研での留学時代を含めてこうした「 $\alpha$ -アミノ酸の化学」について随分と詳細な研究に取り組みおられました<sup>1)</sup>。その一環で、ワルデン転位で残されていた上記のテーマを私が頂いたことになります。実験の結果、他の光学活性な $\alpha$ -アミノ酸がそのワルデン転位の反応により、L型からD型のアミノ酸が得られるのに対して、例えば、L-セリンから目的のD-セリンは全く得られませ

んでした。同様に、L-トレオニンからD-トレオニンは全く得られませんでした。しかし、これは、中間体として図1のようにエポキシを経由するためであることが直ぐに分かりました。

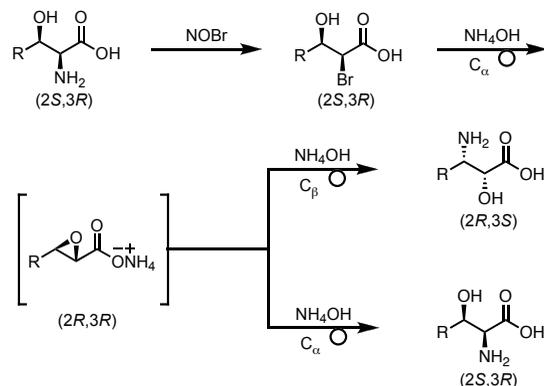


図1  $\alpha$ -アミノ- $\beta$ -ヒドロキシカルボン酸のワルデン転位反応スキーム。R = H, セリン; R = CH<sub>3</sub>, トレオニン。セリンのとき、 $\beta$ 位(3位)炭素原子は不斉でないため、3Sおよび3Rはない。

エポキシ中間体とアンモニアとの反応は $\alpha$ 位および $\beta$ 位で起こり、 $\alpha$ -ヒドロキシ- $\beta$ -アミノカルボン酸 (イソセリン, イソトレオニン) が主成分として生成し、L-セリン, あるいはL-トレオニンが少し残りました。立体化学は非常に簡潔であり、エポキシを生成するときに $\alpha$ 位で反転が起こります。一方、エポキシ中間体とアンモニアとの反応が $\beta$ 位で起こるとその位置で反転が起こり、(2R, 3S)-イソトレオニンが生成します。セリンの場合は $\beta$ 位炭素原子が不斉ではないので立体化学に変化がなく、(2R)-イソセリンが得られます。一方、少し残ったL-セリン, L-トレオニンは未反応物ではなく、エポキシ中間体の $\alpha$ 位をアンモニアが攻撃して生成したもので、 $\alpha$ 位では2回反転することになり、立体化学は元に戻ったものでした。トレオニンには不斉炭素原子が $\alpha$ 位と $\beta$ 位に両方であり、このため、エポキシ中間体に起こるSN2型の反転を伴うアミノ化の反応は、立体化学をきちんと証明する必要がありました。当時、60MHzが主流であった時代、薬学部にあった100MHzの<sup>1</sup>H NMRで、調製したオキサゾリドン誘導体において隣り合うCH基のカップリング定数から異性体の構造を決めるなど、随分と勉強になりました<sup>2)</sup>。このように、このヒドロキシアミノ酸の合成化学および立体化学は、「目的のD-アミノ酸」が得られなかったものの、反応機構を説明する必要性があつたため、難解ながら楽しい研究テーマでした。また、アミノ酸化学からスタートしたこの経験はその後にペプチド科学・タンパク質科学の分野で活動するのに、さまざまな局面で大いに役に立ちました。これは、泉屋先生の高所からのご配慮に違いないと後々に気付いたことでした。また、直接には脇道典先生(当時助手、その後(株)生化学工業を経て、九州大院工・准教授)にご指導頂きました。特に、研究に向き合う基本姿勢、情熱、気合いの大切さをお教え頂きました。

## 非天然特殊アミノ酸を生理活性ペプチドへ

大学院に進学して、リング斑点落葉病の病原菌 *Alternaria mali* の産生する毒素ペプチド・AM-トキシンの SAR 解析研究に取り組むことになりました。この環状デプシテトラペプチドはデヒドロアラニン ( $\Delta$ Ala), 側鎖メチレン基3個のTyr (OMe), Tyr, Phe のホモログなどの特殊アミノ酸を含むため、その合成方法を考える必要がありました。 $\Delta$ Alaは、セリンをトシル化して塩基処理による $\beta$ -脱離反応で調製しました。一方、芳香族アミノ酸はN-アセチルアセトアミドマロン酸ジエチルエステルとアリルアルキル臭素のカップリングを基点とする一連の反応で調製しました<sup>3)</sup>。この反応をのちにハロゲン化ベンゼン環を持った一連のPheホモログの合成にも応用し(図2)<sup>4)</sup>、受容体リガンドペプチドのアナログを用いたSAR研究の展開が自由自在になりました。生理活性ペプチドのSAR研究においては、各アミノ酸残基の重要性を知るためAlaに置換して調べる「Alaスキニング法」がありますが、受容体との相互作用の特性を知るためには特殊アミノ酸が必要であり、アミノ酸(L型およびD型)を合成する手法を持っていることは非常に重要な要素と言えます。

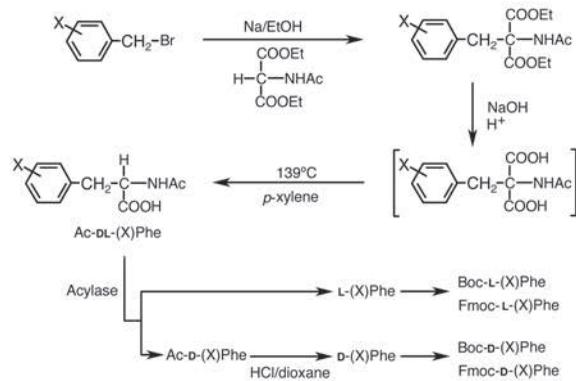


図2 ハロゲン化ベンジルブロミドとN-アセチルアセトアミドマロン酸ジエチルエステルを出発原料とするハロゲン化Pheホモログの合成スキーム。

AM-トキシンのSAR解析研究では、活性測定も重要です。主に、京都大学の野上先生(農学部教授)にお願いしていましたが、『自分たちでも測定しよう』ということになり、山口県徳佐のりんご園から鉢で苗木を購入し、稀釈液をシリカゲルに塗して葉っぱの上におき、斑点出現の濃度依存性を観察しました。Tyr (OMe), Tyr, Pheホモログの側鎖メチレン基が1個でも短くなると失活する程になることから、厳密な応答を示す受容体が存在すると思われましたが、その本体は今でも分かっていません。私がペプチド化学討論会で初めて口頭発表したのは、AM-トキシンの $\Delta$ Alaの側鎖ビニル二重結合の重要性についてでした<sup>5)</sup>。また、私の博士論文の研究課題は、「AM-トキシンIIのSAR解析研究」に関する成果でした<sup>6)</sup>。こうした一連の研究を通して、李相男先生(後に福岡大理)にはアミノ酸合成、ペプチド合成について基礎を教授頂きました。また、青柳東彦先生(当時助手、その後、長崎大工・教授、現・九州栄養福祉大・教授)からは特に、ペプチドの美しい結晶化について多くを学びました。

## 生理活性ペプチドの活性コンホメーションの解析

AM-トキシンのSAR解析研究で初めてコンホメーション解析に取り組みました。1977年当時、日本で最初の270 MHz NMRが東京大理の宮沢辰雄先生の研究室で測定できるようになり、博士学生だった東島勉さん(後に助手、さらに米国University of Texas Southwestern Medical 准教授)と測定結果についていろいろと検討し合う、思えば楽しい思い出があります。特に思い出すのはベンゼン滴定の実験です。AM-トキシンに4つあるペプチド結合カルボニル基がどちら側を向くコンホメーションになるのか?等を判別するのにベンゼン滴定をしたのですが、通常のクロロホルム-d中の測定では高磁場シフトするところが、DMSO-d<sub>6</sub>中での滴定では調べるべきプロトンすべてが低磁場シフトしており、二人で随分と悩みました。そうしたなか、ある時にグラフに目盛って眺めていたところ、低磁場シフトが小さいものと大きいものにきれいに判別することができることに気がきました。これで活性コンホメーションの同定に成就しました<sup>7)</sup>。頭脳明晰で、非常に闊達な東島さんとのやりとりはとても面白く、構造解析の醍醐味の一端に触れたような気がしました。しかし、その後若くして急逝されたのは、何とも残念なことでした。

NMRでのコンホメーション解析では、1982年当時にアメリカのNIHで、デヒドロフェニルアラニン( $\Delta$ Phe)のZ(側鎖フェニル基とカルボニル基はトランス)とEを判別するのにアミドプロトンとC $\beta$ ビニルプロトン間のNOEの測定を用いる方法を考案し、犬伏俊郎先生(現・滋賀医科大教授)と一緒に実証実験したのも、快活な思い出です。測定から論文上梓、印刷まで非常に迅速に進みました<sup>8)</sup>。

キモトリプシンの阻害剤としてH-L-Leu-D-Phe-NH-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>を見出し、その阻害活性コンホメーションを解明したのも、SAR解析に構造解析が如何に大切かを知った研究です。この研究では、当時九州大学歯学部におられた河野敬一先生(その後、富山医科大を経て、現在は北海道大先端生命科学・教授)に大層お世話になりました。ジペプチドのL-Leu-D-Phe側鎖側鎖間がリジッドな疎水性コアを形成することで、酵素阻害コンホメーションを形成するのですが、そのコンホメーション、すなわち、CH/ $\pi$ 相互作用による疎水性コアの存在を、NOE、高磁場シフトなどを解析するNMR測定から明らかにすることができました<sup>9,10)</sup>。そして、この研究を中心的に進めてくれた当時博士課程の学生であった坂本寛君(現・九州工大大学院情報工学・准教授)、前田衣織君(現・九州工大大学院情報工学・准教授)、野瀬健君(現・九州大院理・准教授)は、河野先生のご薫陶のお陰もあり、それぞれ大学の生命化学系で中堅として活躍しています。

阻害コンホメーションがNMRで解析された構造であることを最終的に確認できたのは、上記のジペプチドとキモトリプシン酵素タンパク質結合体の結晶のX線構造解析によります。平成5年(1993年)、明石市で開催の第31回ペプチド化学討論会(岡田芳男先生世話人)での前田君の口頭発表の後、ミドリ十字の井上佳久氏(現・武田製薬工業)から「C末端ベンジル基が酵素の基質認識部位S1ポケットに結合するのは

おかしいのでは？」という指摘を受け、結晶構造解析を共同することになりました。H-D-Leu-L-Phe-NH-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (pF) と  $\gamma$ -キモトリプシン結合体について、同社の鹿島亜季子さんと井上さんが結晶化、構造解析を実施し、そして、見事に実証されました<sup>11)</sup>。しかも、C末端ベンジルのパラ位フッ素が水を介してS1サイト底で酵素 Ser215  $\beta$  ヒドロキシル基と水素結合し、また、CH/ $\pi$  相互作用による疎水性コアをつくっているL-Phe 側鎖ベンゼン環は、もう一方の  $\pi$  面で酵素 His57 の側鎖イミダゾールを  $\pi/\pi$  スタッキングしていることなどが新たに判明しました (図3)。

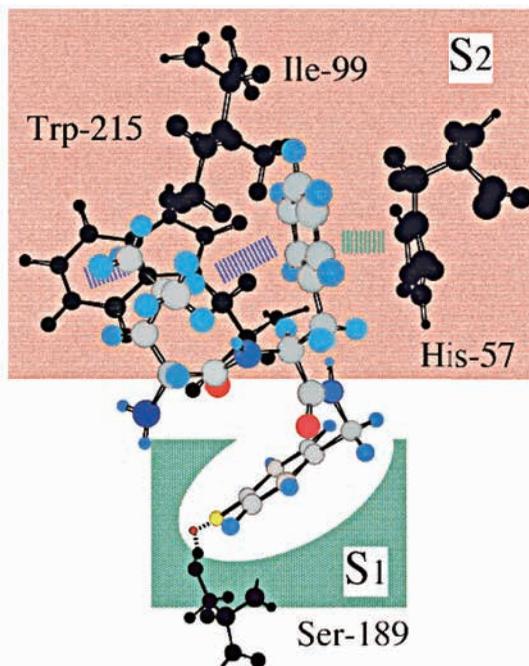


図3 ジペプチドH-D-Leu-L-Phe-NH-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> (pF) の酵素キモトリプシンの阻害コンホメーション。

#### リガンド-受容体結合体のX線結晶構造解析へ

ジペプチドの酵素キモトリプシン阻害コンホメーションの研究は、リガンド-受容体結合体のX線結晶構造解析の威力を認識した初めての事例となりました<sup>12)</sup>。こうしたなかで、受容体起動の分子メカニズムを解析するのが一つの夢でしたので、リガンドのアミノ酸残基のみならず、受容体の残基置換が自在になり、受容体アッセイが自在になるとどうしても構造解析を実施して、より動的なSAR研究を展開したくなります。現在、これが実現している私たちの研究が、DNAのmRNAへの転写活性化に働く「核内受容体」をめぐるSAR研究です。創薬の一つの流れとして、ペプチドから低分子有機化合物へと分子設計(ドラッグデザイン)が進展する展開がありますが、この展開を経験すると、もはや受容体リガンドとして見る化学物質について「ペプチドか? 低分子有機化合物か?」という存念は消えて、ただ、受容体のリガンド結合ポケットに存在する基、基、基々としか見えなくなります。

2008年に私たちは、ヒト核内受容体48種のうちの一つ、エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR  $\gamma$ ) に環境ホルモン・ビスフェノールAが非常に強く、特異的に結合することを見出しました<sup>13)</sup>。この意外な発見は、

ビスフェノールAの低用量効果が脳神経系に及ぶ懸念とあいまって、ERR  $\gamma$  が胎盤や胎児(仔)脳に多く発現していることなどのため<sup>14)</sup>、大きな注目を集めました。核内受容体のリガンド結合ドメインは、 $\alpha$ -ヘリックス12個からなる、いわゆる「 $\alpha$ ドメイン構造」を持っており、リガンド結合ポケットは、一つの  $\beta$  シートが底を打つ形になっています。通常は、リガンドが結合すると、第12番目ヘリックス (H12) がフタをするように構造変化し、こうしてできた活性コンホメーションを認識するようにCoactivatorと呼ばれるタンパク質が結合し、転写因子としての働きを発揮するようになります。私たちはビスフェノールAとERR  $\gamma$  の複合体(結合体)の結晶化に成功しました。ERR  $\gamma$  は、リガンドの結合無しに活性コンホメーションを取る(このことを構成活性と呼びます)自発活性化型受容体ですが、結合体の構造解析から、ビスフェノールAはこの活性コンホメーションを変化させることなく、結合ポケットにすっぽりはまり込んでフィットしていることがわかりました(図4)<sup>15)</sup>。こうしたX線結晶構造解析によるSAR解析研究は、助教の松島綾美君が中心になって取組み、ビスフェノールAの結合が結合ポケット内の各層のアミノ酸残基による適合誘導であるなど、基盤的な構造情報を得ることに成就しました<sup>16)</sup>。現在、ビスフェノールAをマウス、ショウジョウバエなどの実験動物に食餌し、「ERR  $\gamma$  へのビスフェノールAの結合がどのような影響をもたらすのか?」の、*in vivo* の研究課題に取り組んでいます。

ERR  $\gamma$  受容体のビスフェノールA結合サイトのアミノ酸残基の重要性は、Alaスキニングで調べられます。受容体のアミノ酸残基を変異させ、活性に影響があると、「それは構造変化のためではありませんか?」という質問が必然的に出てきます。核内受容体は幸い分泌型のタンパク質ですから、変異遺伝子を用いて発現したタンパク質について単一成分で、純粋か? をSDS-PAGEで調べ、CDで全体的な  $\alpha$ -ドメイン構造が保持されていることを確かめ、あるいはさらに、X線結晶構造解析で、というような構造解析スキームと、受容体結合試験とレポーター遺伝子アッセイによる活性試験スキームを組合せてSAR解析を進めています

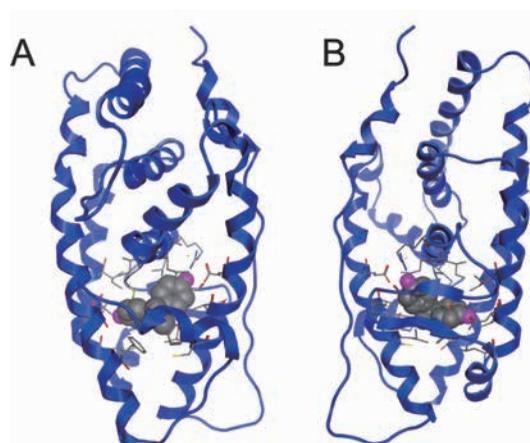


図4 エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR  $\gamma$ ) に結合した環境ホルモン・ビスフェノールA。A: H12がフタをしている上側から見た構造, B:  $\beta$ -シートが底を打っている下側から見た構造。

す<sup>17)</sup>。受容体結合試験では、アゴニストか？ アンタゴニストか？ で上述のH12の位置取りが異なるため、その結合特性が相違します<sup>18)</sup>。そして最近、結合サイトは表層のアミノ酸とそれを支える第二層が協調してつくられていることが明らかとなりました<sup>19)</sup>。こうした解析研究は、特任助教の劉 暁輝君が中心となり、精力的に実施しています。

## 受容体アッセイを自分の手で。そして、分子薬理的解析へ

話しはまた少しさかのぼりますが、1979年正月にアメリカGeorgia大学の化学科のStammer教授のもとに留学しました。神経ペプチド・エンケファリンの高活性アナログをモルヒネに代わる「夢の鎮痛薬」として開発しようとするSAR研究が最盛期の時代で、私もデヒドロアミノ酸を導入アナログの合成研究に携わりました。しかし、本来が有機合成化学の研究室であったため、合成したペプチドを自分でアッセイすることは叶わず、教授知合いの製薬会社に依頼することになりました。これが、「時間がかかる」、しかも「送付されたデータは通り一遍で詳しい内容が分からず」で、「生理活性測定の壁」に行き当たってしまいました。その年の夏にワシントンDCで開催されたアメリカペプチド討論会に参加したのを機会に、当時、NIHに留学中であった泉屋研での先輩になる松浦脩治さん（その後神戸大医から和光純薬工業(株)・大阪研究所長、現・大阪大院医・保険学 特任教授）のお世話でNIH-NICHDに移動することになりました。そして、そこで、イタリアから留学中で、エンケファリンの合成研究を実施していたTommaso Costa氏と巡り会いました。同氏は分子薬理学の専門家であり、アッセイを受持ち、合成を私が受持つという分担で共同研究をするようになりました。最初に実施したのが『エンケファリンダイマー』研究です。当初は、数学的に多価性リガンドが高活性となる、受容体を同時に占有することができれば高活性となる、ということが実験的に論証できるか？ で取組んだのですが、いわゆる『二価性の受容体応答』が観察されるに至り、受容体ダイマーを証明する研究へと展開して行きました。エンケファリンは、アミノ酸5個から成る酵素分解にきわめて曝されやすいペプチドですが、C末端カルボキシル基をジアミノアルカン $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$  ( $n=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, \dots, 18, 20, 22$ )で架橋すると、 $n=2$ のとき最大活性（結合親和性および受容体活性化）となりました<sup>20)</sup>。アミノ酸4個のテトラペプチドをダイマーにすると $n=12$ のとき<sup>21)</sup>、トリペプチドをダイマーにすると $n=18$ のとき最大活性となり<sup>22)</sup>、最適な架橋鎖長があることが判明しました（図5）。エンケファリンダイマーがオピオイド受容体ダイマー（ $\delta$ 型）と二価的に相互作用しているかを証明するには、いくつかの要件を満たさなくてはなりません。単に、「ダイマーリガンドが高活性である」ことは何の証明にもなりません。このため、トリチウム標識のダイマーを合成して直接に受容体応答を解析したり<sup>21, 23)</sup>、一方のペプチド鎖の構造を不活性にした、いわゆる「ハンディキャップダイマー」をデザイン・合成して調べたりして、二

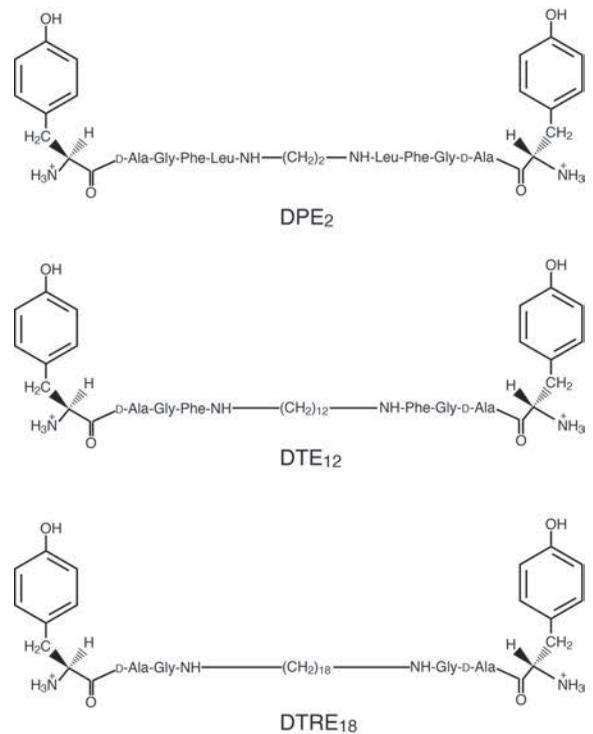


図5  $\delta$ 型オピオイド受容体と相互作用する最適な架橋鎖長のエンケファリンダイマー。

価性相互作用を実証しました<sup>24)</sup>。

このエンケファリンの研究で気付いた重要なことは、「受容体分子機構解明のためのペプチドリガンド探索子」においては、『ペプチドのデザイン・合成と受容体応答解析のアッセイが一体でないと研究はまったく進展しない』ということです。しかも、リガンドと受容体の双方向からのSAR解析でないと展開しませんし、自分自身が実施できることがとても大切です。もちろん、受容体応答に関して何を目標にしてSAR解析研究を展開するのか？ が最も重要なのですが、『リガンド結合を起点として誘起される受容体応答のダイナミクスの分子機構解明』ということになります。これは、リガンドの受容体応答が多様化していることが判明した現在、多様化している分子機構を解明することであり、受容体から発信される分子シグナルがどのようになっており、それらがどのように細胞応答を規定しているかを解明することであることに他なりません。Georgia大で合成したペプチドはCosta氏と私自身がアッセイし、 $\Delta$  PheのZとEで異なる側鎖ベンゼン環の向きが活性に重要な構要素因になるなど、いくつかの新規な面白い視点を見出しました<sup>25-27)</sup>。

## 摘出標本を用いた muscle アッセイ

受容体の機能、そして、それがもたらす細胞応答を解明するために展開するSAR解析であるとする、どうしても自らアッセイし、解析する必要があります。Costa氏が1986年、当時の西ドイツ・ミュンヘン郊外のMartinsriedにあるMax-Planck研究所に滞在中、私自身が数ヶ月訪問し、モルモット回腸（GPI）やマウス輸精管（MVD）の摘出組織標本を用いた電気刺激による収縮を抑制する活性測定法を習得しま

した。この、いわゆるmuscleアッセイを帰国してから（財）応用生化学研究所に設置することができました。これは、当時私が博士研究員としてお世話になっていた八木岡夫先生（名古屋大医・名誉教授）の研究所であり、1チャンネルの装置を組上げてオピオイド受容体に関する実験を開始しました。特に、Cys (Npys) を含むペプチドやNpys基を持つアルカロイドの誘導体によるアフィニティラベリングの実験は、まさに分子薬理学を具現化しているようであり、痛快な実験でした<sup>28, 29)</sup>。佐賀大理工・兒玉浩明君（助教授、現在教授）、近藤道男先生（名誉教授）との共同研究は、当時、大学院生だった安永輝男君（現・大塚製薬）と夜を徹して行った実験で、「ジスルフィド結合を介して受容体Cysと結合したエンケファリンが確かに共有結合している」ことが実験的に確認できて（図6）、非常に感激したことを覚えています。

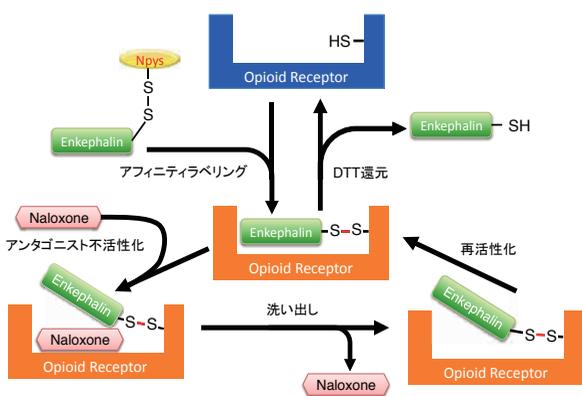


図6 Cys (Npys) 含有エンケファリンによるオピオイド受容体のアフィニティラベリングによる受容体応答。

こうした研究体制を整えつつ、他のアッセイについても共同研究を実施しました。例えば、福岡大薬学部の神谷大雄先生（教授）、当時助手の高野行夫先生（現在、教授）とは、当時大学院生だった坂口和靖さん（現在、北海道大院理・教授）共々、タキキニンペプチドダイマーの共同研究で大変お世話になりました<sup>30)</sup>。また、松本宏志君（現・森永乳業）は、福岡大まで出かけて摘出標本の自発筋収縮を指標にしたmuscleアッセイを実施しました<sup>31)</sup>。こうしたmuscleアッセイの器械は、最終的には2003年に4チャンネルの測定装置（AD Instruments社製）として研究室に導入することが叶いました。この装置は現在、例えば、ノシセプチン-ORL1受容体系の高活性アンタゴニストを同定する研究で活躍しています<sup>32)</sup>。いまや、アゴニスト、アンタゴニスト、インバースアゴニスト、インバースアンタゴニストの活性の同定、相互関係の検定などに、muscleアッセイは必需の測定系です。

#### トロンビン受容体を介した血小板凝集アッセイ

酵素トロンビンの受容体は、Gタンパク質共役受容体（GPCR）の一種であり、7回膜貫通型構造を持っています。トロンビンが、細胞膜外に在るN端伸長ペプチド鎖の40-41位を切断すると、新しく現れたN末端ペプチド7残基がリガンドとして機能する、原始

型GPCRです。そして、N末端7残基・SFLLRNPの合成ペプチドは、受容体を直接に活性化することができます。こうした活性を測定するのに、ヒトの血液から調製した血小板の凝集活性を指標にしました。当時に大学院生だった藤田亜美君（現在、佐賀大医・准教授）、松島綾美君（現在、九州大院理・助教）は、医学部で自らの血液を採血してもらい、アッセイに供して研究を進めました。特に、2位Pheの側鎖ベンゼン環水素原子が受容体芳香環との間でつくるCH/ $\pi$ 相互作用を詳細に解析する研究は、まず、フッ素化ベンゼン環を持つ一連のアミノ酸の化学合成から始まり、ペプチド合成、そして、血小板凝集活性（濁度の上昇度を測定）のアッセイへと、すべてを自分の手で実施するSAR解析研究となりました<sup>33-36)</sup>。

#### タンパク質：ホルモン、抗体、酵素、そして、受容体

酵素トロンビンとその受容体。いずれも、タンパク質です。生理活性ペプチドを研究対象とすることは、ほぼ同義にタンパク質を取扱うことのように思ってきました。その最初のきっかけは、1980年にNIHに移動したときLabチーフのHao-Chia Chen先生からもらった研究テーマ「妊娠ホルモンhCG（ヒト絨毛性ゴナドトロピン）を特異的に認識する抗体の作製」でした。合成した $\beta$ 鎖のC端側ペプチド断片を抗原にして、ポリクローナル抗体を作製し、ラジオイムノアッセイ（RIA）で適切なエピトープを探り、hCG特異的抗体を機能阻害に用いようとする目的でした。これと同時に、hCGが糖タンパク質ホルモンであったので、「この糖鎖を取り除いた脱糖化hCGが受容体アンタゴニストとして働くのではないか？」そして、「この脱糖はフッ化水素で可能では？」という着想で、脱糖化hCGの調製に取組みました<sup>37)</sup>。このHF処理による脱糖化hCGは、有効なアンタゴニストとして働くことが分かり<sup>38)</sup>、その後、 $\alpha$ 鎖を共有する生殖腺ホルモンであるTSHなどの脱糖化ホルモンでも確認されました<sup>39)</sup>。高活性ペプチド、アンタゴニストを創製するのに、アミノ酸置換を含めたペプチドの化学修飾が有効なように、タンパク質ホルモンのアンタゴニストの創製にも化学修飾が有効な事例です。受容体結合親和性はほとんど変化せずに、活性が失われ、したがって、アンタゴニストとして働きます。

1989年（平成元年）、私は九州大学理学部化学科の出身の講座において、ペプチド学会の名誉会員でもある大野素徳先生により助手に任用されました。当時、ハブ毒の毒素タンパク質の研究が主体であり、私も毒素酵素の生化学に従事することになりました。塩基性Lys48-ホスホリパーゼA2の機能解析に取組み、これが膜作用性であることを証明しました<sup>40)</sup>。こうしたタンパク質の取扱いは、後年、受容体アッセイはもちろん、生理活性ペプチドの探索、免疫組織学的アッセイ、ELISAを用いたアッセイ法開発などで大いに役立ちました。

#### 実験動物を用いた *in vivo* アッセイ

実験動物を用いる *in vivo* アッセイは、動物を飼う必要があり、理学部の化学科で実施するのはなかなか困難を伴います。特に、厳しい実施体制や管理体制が

求められるのはもちろんですが、実験そのものの測定に十分な技術と装置が必要となります。当初、高度な実験は共同研究をお願いしました。例えば、 $\nabla$ Pheを含むエンケファリンをアッセイしました。 $\nabla$ Pheは、シクロプロパンPheの表記であり、 $\alpha$ 、 $\beta$ 位でシクロプロパン環を形成します。両方の炭素原子とも不斉であるため、シス、トランスに加えて、それぞれに立体異性体が存在します。これら4種の $\nabla$ Pheを含むエンケファリンを、 $\delta$ および $\mu$ 型オピオイド受容体に対して結合試験すると、(2R, 3S)- $\nabla$ Phe体 (CP-OMe) (図7) に強い $\delta$ 受容体選択性が観察されました。しかし、このCP-OMeは $\delta$ を優先的に含むマウス輸精管(MVD)でのmuscleアッセイにまったく応答せず、また、アンタゴニスト活性も示しませんでした。実際、MVDで $\delta$ 受容体結合試験をしても結合しません。したがって、『CP-OMeは脳内 $\delta$ 受容体と末梢MVD $\delta$ 受容体を識別認識する』最初のペプチド性リガンドとなりました<sup>41, 42)</sup>。しかしながら、このCP-OMeは脳内においても $\delta$ 受容体に対してアゴニストでも、アンタゴニストでもありませんでした。そこで、福岡大の神谷先生にお願いして、鎮痛活性を測定してもらいました。活性はありませんでした。しかし、驚いたことに、モルヒネの活性を抑制・阻害したのです。モルヒネは $\mu$ 受容体に結合して鎮痛活性を示します。このモルヒネを用量依存的にきちんと阻害したのです。こうして、『CP-OMeは脳内において、 $\delta$ 受容体に結合して $\mu$ 受容体を抑制する』最初のペプチド性リガンドとなりました<sup>43)</sup>。この結果は、 $\delta$ 受容体と $\mu$ 受容体がアロステリックに制御するヘテロ二量体を形成していることを示しています。この結果を得るまでに約5年費やしましたが、自らアッセイしながら、しつこく問題の本質を追い続けて来たお陰であったと思っています。

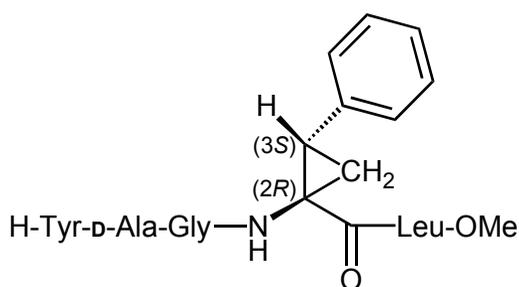


図7 脳内 $\delta$ 型オピオイド受容体に特異的に結合し、 $\mu$ 型をアロステリックに阻害する(2R, 3S)- $\nabla$ Pheエンケファリン (CP-OMe)。

CP-OMeに該当する天然リガンドが何なのか？これが問題ですが、私には既に同定されている「あるペプチド」である、という確信があります。これを証明したいと考えています。皆さんもご存じのように、オピオイドペプチドには何種類も発見されていて、対応する受容体も現在はアイソフォームが多く同定されつつあります<sup>44)</sup>。さらに、受容体ダイマー(二量体)にホモ二量体、ヘテロ二量体と、少なくとも6種類があり、全体として見ると非常に多くのオピオイド受容体が存在していることになり、このため、『非常に多く

の機能を、受容体の存在状態で仕分け、使い分けしている可能性が強い』と思われます。こうした機能を見分け(識別)、同定するには、『ペプチドリガンド探索子』が絶対的に必要とされます。そして、こうした機能を見分け(識別)、同定する『アッセイ系』が絶対的に必要とされます。

私たちは現在、研究室の一隅に実験動物飼育舎を設置しています。数年前から急に厳しくなった管理規定に適合・合格した飼育舎を整備しました。ウサギでのポリクローナル抗体の作製は外注していますが、マウスやラットでの抗ペプチド・モノクローナル抗体の作製を行っています。また、マウスに対してビスフェノールA食餌の脳内核内受容体遺伝子への影響解析などの実験を実施しています。ビスフェノールA食餌の実験は、ショウジョウバエでも実施しており、多動性障害を誘起する歩行異常性の発見など、新しい視点も見えつつあります。こうした実験動物での研究には熟達・熟練の技倆がものを言いますが、研究成果の意外性や複雑性から理学的研究の課題にとっても合っていると、私には思えます。

#### 遺伝子操作による変異受容体の作製と受容体応答解析

1997~1999年には、文部省科研費・国際学術研究(共同研究)により、上述の藤田亜美君をCosta氏のもと(イタリア国立衛生研究所(ISS)に帰国)へ派遣し、受容体遺伝子を用いた細胞への一過性発現と細胞膜調製、受容体アッセイについて最新の実験技術を習得してもらい、研究室に導入しました。既に1991年から半年間、私自身が遺伝子操作に関する実験法を実地に学んでいたもので、遺伝子組換え実験室P1, P2および細胞を取扱う実験室を整備し、受容体タンパク質を発現し、試験・アッセイする体制をつくりました。さらに、大学院生だった中馬吉郎君(現在、北海道大院理・助教)もISSへ派遣し、遺伝子改変による変異オピオイド受容体の作製法、アッセイ法について習得してもらいました。変異受容体については既に核内受容体に関する項で述べましたが、それに数年先立つことでした。

先にも述べたように、受容体のアミノ酸残基を変異させて活性に影響があると、「それは構造変化のためではありませんか?」という質問が必然的に出てきます。分泌型の核内受容体の場合とは異なって、GPCRの変異受容体の研究ではこの問題は、ある意味で「深刻」です。生体膜中に受容体が発現されるため、膜への輸送・移動、膜への移入、膜中での構造構成など、核内受容体とはまったく違う要因があるからです。GPCRの変異受容体では、その変異がもたらす構造的な効果・影響によって、次のようなものが起こります。受容体構造全体に影響があって細胞膜にさえ発現し得ない変異、膜に発現はするけれどもペプチドリガンドも低分子有機化学物も結合できなくなる変異、膜に発現はするけれどもペプチドリガンドが結合できなくなるのに対して低分子有機化学物は結合できる変異、膜に発現してリガンド結合には何の影響もない変異。したがって、こうしたことを踏まえたうえで、いろいろなレベルのSAR解析が展開します。細胞膜に発現しているか? 否か? を調べるにはFlagペプチ

ドを組み込んで、抗体応答で調べる。あるいは、GFPを融合して顕微鏡観察する。詳細な飽和結合試験を実施する。いろいろな解析が可能であり、現在ではごく一般的な解析実験として広く行われています。もちろんのこと、私たちもこうした実験を併用しながら慎重にSAR解析を展開しました。2002年、神戸でのペプチド討論会で武田薬品の藤野政彦先生に「それは構造変化のためではありませんか？」と厳しい質問を受けましたが、GPCR研究では既に予見される常識的な問題として認識され、それをも含めてSAR解析研究が展開されていました。

GPCRのSAR解析研究において変異受容体で調べたのは、まず、藤田君が取組んだトロンビン受容体です。受容体PheおよびTyrをAlaに置換して、内蔵リガンド2位Pheの結合サイトを探索しました<sup>45)</sup>。次いで、Cys(Npys)含有エンケファリンがアフィニティラベリングするオピオイド受容体の遊離Cys残基を同定することに成就しました<sup>46)</sup>。これは、磯崎 要君(NIH留学を経て、現在、大塚製薬)が実施しましたが、磯崎君はオピオイド受容体の仲間、ノシセプチン-ORL1受容体系でも変異受容体を駆使したSAR解析研究を展開しました。特に、Trp208→Ala変異受容体では、ノシセプチンの結合親和性には影響がないものの、活性化がまったく起こらないことが判明し、「受容体活性化に必須なアミノ酸残基の存在」が明らかとなりました<sup>47)</sup>。ノシセプチン-ORL1受容体系の研究は1990年代後半から取組み始めました。これもCosta博士との共同研究で、アンタゴニストを鎮痛剤として開発する研究潮流を意識しながらも、受容体活性化の分子メカニズム解析に特異なりガンドを創製したい思いから鋭意に取組みました。既に、当時のファイザー製薬の謝鉄城博士、長久 厚博士(研究所長)とノシセプチンに関して、ORL1発現HEK293細胞を用いたSAR研究で大まかな特性をつかんでおりました<sup>48)</sup>。ORL1受容体やオピオイド受容体の遺伝子をCosta博士から入手した後は、自在なSAR研究が展開できるようになりました。磯崎君のあと、李 京蘭君(博士学位取得後、現日本ロレアル)、西村裕一君(現博士課程1年)に引き継がれ、ORL1受容体の7回膜貫通ドメインすべてのAlaスキニングに成就しました(図8)、重要な構造要因として4つの要素が判明するに至りまし

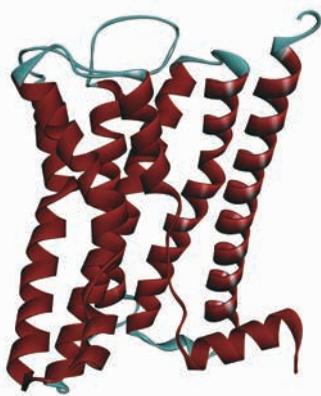


図8 Alaスキニングした疼痛ペプチド・ノシセプチン受容体のORL1。赤色，Alaスキニングした7回膜貫通ドメインおよび第8ヘリックス(横向き)；薄青色，細胞膜内および外のループ。

た<sup>49)</sup>。受容体活性化に鍵になるアミノ酸残基の発見、仕掛けの発見にもう一息ではと考えています。

### 新しい受容体 SAR 研究のはじまりにあたって

最近になってようやく、いろいろなGPCRのX線結晶解析の報告が相次ぐようになりました。リガンドとの結合体の構造解析も報告されています<sup>50)</sup>。これまで、ロドプシンのX線結晶構造をもとにしてコンピュータモデリングで考察してきたSAR解析が、進化しようとしています。SARは一気に深化し、受容体応答解析の実証研究が活性化に連動するアミノ酸残基、活性化の仕組みを明らかにするのでは？と強く期待されています。特に、リガンドの受容体応答が「単に活性があるか？ 無いか？」から、「どのような活性があるか？」に転化している現在、これらを識別しながら解明する必要があります(図9)。私もこれらをめざして、もう少し頑張れたらと思っています。今回の受賞を機に今一歩踏み込めれば幸いです。

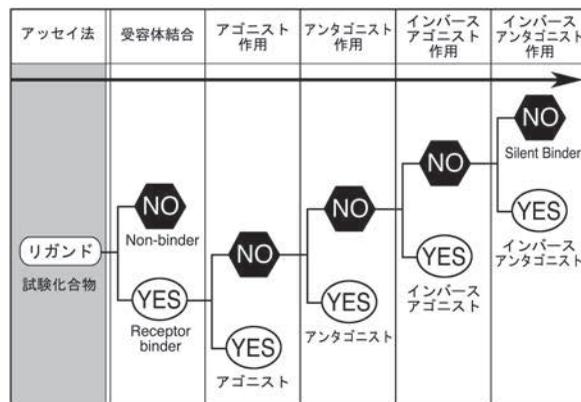


図9 核内受容体およびGタンパク質共役受容体における特異的リガンドの受容体応答解析スキーム。

今回の受賞があるのは、泉屋先生、脇先生、Stammer先生、Chen先生、八木先生、大野先生のご薫陶のお陰とところから感謝しております。また、兄弟のようなDr. Costaとの切磋琢磨はいつも意欲の源泉であり、活動の起源でありました。深謝します。さらに、一所懸命に研究、実験に励んで頂いた坂口和靖さんをはじめとするスタッフの皆さん、卒論生、院生の皆さんに、心からお礼申し上げます。

### 参考文献

- 1) 泉屋信夫, *Peptide Newsletter Japan*, **31**, 1-4 (1991).
- 2) Y. Shimohigashi, M. Waki, and N. Izumiya. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 949-950 (1979).
- 3) Y. Shimohigashi, S. Lee, and N. Izumiya. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 3280-3284 (1976).
- 4) T. Fujita, T. Nose, A. Matsushima, K. Okada, D. Asai, Y. Yamauchi, N. Shirasu, T. Honda, D. Shigehiro, and Y. Shimohigashi. *Tetrahedron Lett.*, 923-927 (2000).
- 5) Y. Shimohigashi, S. Lee, T. Kato, N. Izumiya, T. Ueno, and H. Fukami. *Peptide Chemistry 1976*, 105-108 (1977).
- 6) Y. Shimohigashi and N. Izumiya. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **12**, 7-16 (1978).
- 7) T. Higashijima, Y. Shimohigashi, T. Kato, N. Izumiya,

- T. Ueno, and T. Miyazawa. *Biopolymers*, **22**, 1167–1187 (1983).
- 8) Y. Shimohigashi, T. J. Nitz, C. H. Stammer, and T. Inubushi. *Tetrahedron Lett.*, **23**, 3235–3236 (1982).
  - 9) H. Sakamoto, Y. Shimohigashi, I. Maeda, T. Nose, K. Nakashima, I. Nakamura, T. Ogawa, K. Kawano, and M. Ohno. *J. Mol. Recogn.*, **6**, 95–100 (1993).
  - 10) I. Maeda, Y. Shimohigashi, I. Nakamura, H. Sakamoto, K. Kawano, and M. Ohno. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 428–433 (1993).
  - 11) A. Kashima, Y. Inoue, S. Sugio, I. Maeda, T. Nose, and Y. Shimohigashi. *Eur. J. Biochem.*, **255**, 12–23 (1998).
  - 12) Y. Shimohigashi, T. Nose, Y. Yamauchi, and I. Maeda. *Biopolymers (Peptide Science)*, **51**, 9–17 (1999).
  - 13) H. Okada, T. Tokunaga, X. Liu, S. Takayanagi, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi. *Environ. Health Perspect.*, **116**, 32–38 (2008).
  - 14) Y. Takeda, X. Liu, M. Sumiyoshi, A. Matsushima, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi. *J. Biochem.*, **146**, 113–122 (2009).
  - 15) A. Matsushima, Y. Kakuta, T. Teramoto, T. Koshiba, X. Liu, H. Okada, T. Tokunaga, S. Kawabata, M. Kimura, and Y. Shimohigashi. *J. Biochem.*, **142**, 517–524 (2007).
  - 16) A. Matsushima, T. Teramoto, H. Okada, X. Liu, T. Tokunaga, Y. Kakuta, and Y. Shimohigashi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **373**, 408–413 (2008).
  - 17) X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, T. Tokunaga, K. Isozaki, and Y. Shimohigashi. *FEBS J.*, **274**, 6340–6351 (2007).
  - 18) X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, and Y. Shimohigashi. *J. Biochem.*, **148**, 247–254 (2010). (JB 論文賞を受賞)
  - 19) X. Liu, A. Matsushima, M. Nakamura, T. Costa, T. Nose, and Y. Shimohigashi. *J. Biochem.*, in press.
  - 20) Y. Shimohigashi, T. Costa, S. Matsuura, H. C. Chen, and D. Rodbard. *Mol. Pharmacol.*, **21**, 558–563 (1982).
  - 21) Y. Shimohigashi, T. Costa, H. C. Chen, and D. Rodbard. *Nature*, **297**, 333–335 (1982).
  - 22) R. A. Lutz, R. A. Cruciani, Y. Shimohigashi, T. Costa, S. Kassis, P. J. Munson, and D. Rodbard. *Eur. J. Pharmacol.*, **111**, 257–261 (1985).
  - 23) T. Costa, Y. Shimohigashi, S. A. Kruminis, P. J. Munson, and D. Rodbard. *Life Sci.*, **31**, 1625–1632 (1982).
  - 24) T. Costa, M. Wüster, A. Herz, Y. Shimohigashi, H. C. Chen, and D. Rodbard. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 25–30 (1985).
  - 25) Y. Shimohigashi, T. Costa, and C. H. Stammer. *FEBS Lett.*, **133**, 269–271 (1981).
  - 26) Y. Shimohigashi, T. Costa, T. J. Nitz, H. C. Chen, and C. H. Stammer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 966–972 (1984).
  - 27) T. J. Nitz, Y. Shimohigashi, T. Costa, H. C. Chen, and C. H. Stammer. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **27**, 522–529 (1986).
  - 28) H. Kodama, Y. Shimohigashi, T. Ogasawara, T. Koshizaka, M. Kurono, R. Matsueda, K. Soejima, M. Kondo, and K. Yagi. *Biochem. Int.*, **19**, 1159–1164 (1989).
  - 29) K. Kanematsu, T. Kaya, Y. Shimohigashi, K. Yagi, and T. Ogasawara. *Med. Chem. Res.*, **1**, 191–194 (1991).
  - 30) K. Sakaguchi, H. Kodama, M. Yoshida, Y. Takano, H. Kamiya, M. Waki, and Y. Shimohigashi. *Peptide Res.*, **2**, 345–351 (1989).
  - 31) H. Matsumoto, Y. Shimohigashi, Y. Takano, K. Sakaguchi, H. Kamiya, and M. Ohno. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 196–204 (1993).
  - 32) J. Li, K. Isozaki, K. Okada, T. Nose, T. Costa, and Y. Shimohigashi. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 2635–2664 (2008).
  - 33) T. Nose, T. Fujita, M. Nakajima, Y. Inoue, T. Costa, and Y. Shimohigashi. *J. Biochem.*, **120**, 459–465 (1998).
  - 34) T. Fujita, T. Nose, M. Nakajima, Y. Inoue, T. Costa, and Y. Shimohigashi. *J. Biochem.*, **126**, 174–179 (1999).
  - 35) A. Matsushima, T. Fujita, T. Nose, and Y. Shimohigashi. *J. Biochem.*, **126**, 128, 225–232 (2000).
  - 36) A. Matsushima, T. Fujita, K. Okada, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **73** (11), 2531–2538 (2000).
  - 37) Y. Shimohigashi and H. C. Chen. *FEBS Lett.*, **150**, 64–68 (1982).
  - 38) H. C. Chen, Y. Shimohigashi, M. L. Dufau, and K. J. Catt. *J. Biol. Chem.*, **257**, 14446–14452 (1982).
  - 39) S. Amr, M. Menenez-Ferrera, Y. Shimohigashi, H. C. Chen, and B. Weintraub. *J. Endocrinol. Invest.*, **8**, 537–541 (1986).
  - 40) Y. Shimohigashi, A. Tani, Y. Yamaguchi, T. Ogawa, and M. Ohno. *J. Mol. Recogn.*, **9**, 639–643 (1996).
  - 41) Y. Shimohigashi, T. Costa, A. Pfeiffer, A. Herz, H. Kimura, and C. H. Stammer. *FEBS Lett.*, **222**, 71–74 (1987).
  - 42) L. K. Vaughn, W. S. Wire, P. Davis, Y. Shimohigashi, G. Toch, R. J. Knapp, V. J. Hruby, T. F. Burks, and H. I. Yamashiro. *Eur. J. Pharmacol.*, **177**, 99–101 (1990).
  - 43) Y. Shimohigashi, Y. Takano, H. Kamiya, T. Costa, A. Herz, and C. H. Stammer. *FEBS Lett.*, **233**, 289–293 (1988).
  - 44) S. Majumdar, S. Grinnell, V. L. Rouzic, M. Burgman, L. Polikar, M. Ansonoff, J. Pintar, Y.-X. Pan, and G. W. Pasternak. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **108**, 19778–19783 (2011).
  - 45) T. Fujita, T. Nose, A. Matsushima, T. Costa, and Y. Shimohigashi. *Peptide Science 1999*, 421–424 (2000).
  - 46) K. Isozaki, H. Fukahori, T. Honda, N. Shirasu, K. Okada, T. Nose, K. Sakaguchi, and Y. Shimohigashi. *Lett. Peptide Sci.*, **10**, 511–522 (2003).
  - 47) K. Isozaki, J. Li, K. Okada, H. Nishimura, A. Matsushima, T. Nose, T. Costa, and Y. Shimohigashi. *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 7904–7908 (2009).
  - 48) Y. Shimohigashi, R. Hatano, T. Fujita, R. Nakashima, T. Nose, T. Sujaku, A. Saigo, and A. Nagahisa. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23642–23645 (1996).
  - 49) H. Nishimura, J. Li, K. Isozaki, Y. Abe, S. Inamine, A. Matsushima, T. Nose, T. Costa, and Y. Shimohigashi. *Peptide Science 2011*, in press.
  - 50) L. Buchen. *Nature*, **476**, 387–390 (2011).

しもひがし やすゆき  
九州大学大学院理学研究院化学部門  
九州大学リスクサイエンス研究センター  
shimo@chem.kyushu-univ.jp

## 平成23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、大変光栄に存じます。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々に改めて御礼申し上げます。私は大阪大学大学院理学研究科に入学し、大阪大学蛋白質研究所にて相本三郎教授のご指導のもとペプチド化学分野における研究を開始しました。膜タンパク質の化学合成法の開発に従事し、学位を取得の後、米国ニューヨーク州ストーニーブルック大学生化学/細胞生物学研究科構造生物学センターにおいてスティーブンO. スミス教授のもと博士研究員として膜タンパク質の構造解析の研究を始めました。二年間の留学の後、大阪大学蛋白質研究所、相本三郎教授の研究室にて今日まで助教としてお世話になっております。本稿では受賞の対象となりました「ペプチド化学を基盤とした膜タンパク質の機能解析」について概説させていただき、さらに今後の研究についても述べさせていただきます。



佐藤 毅

### 膜タンパク質の化学合成法の開発<sup>1,2)</sup>

膜タンパク質の機能、構造解析研究における深刻な問題点は、発現、精製、脂質二重膜への挿入、結晶化（結晶解析を行うのであれば）等の解析に至る各段階において、可溶性球状タンパク質に関して見出されてきた従来の実験手法が、多くの場合、通用しないところにありました。現在においても、この問題は膜タンパク質の機能をその構造を基盤として理解することを目指す研究者にとっては大きな壁として存在します。

自らの研究は、これまでの膜タンパク質研究手法にペプチド合成化学を取り入れ、合成膜タンパク質を用いることによって、その本来の機能を探ることを目指すものであり、その最初のステップが膜タンパク質の化学合成法の開発でした。私は、膜貫通ペプチドの精製条件の探索から取りかかり、高濃度のギ酸を溶離液として用いる逆相 HPLC による効率的単離条件を見出し、また、ライゲーション法の一つであるチオエステル法を用いることによって複数の膜貫通部位を有するタンパク質の化学合成に成功しました（図1）。一方で、水溶液中において反応を行うことができるライゲーション法であるネイティブケミカルライゲーション（NCL）法を用いることによる膜タンパク質合

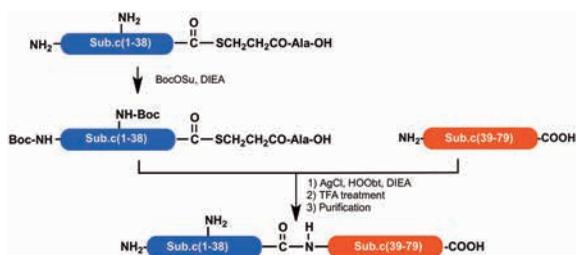


図1 チオエステル法による2回膜貫通型タンパク質、F1F0 ATP合成酵素サブユニットcの合成スキーム

成技術を開発すべく、膜貫通部位を有する合成ブロックの可溶性に関して詳細な検討を行いました。この実験では、膜貫通部位を含んだ合成ブロックの水系緩衝液に対する溶解性を向上させるArg-tagの開発、界面活性剤の使用条件の最適化を達成することによって、NCL法を用いてGタンパク質共役型受容体のC末端部位の化学合成に成功しました。

### アミロイドβ前駆体タンパク質の膜貫通—膜近傍部位の構造解析とその膜中におけるプロセッシング機構の解明<sup>3)</sup>

アルツハイマー病の原因分子であるアミロイドβ(Aβ)タンパク質は、1回膜貫通型タンパク質であるアミロイドβ前駆体タンパク質（APP）がその膜貫通部位において、γ-セクレターゼによるプロセッシングを受けることによって生成します。この膜貫通部位配列におけるプロセッシングという特異な現象に関して、詳細な分子機構は知られていませんでした。そこで、私は、プロセッシングが生じるAPPの膜貫通—膜近傍部位の解析を通して、この分子機構の解明に向けた研究を行うこととしました。APPの膜貫通—膜近傍部位の化学合成は、標準的な手法では困難でしたが、ペプチド鎖の伸長過程においては擬似プロリン誘導体を用い、さらに精製には自らが見出した逆相 HPLC による精製条件<sup>1)</sup>を用いることによって、APP膜貫通—膜近傍部位配列のペプチドの調製を可能としました。部位特異的安定同位体標識を導入したAPP膜貫通—膜近傍部位配列ペプチドに関して、固体 NMR を用いることにより、脂質二重膜中での構造解析を行った結果、この配列は膜貫通部位におけるGxxxG配列を介して二量体を形成することを明らかとしました。また細胞質内膜近傍部位はランダムな構造を有することもわかり、膜貫通部位におけるα-ヘリックスから膜近傍部位におけるランダム構造へのstructural transitionが生じていることを明らかにしました。さらに共同研究者による細胞生物学的実験では、このGxxxG配列のGlyをLeuに変異させ、膜貫通部位における会合面を変化させるとAβタンパク質は放出されなくなることがわかりました。一方、膜近傍部位における上記structural transitionはプロセッシングが生じるために必須であることが明らかとなりました。これらの実験結果をもとに、APPの膜貫通部位におけるプロセッシングという現象に関して、膜貫通ヘリックスがほどけながら（helix unwindingを伴いながら）生じるというモデル「progressive cleavage model」を提唱しました（図2）。

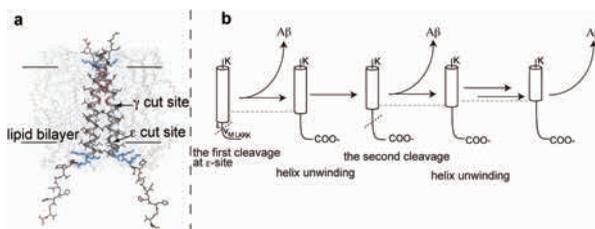


図2 APP膜貫通—細胞質内膜近傍部位の構造（a）とAPPの生体膜中におけるプロセッシングのモデル（b）

## 上皮増殖因子受容体 (EGFR) 膜貫通 - 膜近傍部位の構造解析と受容体活性制御機構の解明<sup>4)</sup>

EGFR/ErbB1/HER1は細胞の増殖や分化に関与し、がんとの関連が深い受容体型チロシンキナーゼです。この受容体に関しては、数多くの研究報告が存在しますが、リガンドの結合に伴った細胞外領域の構造変化が膜貫通 - 膜近傍部位のどのような構造変化を介して細胞質内での機能発現にいたるのか、その作用機序は未だ明らかにされていません。

我々は構造生物学においてブラックボックス的な存在であった受容体型チロシンキナーゼの膜貫通 - 膜近傍部位の構造解析を行うことから、EGFRの活性制御機構における当該部位の機能を明らかにすべく研究を行うこととしました。EGFRの膜貫通 - 膜近傍部位配列ペプチドを化学合成し、その脂質二重膜中における構造や物性の解析を固体 NMR や蛍光測定により行いました。その結果、細胞質内膜近傍部位はランダムな構造を有し、脂質二重膜と結合することがわかりました。また、脂質二重膜中にホスファチジルイノシトール、PI(4,5)P<sub>2</sub>を添加すると、脂質二重膜上の膜近傍部位が結合している部分にPI(4,5)P<sub>2</sub>が集積することも明らかとなりました。さらに、当該膜近傍部位にはカルシウム/カルモジュリンが結合し、その結合に伴って、膜近傍部位は膜から解離することを明らかとなりました。これらの解析結果に基づいて、EGFRの細胞質内膜近傍部位、PI(4,5)P<sub>2</sub>、カルシウム/カルモジュリンの相互作用によって演出されるEGFR活性制御の分子機構に関するモデルを提唱しました(図3)。

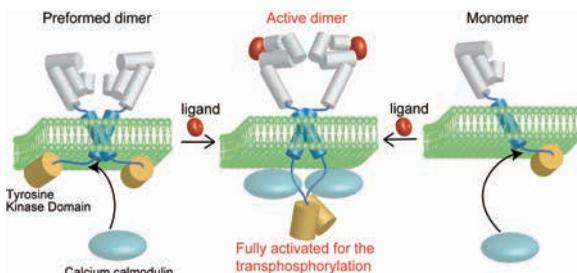


図3 EGFRの活性制御モデル

### これからの研究

今後は、生体膜環境において受容体型チロシンキナーゼが中心となって織りなす情報伝達の分子機構の解明研究を行っていきたいと考えています。受容体型チロシンキナーゼの構造生物学的研究は、これまで細胞外領域や細胞質内領域の結晶構造をもとに行われてきました。今後の研究においては、生体膜、または脂質二重膜中において機能を有する形での解析が必須であり、細胞外領域でのリガンド結合に伴った膜貫通 - 膜近傍部位の構造変化を原子レベルで捉えることこそが、受容体の生体膜上における機能発現機構解明の鍵となり、新たな事象の発見や新薬開発への第一歩となると考えています。そのために、ライゲーションを用いることによって、全長受容体を半合成 (semi-synthesis) し、脂質二重膜上において機能を構築、リガンド結合に伴った膜貫通 - 膜近傍部位の構造変化を固体 NMR 等の手法によって捉えることを目標とし

た研究を行うこととしました。本研究では、機能を重要視する細胞外領域、細胞質内領域は分子生物学的に調製し、構造解析の対象とする膜貫通 - 膜近傍部位は各種解析実験手法に応じて合成化学的、分子生物学的的手法を使い分けることによって標識を導入した合成ブロックを調製、それらを縮合することによって解析試料を調製します。つまり、これまでの構造生物学的研究において語られることが稀であった受容体の膜貫通 - 膜近傍部位の構造や挙動がスペクトルを介して「可視化」することが可能となります。さらに本研究の最終段階では、受容体の活性を制御する機能性分子のデザインを行おうと考えています。受容体型チロシンキナーゼの機能制御を可能とする分子の創製は、がん等の疾患の分子標的薬の設計に貢献します。最近の受容体型チロシンキナーゼの機能解析研究において、細胞質内膜近傍部位の機能的重要性が明らかとなってきていますが、細胞膜との相互作用を含めたその分子機構は知られていませんでした。一方、これまでの自らの研究によって、当該部位と生体膜の結合と解離が受容体活性制御の鍵となる構造変化であることが分かってきました。また、半合成受容体を用いた研究では、リガンド結合に伴う受容体の構造変化に加えて、膜貫通部位や膜近傍部位と様々な機能性脂質との特異的な相互作用様式の詳細が明らかになると考えています。そこで、細胞質内膜近傍部位と生体膜との相互作用を制御する分子のデザインを当面の目標とし、細胞生物学的研究の専門家と連携し、研究を行っていきたいと考えています。

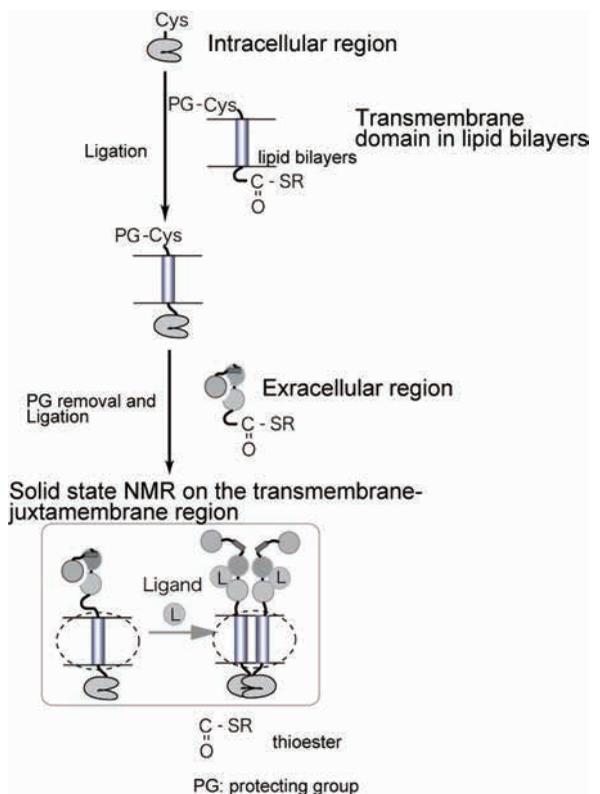


図4 半合成受容体を用いた受容体型チロシンキナーゼの機能解析研究の概念図

## おわりに

最後になりましたが、これらの研究を行うにあたりご指導いただいた大阪大学蛋白質研究所相本三郎教授に心より感謝申し上げます。また、合成研究全般において多くの助言をしてくださった赤路健一教授（京都薬科大学）、川上徹准教授（大阪大学蛋白質研究所）、構造生物学的研究を始めるきっかけを与えてくださったスティーブンO. スミス教授（ストーニブルック大学）に御礼を申し上げます。

## 参考文献

- 1) Sato, T. *et al. J. Pept. Sci.* **8**, 172-180 (2002)
- 2) Sato, T. *et al. J. Pept. Sci.* **11**, 410-416 (2005)
- 3) Sato, T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 1421-1426 (2009)
- 4) Sato, T. *et al. Biochemistry* **45**, 12704-12714 (2006)

さとう たけし  
大阪大学蛋白質研究所  
takeshi@protein.osaka-u.ac.jp

## 平成23年度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、大変光栄に存じます。学会長の相本三郎先生をはじめ、選考委員ならびに関連の諸先生に心より御礼申し上げます。本稿では、受賞研究である「膜透過性ペプチドの細胞内移行メカニズムの解明」について概説させていただきます。



中瀬 生彦

### 1. はじめに

近年、細胞内へ高効率に移行可能な10残基程度の様々なアルギニンに富むペプチド（アルギニンペプチド）が見出されています。移行性に優れた代表的なペプチドとして、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）のTatタンパク質由来のペプチド [HIV-1 Tat(48-60)] や、8から12残基程度のポリアルギニンペプチド等が知られています<sup>1-3)</sup>。これらのペプチドは、cell-penetrating peptide (CPP), protein transduction domain (PTD) と呼ばれており、細胞培養液中にペプチドを添加すると、数十分程度で細胞内へ効率的に移行する性質をもちます。これらのペプチドの高い移行性を利用することで、様々な分子を細胞内へ効率的に送達させることが可能となります。例えば、それ自体では移行困難なタンパク質やペプチド、核酸や各種ポリマー、磁性粒子といった巨大分子と、アルギニンペプチドを化学的に架橋することや、遺伝子工学的に結合させることによって、送達させたい機能性分子を細胞内へ効率的に導入させることができます<sup>1-3)</sup>。これらのことから、アルギニンペプチドを用いた細胞内導入の更なる応用が考えられ、基礎研究から医療応用に至る幅広い分野での利用及び技術の発展が大きく期

待されています。しかし、親水性・塩基性の高いアルギニンペプチドがどの様に細胞内へ移行するのかといったメカニズムは未解明な部分が多く、私はこれらを明らかにする為に研究を続けてきました。以下、これまでに見出したアルギニンペプチドの移行メカニズムについて説明します。

### 2. アルギニンクラスターの細胞内移行への重要性

アルギニンペプチドの細胞移行性に関しては、最初にTatペプチドに関して報告されたために、この現象は当初Tatペプチドに固有の現象と考えられていました。しかし、著者の所属研究室において、この現象がTatペプチドに限らず、アルギニンのオリゴマーを含めたアルギニンに富む塩基性ペプチドに広く当てはまる現象であることが明らかとなりました。私は、この現象が直鎖のペプチドにのみ当てはまるものではなく、アルギニンが細胞膜上でクラスター状の構造を取ることが重要なのではないかと考え、種々の分岐型のアルギニンペプチドの合成を通してこれを証明しました<sup>4)</sup>。その結果において、分岐型ペプチド配列中のアルギニン残基数やアルギニンのクラスター密度の違いによって、細胞内移行効率や、後に詳しく述べる細胞膜集積における糖鎖認識が異なることが明らかになりました<sup>4,5)</sup>。これらの知見によって、アルギニンあるいはグアニジノ基を有する種々のペプチド・非ペプチド型の細胞移行性キャリア分子のデザインが大きく柔軟性をもつことが理解されました。

### 3. アルギニンペプチドの糖鎖依存的な細胞内移行とマクロピノサイトーシス誘導

膜透過性ペプチドの細胞内移行には、クラスリン依存的なエンドサイトーシスの関与が指摘されていました。その一方で、私はアルギニンペプチドの細胞内移行経路として、新たにマクロピノサイトーシスによる細胞取り込みが重要な経路の一つであることを見出しています<sup>5-7)</sup>。マクロピノサイトーシスは、細胞内シグナル伝達により低分子量Gタンパク質のRacが活性化されることで、その結果、アクチン重合によるラメリポディア（葉状仮足）の形成が伴った、特徴的な膜形態を呈するアクチン依存性の細胞内取り込み経路です。私は、アルギニンペプチドが、細胞膜に発現しているプロテオグリカン依存的に細胞表面に集積することがきっかけで細胞内シグナル伝達が誘起され、最終的にマクロピノサイトーシスが生じ、ペプチドが効率的に細胞内へ取り込まれることを明らかにしました<sup>5-7)</sup>（図1）。様々なアルギニンペプチドの細胞内移行効率に関する研究では、マクロピノサイトーシスの誘導能が高いフロックハウスウイルス由来のアルギニンペプチドFHV coat (35-49) が高効率に細胞内へ移行することが示されたことから<sup>7)</sup>（図2）、アルギニンペプチドによるマクロピノサイトーシスの誘起が細胞内移行効率に大きく影響することが理解できます。またペプチドの硫酸化多糖を介した細胞膜への効率的な集積において、直鎖型及び分岐型を含めたアルギニンペプチドの種類により、ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸といった硫酸化多糖への依存性が異なる結果も得られました<sup>5)</sup>。しかし、ペプチドの細胞膜での集積から

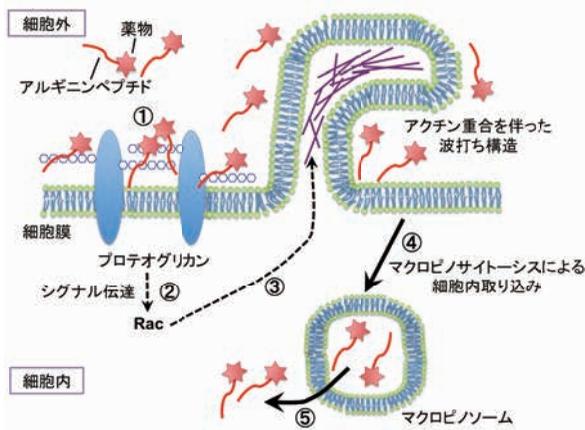
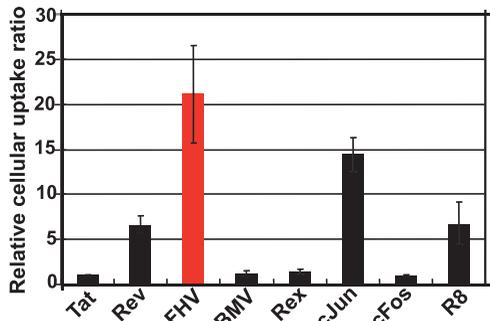


図1 アルギニンペプチドによるマクロピノサイトーシス誘導と細胞内移行。①プロテオグリカンの糖鎖依存的なペプチドの細胞膜への集積、②Racの活性化による③アクチン重合の誘導と細胞膜の波打ち構造の形成、④膜融合とマクロピノサイトーシスによる細胞内への取り込み、⑤サイトゾルへの移行。破線矢印(②、③)は細胞内シグナル伝達、実線矢印(④、⑤)はペプチドの細胞内移行を示す。

(a)

ペプチド	アミノ酸配列
HIV-1 Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ
HIV-1 Rev (34-50)	TRQARRNRRRRWRERQR
FHV coat (35-49)	RRRRNRTRRRRRVR
BMV Gag (7-25)	KMTRAQRRAAARRNRWTAR
HTLV-II Rex (4-16)	TRRQRTRRRRRNR
Human cJun (252-279)	RIKAERKRMNRNIAASKSRKKLERIAR
Human cFos (139-164)	KRRIRRRERNKMAAAKSRNRRRELTDT
R8	RRRRRRRR

(b)



(c)

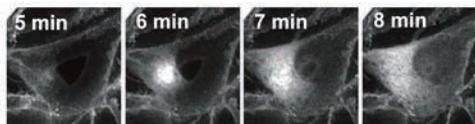


図2 (a, b) 様々なアルギニンペプチド (a) とそれぞれの細胞内移行 (b)。蛍光標識 (Alexa488) した各ペプチド (5 μM) を CHO-K1 細胞に取り込ませた後 (30 分)、フローサイトメーターで細胞内の蛍光強度を測定した。(c) 共焦点顕微鏡による FHV ペプチド (10 μM) の細胞内移行観察。ペプチドの効率的なサイトゾルへの流入が観察される。

のようにしてシグナル伝達が誘起されるのかは未だに明らかになっておらず、今後も詳細な検討が必要です。

#### 4. アルギニンペプチドの細胞膜透過

アルギニンペプチドが、移行過程のどこで細胞膜を通過しサイトゾルへ移行するかは現在も議論されています。エンドソームやマクロピノソームからの脱出や、直接的に形質膜を通過していることが考えられています。未だに明確になっていません。私のこれまでの研究結果では、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いた実験において、上記 FHV ペプチドの細胞膜通過効率がエンドサイトーシスやマクロピノサイトーシス阻害剤によって低下することを明らかにしました<sup>7)</sup>。しかし、他の実験ではエンドサイトーシスが抑制される低温条件下において (HeLa 細胞を利用)、R8 ペプチドが形質膜を通過してサイトゾルに移行する様子も観察されます<sup>6)</sup>。これらの結果から、ペプチドの膜集積及びマクロピノサイトーシスを含めた移行経路の過程で、様々な箇所からペプチドが細胞膜を通過している可能性が考えられますが、ペプチドの種類や濃度によっても膜通過性が変わることから、膜通過するためのドライビングフォースが何であるか、膜を通過する経路を決める大切なペプチド及び細胞の要素は何かを理解しなければいけません。しかしながら、細胞膜にペプチドを効率的に集積させることは膜透過効率を上昇させることに非常に重要であると考えられます。この観点に基づき、細胞膜にペプチドを効率的に集積させるために、疎水性配列 (Pas, アミノ酸配列: FFLIPKG)<sup>9)</sup> や、アシル基<sup>10)</sup> をアルギニンペプチドに付加することで、ペプチドの細胞内移行量を著しく高めることが可能となりました。これらの修飾型アルギニンペプチドは細胞内移行において細胞毒性はほとんど認められません。

また、アルギニンペプチドの細胞膜通過効率は、血清成分の存在によって影響を受けることも明らかにしました。細胞培養液中において、アルギニンペプチドが血清成分と強く相互作用することが示されており、この相互作用がペプチドの細胞内移行効率に大きな影響をもたらすことも分かっています<sup>7,8)</sup>。血清を含有していない培地を用いた場合、アルギニンペプチドの細胞内移行効率が上昇することから、血清成分と相互作用することで、ペプチドの細胞膜への集積性と細胞内への移行性及び膜透過性に影響を与えていることが考えられます。

#### 5. CXCR 4 を介したドデカアルギニンペプチドの細胞内移行

最近では、ドデカアルギニン (R12) ペプチドの効率的な細胞内移行には、ケモカインレセプターの CXCR4 が寄与していることを明らかにしました (論文準備中)。手法として、光架橋可能なリンカーをアルギニンペプチドに導入し、このペプチドの細胞内移行における相互作用分子を光照射で架橋した後、それらの回収及び分子量測定による同定を行いました。その結果、R12 ペプチドの移行過程で myosin-9 と相互作用することを確認しました。Myosin-9 は、CXCR4 の細胞内移行において寄与していることが示されています。そこで CXCR4 と R12 ペプチドの細胞膜上での相互作用についてウエスタンブロット等で調べた結果、確かに R12 ペプチドと CXCR4 が結合することが示され

ました。

R12ペプチドの細胞内移行過程におけるCXCR4の関与について、siRNAでCXCR4の発現を抑制した細胞におけるR12ペプチドの細胞内移行を確認した結果、発現抑制によってR12ペプチドの移行量が30%程度減少することが明らかとなりました。また、CXCR4の特異的なアンタゴニストであるFC131はR12の細胞内移行を濃度依存的に抑制しました。一方で、他のアルギニンペプチドであるTatやR8の場合は、CXCR4のsiRNAで処理した場合においても、無処理の場合とペプチドの細胞内移行量への変化はほとんど認められませんでした。これらの結果は、アルギニンペプチドの受容体として初めての同定例であり、またアルギニンペプチドの種類によって受容体依存性が異なるといった非常に興味深い知見です。

## 6. 終わりに

このように、アルギニンペプチドの細胞内移行には細胞膜におけるプロテオグリカンを介したペプチドの効率的な集積及び、そこからシグナル伝達によるマクロピノサイトーシス誘導がペプチドの効率的細胞内移行に重要であることが本研究結果より明らかになりました。しかし、アルギニンペプチドの細胞内移行メカニズムで未だに明確にされていない部分は多く、特に親水性の高いペプチドが如何にして細胞膜を効率的に通過するのか詳細な解明が必要です。膜透過性ペプチドの移行機序の解明は、今後の更なる高機能な薬物送達キャリアの開発のための基礎的情報になるのみならず、ケミカルバイオロジー的な観点からも新たな細胞機能の発見に繋がるといった有用な知見になると考えられます。

最後になりますが、私が大学院生の頃から本研究をご指導頂いております二木史朗先生（京都大学化学研究所）に心より感謝申し上げます。また、これらの研究を行うためにご協力頂いた多くの共同研究者の方に御礼申し上げます。これからも更なる研究の発展のために精一杯努力し、研鑽を積み上げたいと強く考えております。今後ともご指導、ご鞭撻のほど、宜しくお願い申し上げます。

## 参考文献

- 1) Futaki, S. Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers* **84**, 241-249 (2006).
- 2) Futaki, S., Nakase, I., Tadokoro, A., Takeuchi, T., Jones, A.T. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 784-787 (2007).
- 3) Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., Futaki, S. Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 598-607 (2008).
- 4) Futaki, S., Nakase, I., Suzuki, T., Youjun, Z., Sugiura, Y. Translocation of branched-chain arginine peptides through cell membranes: flexibility in the spatial disposition of positive charges in membrane-permeable peptides. *Biochemistry* **41**, 7925-7930 (2002).
- 5) Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., Futaki, S. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* **46**, 492-501 (2007).
- 6) Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., Jones, A.T., Sugiura, Y., Futaki, S. Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.* **10**, 1011-1022 (2004).
- 7) Nakase, I., Hirose, H., Tanaka, G., Tadokoro, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T., Futaki, S. Cell-surface accumulation of flock house virus-derived peptide leads to efficient internalization via macropinocytosis. *Mol. Ther.* **17**, 1868-1876 (2009).
- 8) Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T., Futaki, S. Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug. Chem.* **19**, 656-664 (2008).
- 9) Takayama, K., Nakase, I., Michiue, H., Takeuchi, T., Tomizawa, K., Matsui, H., Futaki, S. Enhanced intracellular delivery using arginine-rich peptides by the addition of penetration accelerating sequences (Pas). *J. Control. Release* **138**, 128-133 (2009).
- 10) Katayama, S., Hirose, H., Takayama, K., Nakase, I., Futaki, S. Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *J. Control. Release* **149**, 29-35 (2011).

なかせ いくひこ  
京都大学化学研究所生体機能設計化学  
nakase@scl.kyoto-u.ac.jp

## 平成23年度 Excellent Stone Awardを受賞して

2011年9月27日から29日にかけて札幌コンベンションセンターで開催された第48回ペプチド討論会において若手口頭発表という大変貴重な機会を与えて頂きました実行委員会をはじめ、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。私は大学学部4年生の頃に初めてペプチド討論会に参加しましたが、口頭発表の舞台に大きな憧れを抱いたことを記憶しています。この度、本発表の機会に恵まれ、Excellent Stone Awardを受賞できたことは私にとって生涯記憶に残るであろう貴重な経験となりました。しかし、同時に、“Stone”という語を目にし、早く“Stone”ではなく“Scientist”として認められるよう日々努力し続けたいと感じています。それでは、今回受賞の対象となりました「Formation of Functionalized Nanowires Using



坂井 公紀

「Structure-Controllable Amyloid Peptide」の研究について簡単にご紹介します。

機能性ナノワイヤーはその一次元性構造に由来するユニークな特性により、ナノテクノロジーへの応用面において重要な役割を担っています。例えば、スイッチデバイスとしての集積化や特異な電子特性、さらにはドラッグデリバリーや細胞足場といった電子デバイスおよびバイオナノテクノロジーの両面においての用途が期待されています<sup>1-3)</sup>。これらの理由から、多様な機能性ナノワイヤーを効率的に形成させる手法の開発は非常に重要です。この点において自己組織化能をもつビルディングブロックを用いて機能化ナノワイヤーを自発的に形成させるボトムアップ法は有用なアプローチであり、特に、化学合成・修飾を容易に行うことができるペプチドは魅力的なビルディングブロックです<sup>3,4)</sup>。アミロイドペプチドは、自己組織化により幅数 nm、長さ数  $\mu\text{m}$  の安定で剛直なワイヤー状構造（アミロイド線維）を形成することから、修飾されたアミロイドペプチドは機能化ナノワイヤー形成のためのビルディングブロックとして期待されています<sup>5)</sup>。

しかしながら、自己組織化は分子間相互作用の微妙なバランス上に成り立つため、一般的に、アミロイドペプチドに修飾された機能団はナノワイヤー構造の著しい不均一化や形成自体の阻害をもたらします。このことから、自己組織化を効果的に制御する手法は、機能化ナノワイヤーを効果的に形成させる上で不可欠です。坂口研究室ではこれまでに、アミロイドペプチドのN末端に3残基のアミノ酸からなる制御ユニットを付加したStructure-Controllable Amyloid Peptide (SCAP) を開発し、付加するアミノ酸ユニットの性質

に応じて線維構造および形成能を制御可能であることを見出だしています（図1）<sup>6)</sup>。本研究では異なるアミノ酸ユニットをもつSCAPをヘテロ混合して自己組織化させる混合SCAP法に基づいた非常に効率的な機能化ナノワイヤー形成を実施しました。

まず、アミロイドペプチドとしてトランスサイレチン由来のTTR (105-115) ペプチドを母体とし、3残基のLysおよびGluを付加したK<sub>3</sub>-TTR、E<sub>3</sub>-TTRをFmoc固相法により化学合成しました。各ペプチドをpH 2の酸性溶液中でインキュベートし、原子間力顕微鏡 (AFM) による線維形成評価を実施しました。その結果、K<sub>3</sub>-TTRは線維を全く形成しないのに対し、E<sub>3</sub>-TTRでは一般的なアミロイド構造をもつ、長さ数  $\mu\text{m}$  程度の線維形成が観察されました。次に、これらSCAPを等モル比で混合した結果、非常に興味深いことに線維形成が著しく促進され、40  $\mu\text{m}$  を大きく超える均質なアミロイド線維が観察されました。また、この長鎖線維はSeeding下でも形成されたことから、核形成非依存的なものであり、線維伸長の停止が抑制されている可能性が示唆されました。これらのことから、混合SCAP法がアミロイド自己組織化を制御する上で非常に有用な手法であることが示されました。

次に、これらの長鎖アミロイド線維を機能化するために、SCAPの末端に機能分子との特異的な結合能を有するプローブ分子を付加したプローブ化SCAP (P-SCAP) を合成しました（図1）。このP-SCAPに対して混合SCAP法を適用することで、自己組織化制御に基づいた機能化ナノワイヤー形成が可能となると期待されます（図2）。プローブを介した機能化は、あらゆる特異的分子を線維形成後に修飾可能なため、

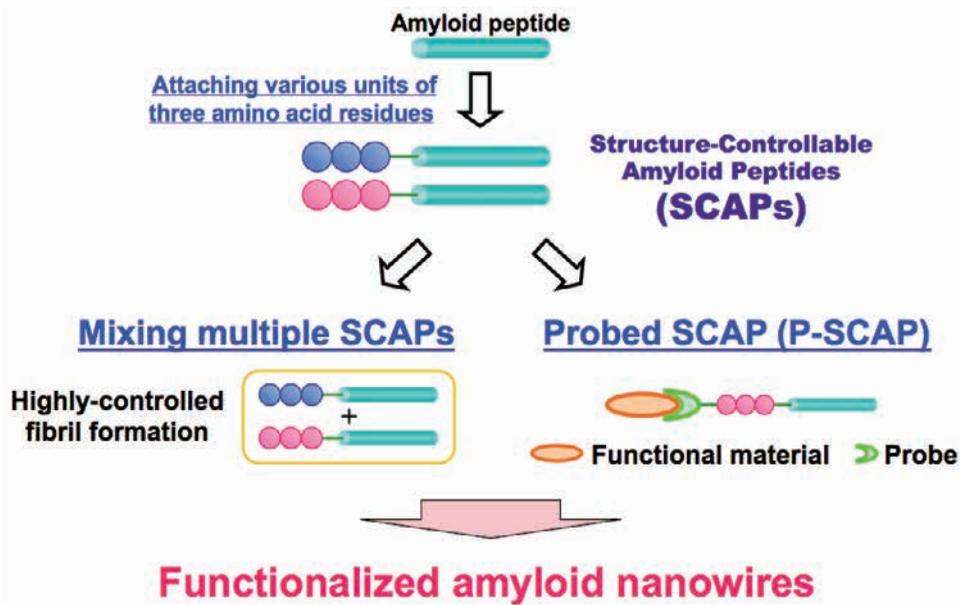


図1 混合SCAP法による自己組織化制御に基づいた機能化ナノワイヤー形成

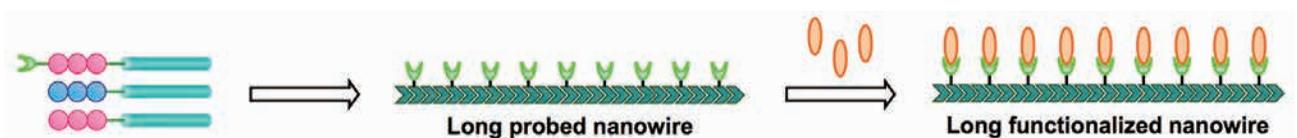


図2 P-SCAPと混合SCAP法によるプローブ化ナノワイヤー形成と機能修飾

アミロイドの多様な機能化という点において有用です。本研究ではジオチン,  $\alpha$ リボ酸, およびマレイミドの3種類のプローブを用いました。これらP-SCAPはいずれも単独では全く線維を形成することができませんでしたが,  $K_3$ -TTRおよび $E_3$ -TTRと混合することで, P-SCAP非存在下と同様の長鎖線維を形成させることができました。また, 様々な混合比における線維形成の有無を調べたところ, P-SCAPが高い割合(～50%)で存在する場合においても線維が形成されることが明らかになりました。これらのことから, 混合SCAP法はプローブ化ナノワイヤー形成の制御にも有用であり, 混合SCAP法を用いることで, あらゆる種類のプローブ化ナノワイヤーを形成可能であることが示されました。これらのプローブ化ナノワイヤーはそれぞれ, アビジン磁気ビーズ・金ナノ粒子・バイオミネラルゼーション活性を有するペプチドといった対応する分子を用いて容易に機能修飾を施すことが可能であり, さらに結合したバイオミネラルゼーションペプチドを介してチタニアなどのナノ結晶を線維上に特異的に形成させることで, 無機ナノワイヤー化することもできました。以上のように我々は, 自己組織化制御に基づき非常に多様な機能化ナノワイヤーを形成させる“混合SCAP法”の開発に成功しました。今後, 混合SCAP法の線維形成メカニズムを解明することにより, 高度に制御されたボトムアップマテリアル創製への展開が期待されます。

最後になりましたが, 本研究は坂口和靖先生のご指導のもと遂行することができました。坂口先生にはこの場をお借りして心より感謝申し上げます。また, 共同研究を引き受けて頂いた物質・材料研究機構(NIMS)の魚崎浩平教授, 増田卓也先生に御礼申し上げます。今回の経験を糧に, 今後も興味ある成果をペプチド討論会の場で発表できるよう, 更なる飛躍を目指して邁進して行きたいと思っております。今後とも宜しくお願い致します。

#### 【参考文献】

- 1) Agarwal, R., and Lieber, C.M., *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Proc.*, **85**, 209-215 (2006).
- 2) Lu, W., and Lieber, C.M., *Nat. Mater.*, **6**, 841-850 (2007).
- 3) Zhang, S., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1171-1178 (2003).
- 4) Aida, T., and Fukushima, T., *Phil. Trans. R. Soc. A*, **365**, 1539-1552 (2007).
- 5) Cherny, I., and Gazit, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 4062-4069 (2008).
- 6) Asanomi, Y., Kobayashi, Y., Sakai, H., Masuda, T., Chen, X., Chuman, Y., Uosaki, K., Sakaguchi, K., *Protein Pept. Lett.*, **17**, 458-463 (2010).

さかい ひろき  
北海道大学大学院理学研究院  
化学部門生物化学研究室  
hiro-saka@mail.sci.hokudai.ac.jp



橋本 知恵



ト部亜里沙

9th Australian Peptide Conference (9th APC) が, 去る2011年10月16～20日, オーストラリア・ハミルトン島のHamilton Island Resortにて開催されました。本シンポジウムのChairは, Edouard Nice 先生 (Monash University) と Mibel Aguilar 先生 (Monash University) が務められました。シンポジウムの開催地であるハミルトン島は, クイーンズランド州に属し世界遺産であるグレートバリアリーフに囲まれた世界的に有名なリゾート地です。また, 世界で最も美しいと言われるホワイトヘブンビーチや, カップルで見ると幸せになれると言われているハート形サンゴ礁のハートリーフへ最もアクセスが便利のため多くの観光客がこの島を訪れます。一年の平均気温は27.4℃であり, 常夏なので年中泳げるというセールスポイントに釣られ, かなり楽しみに島へと向かいました……。

シンポジウムは, 3rd Modern Solid Phase Peptide SynthesisとAustralian Chapter of the Controlled Release Societyとの共同開催であったため, アジア・オセアニアを初め多くの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) Frontiers in Peptide Discovery and Design 2) Chemical Biology 3) GPCRs 4) Discovery Platforms 5) Proteomics: Technology & Discovery 6) Peptide Discovery 7) Nanotechnology & Drug Delivery 8) Peptide Biology 9) Rapid Fire Hot Topics 10) Bioactive Peptides 11) Peptide Design 12) Towards the Clinicの12テーマに分かれており, 途中 Morning Teaやランチを挟みながら8:30から17:30まで盛況に発表が行われました。

以下は, 2人でシンポジウムの印象について振り返った時の会話です。

橋本 「いや～, 天気悪かったね～」

ト部 「ほんとですよ。ホテルの人もめったに雨降らないって言っていたのに……。」

橋本 「悪天候のせいで海にはほとんど入れなかったね。玉村先生だけは最終日にプール入られていたね(苦笑)。羨ましかったわ～」

ト部 「私たちはその間ロビーで待ちぼうけでしたね(笑)。私がAPCで1番印象に残ったのはワインを飲みながらのポスターセッションですね。ハミルトン島は遊びに行くところが全然なかったので, 夜のポスターセッションにはほぼ全員が参加していましたよね。有名な先生方ともお話することが出来て良かったです。」

橋本 「APCは参加人数がそんなに多くないのに, 有名

な先生方が多かったもんね。びっくりしたよ。」

ト部「そうでしたよね。ポスター発表では3人の外国人の先生に質問していただきましたが、英語が全然出てなくて・・・やさしい先生方だったので私のつたない英語を理解しようとして下さって助かりました。」

橋本「うん、みんな幼稚園児を扱うように優しくかったよね（苦笑）。清華大学のYan-mei Li先生に、すごくおもしろい研究をしているわねと言って頂けてホンマに嬉しかった！」

ト部「私もBill Hancock先生や伊東先生におもしろい研究だねと言って頂けてとても嬉しかったです。研究に対するモチベーションが上がりました。」

橋本「伊東先生べた褒めやったもんね。私は、あのPhil Dawson先生に質問して頂けて感激やったけど、緊張して思うように話せなかった〜。」

ト部「でも最終日のディナーの時にちゃんと説明していましたよね？」

橋本「うん、このまま帰ったら悔いが残ると思ったからね。あと個人的にはGPCRやワクチン関連の演題がすごく興味深かった。特に、CXCR4の立体構造解析を行ったBeili Wu先生を見て、すごく若かったのには驚いた！」

ト部「同じ女性として私たちが頑張ろう、って勇気をもらいましたよね。そういえば私のポスターの隣が玉

村先生のポスターだったのですが、珍しくずっとポスター前に立って説明していらっしやいましたよ。ワイン飲みながら（笑）。」

橋本「先生めっちゃ飲んでたよね！先生のポスター前にワインバーがあったからずっと立ってたんじゃない（笑）？」

ト部「確かに（笑）!!でも私は玉村先生が隣にいて少し心強かったので良かったです。」

橋本「初めての国際学会やもんね〜。学術的な話も良かったけど、リゾート地での学会のせいか有名な先生がくれた話をしてくださったのも面白かったな。Dawson先生は音感がゼロで、自分の子供に子守唄を歌ったら泣かれてしまったとか（笑）。」

ト部「そんなことおっしゃってたんですか（笑）?! そうですね、James Tam先生もカジュアルな感じで話しかけて下さいましたよね。」

橋本「そう、玉村先生はうちの学生がTam先生に気に入られたって言ってる（笑）。」

ト部「そう言う先生は毎晩酔っ払い続けてましたけどね（苦笑）。」

橋本「まあね（苦笑）。でも、本当に貴重な経験ができて有意義な学会やったね。」

ト部「はい。橋本さんはホントに貴重な経験をしましたもんね?!」



ホテルからの眺め、左に見える変わった形の屋根が学会会場



学会会場



左からホテルのベランダに来るキバタン、朝食のパンを狙うロリキート（野生のインコ）、マリーナにて鳥のパン争奪戦

橋本「ん?!」

卜部「野鳥に糞を落とされて・・・。」

橋本「あ～、あの憎きキバタンね?! 日本でもこんな経験したことないのに・・・。」

卜部「いやいや、運がついたってことでよかったですか?!」

橋本「う～ん、そうなんかなあ・・・。」

卜部「まあ、オチもついたらそろそろ・・・。」

橋本「えっ、うそ?!これがオチ?! そんな～(泣)!!」

卜部「ふふふっ (^u^)。」

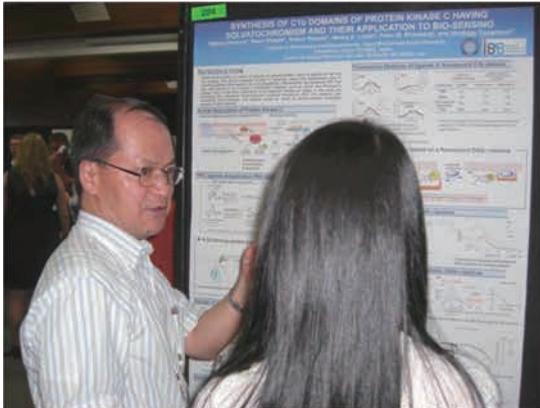
この会話から、私たちが9th APCをいかに満喫してきたかお分かりいただけましたでしょうか。あいにくの悪天候ながらも、著名な先生方とお話することができ、非常に充実した学会でした。我々の研究に興味を抱いて下さった方々のおかげで研究に対するモチベーションが向上し、日々頑張ろうと思うことが出来ました。

末筆ではございますが、今回の9th APC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

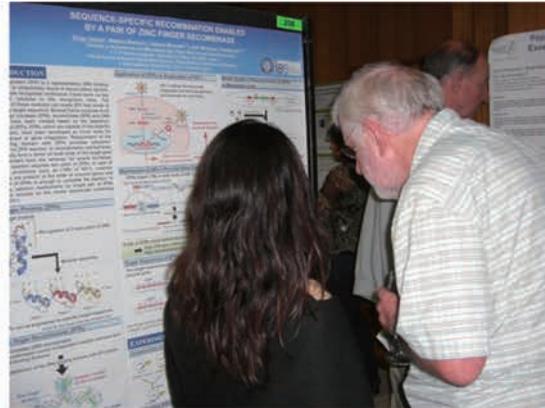
及び選考委員会の先生方、そしてこのような形で9th APCについて紹介する機会を与えて下さったペプチドニューズレター編集委員の先生方に感謝申し上げます。

はしもと ちえ  
東京医科歯科大学 生命情報科学教育部  
c.hashimoto.bio@tmd.ac.jp

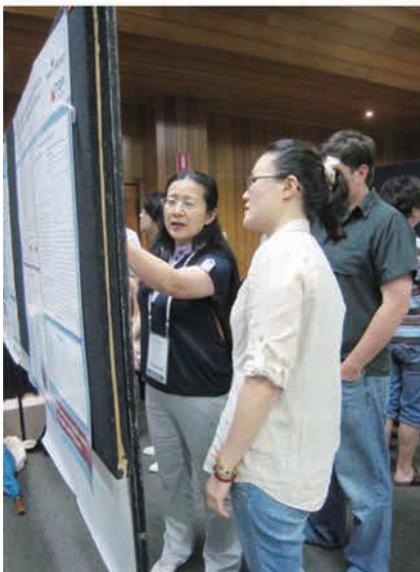
うらべ ありさ  
東京医科歯科大学 医歯学総合研究科  
urabe.mr@tmd.ac.jp



珍しくポスター発表を真面目にしている玉村先生



ポスター発表(卜部) Bill Hancock 先生と



ポスター発表(橋本) Yanmei Li 先生、  
後ろにPhil Dawson 先生



Conference dinnerにて-右から伊東先生、丸岡氏、久保先生、畠中氏(伊東研)、  
向井先生と



ChairのEdouard Nice 先生と



ChairのMibel Aguilar 先生, 向井先生と



Ben Dunn 先生と



Phil Dawson 先生と

## 第15回ペプチドフォーラム

「地球生命にとってのペプチドの重要性：  
ペプチドーム、クリプタイドからペプチド医薬食品への  
考察」

近年薬剤開発において、その主要ターゲットが小分子化合物からペプチドへと大きく潮流が変化し、「第二のペプチド創薬ブーム」が起っている。また創薬ばかりでなく機能的食品や化粧品等へのペプチドの適用もブームを迎えている。しかし現実の研究開発の現場では、ペプチドの存在意義や生理活性の多様性等に関する正しい認識が著しく不足しているのが現状である。そこで本ペプチドフォーラムは、ペプチド・タンパク質の機能を研究し、薬剤や機能的食品あるいは化粧品の開発に携わる研究者や、ライフサイエンス研究の報道に関わるジャーナリストをも対象に、ペプチドとタンパク質の相違点、それに起因する研究アプローチの違いについて啓発活動を行うことを目的とする。

日時：2012年3月16日（金）13：50～19：00

場所：長浜バイオ大学命江館3階中講義室2  
〒526-0829 滋賀県長浜市田村町1266番地

主催：日本ペプチド学会

共催：長浜バイオ大学、長浜バイオ大学産官学共同研究・事業開発センター、長浜バイオ大学ペプチド科学研究室

協賛：日本薬学会、日本化学会、日本農芸化学会、日

本生化学会、日本内分泌学会、  
日本病態プロテアーゼ学会  
後援：日本ケミカルバイオロジー学会、ペプチド機能  
研究会  
参加費：無料

プログラム：

13：50－ 挨拶：木曾良明（長浜バイオ大学）

14：00－ 向井秀仁（長浜バイオ大学）

「クリプタイド：その存在意義と産業的応用」

14：40－ 吉川正明（生産開発科学研究所）

「タンパク質に潜在する生理活性ペプチド配列の多様性とその利用」

15：40－ 南野直人（国立循環器病センター研究所）

「ペプチドーム解析とペプチドの潜在能力の探索」

16：40－ 木曾良明（長浜バイオ大学）

「ペプチド化学を基盤とする創薬」

17：20－ 終わりに：向井秀仁（長浜バイオ大学）

17：30－ ミキサー（無料）

世話人：長浜バイオ大学ペプチド科学研究室  
木曾良明、向井秀仁

連絡先：〒526-0829 滋賀県長浜市田村町1266番地

長浜バイオ大学ペプチド科学研究室

Tel.: 0749-64-8113 Fax: 0749-64-8140

E mail: h\_mukai@nagahama-i-bio.ac.jp

URL: <http://www1.nagahama-i-bio.ac.jp/peptide/20120316peptideforum.html>

