



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.84

2012年 4 月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

生体内カリウムイオンの蛍光イメージングを 目指したペプチドオリゴヌクレオチド コンジュゲートプローブの開発

1. はじめに

カリウムイオン (K^+) は人の体重の約0.4%を占めており、生体内で重要な役割を担っている。例えば、筋収縮、心拍、神経伝播、腎機能などである。従って生体内の K^+ 濃度の異常な変動は様々な疾患と関連しており、アルコール依存症、拒食症、過食症、心臓疾患、糖尿病、AIDS、癌等のマーカーに利用されている¹⁾。このことから生体内 K^+ のモニタリングは重要である。しかしながら、生体内では、 K^+ と同時にナトリウムイオン (Na^+) が共存して働いている。例えば、神経細胞や筋細胞においては、細胞内外の K^+ と Na^+ と濃度差によって膜電位が保たれており、これらの濃度変化によって活動電位が生ずる。特に細胞間においては145 mMの Na^+ 下で数 mMの K^+ の変化が起こっており、これをモニタリングするためには、 K^+/Na^+ の選択性の高い蛍光プローブの開発が重要である。高性能イオン選択性電極が開発されており、これによって血液中の Na^+ 、 K^+ の濃度変化の検出が行われている。また、パッチクランプ法を用いれば細胞一個の K^+ の濃度変化がモニタリングできる。しかしながら細胞集団の K^+ 変化のモニタリングは、これらの手法では不可能であった。この観点から水溶液中で利用可能な K^+ 選択的蛍光イメージング試薬の開発が期待されている。要求される性能は、100 mM程度の解離定数を有し、 Na^+ に対する K^+ 選択性の高いものである。最近、triazacryptand (TAC) 誘導体が高い K^+ 選択性を有することを利用してこれを基本骨格とした K^+ 蛍光プローブの開発が行われている。最近報告されているTACを利用した興味深い研究は、TAC-Redを利用した脳の K^+ 波の蛍光イメージング²⁾とKS2による細胞からの K^+ 流出の蛍光イメージングである³⁾ (図1)。著者は、2002年頃からヒトテロメア配列DNAを利用した K^+ 選択的蛍光プローブの開発を行ってきた。これは、グアニン (G) により形成されたカルテット構造において中心部分にキャビティが生じ、これが K^+ のサイズに最適であることを利用したものである (図2A)。具体的には、ヒトテロメア配列を有するDNA断片の両末端に蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 可能な色素ペア (ここではFAMとTAMRA) を導入した分子を合成した (図2B)⁴⁾。この分子は、 K^+ 非存在下ランダム構造を取っているため、FAMの励起によってFAM由来の蛍光を生じる。しかし、 K^+ が存在すると4本鎖構造を取り、FAMとTAMRAが近接することによってFAMの励起によってTAMRAの蛍光を生ずると期待された (図2C)。従ってFAMに対するTAMRAの蛍光強度比を調べることによって K^+ 量を見積もることが可能になると期待される。著者らは、本プローブおよびその誘導体によって水溶液中での K^+ 選択的蛍光イメージングを試みてきた。ここでは、高性能 K^+ 選択的蛍光プローブ構築とそれを利用した生体内 K^+ の蛍光イメージングに関しての著者らのこれまでの検討結果についてまとめた。



竹中 繁織

ギー移動 (FRET) 可能な色素ペア (ここではFAMとTAMRA) を導入した分子を合成した (図2B)⁴⁾。この分子は、 K^+ 非存在下ランダム構造を取っているため、FAMの励起によってFAM由来の蛍光を生じる。しかし、 K^+ が存在すると4本鎖構造を取り、FAMとTAMRAが近接することによってFAMの励起によってTAMRAの蛍光を生ずると期待された (図2C)。従ってFAMに対するTAMRAの蛍光強度比を調べることによって K^+ 量を見積もることが可能になると期待される。著者らは、本プローブおよびその誘導体によって水溶液中での K^+ 選択的蛍光イメージングを試みてきた。ここでは、高性能 K^+ 選択的蛍光プローブ構築とそれを利用した生体内 K^+ の蛍光イメージングに関しての著者らのこれまでの検討結果についてまとめた。

2. ヒトテロメア配列を利用したPotassium Sensing Oligonucleotide (PSO) の開発

著者らが初めて報告したPSO-1の構造を図2Bに示した⁴⁾。PSO-1は、ヒトテロメアDNA配列 (GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG) の両置換基末端にFAMとTAMRAを導入した構造を有する。図2Cのように K^+ によってバスケット型4本鎖構造を形成し、FRETが誘起されると考えた。図3Aに K^+ 存在下、非存在下でのPSO-1の蛍光スペクトルを示した。 K^+ 非存在下では515 nmのFAM由来のピークが見られたが、581 nmにもピークが見られた。 K^+ 存在下では、515 nmのピークが減少して581 nmのピークが増大した。581 nmのピークはTAMRA由来と考えられるので期待したような蛍光変化が観測でき

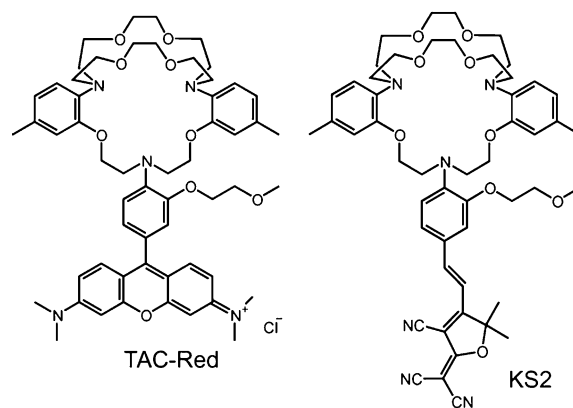


図1 triazacryptand (TAC) 骨格を利用した K^+ 選択的蛍光プローブ、TAC-RedおよびKS2

た。しかし、 K^+ 非存在下でもTAMRA由来の蛍光が見られたことからPSO-1は溶液中伸びた構造ではなく一部FRET可能な距離まで近接していると考えられた。この蛍光変化を利用して解離定数を求めたところPSO-1は K^+ 、 Na^+ の解離定数が0.28と57.7 mMで Na^+ に対する K^+ の選択性は208倍であった。しかし、細胞間で期待される145 mM Na^+ 存在下で K^+ 濃度変化させるとTAMRAの蛍光減少のみしか観察されなかった。これは、図3Bに示したようにPSO-1は K^+ に対して高い親和性を有するが、大過剰の K^+ 、 Na^+ 条件下では、最終的に到達する F_{581}/F_{515} (FAMに対するTAMRAの蛍光強度) が K^+ に比べ Na^+ の方が高い値を有するためである。 Na^+ 、 K^+ によって同じ4本鎖構造を有するのであれば、最終的には同じ F_{581}/F_{515} 比となるはずである。このような違いが出たのは、 K^+ 存在下でのPSO-1の構造は、 Na^+ のときのそれと異なっているためか、または、幾つかの異なった構造の混合体であると考えられた。最近になってヒトテロメア配

列では過去に言われていたバスケット型の4本鎖構造でなく、ハイブリッド型と呼ばれる4本鎖構造が主成分であることが示されており(図4)⁵⁾、ハイブリッド型の両末端は離れているため効果的にFRETを示さないと期待されることを考えれば、ここでの結果はこれを反映したものと期待される。

3. トロンビン結合アプタマー配列を利用したPSOの開発

K^+ により形成されるPSOの四本鎖構造の単純化のためにヘア型構造しか取らないと言われていたトロンビン結合アプタマー配列DNA (TBA, 5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3')の両置換基末端にFAMとTAMRAを導入したFAT-0を調整した(表1)⁶⁾。TBAは、円二色性スペクトルを用いて K^+ 、 Na^+ に対する解離定数を算出したところ、それぞれ0.29, 104 mMとなり、 Na^+ に対する K^+ の選択性は350倍と極めて高いものであった。TBAは15量体であるので

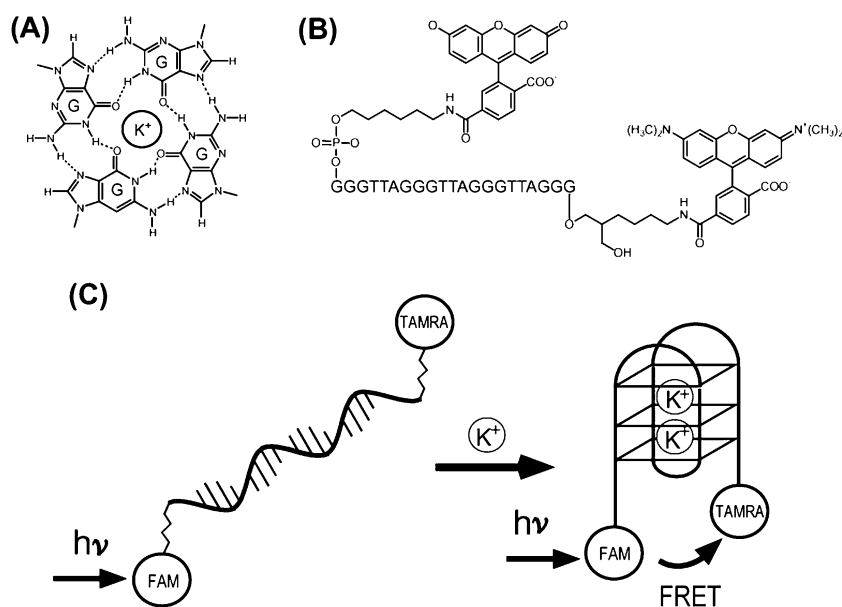


図2 (A) グアニン (G) カルテットによる K^+ の識別。(B) PSO-1の構造。(C) PSO-1による K^+ のレシオ型蛍光検出の概念(ここでは4本鎖構造としてバスケット型を記載しているが、最近の研究からいくつかの混合物である可能性が高い。)

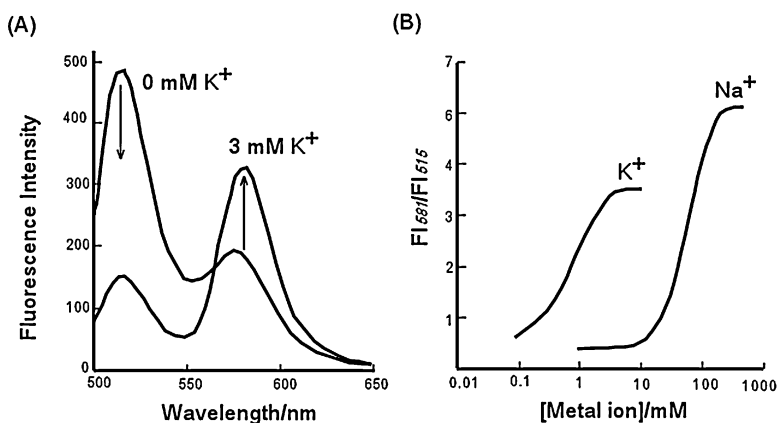


図3 (A) 3 mMのKCl非存在下、存在下での0.2 μ M PSO-1の蛍光(励起波長492 nm, 5 mM Tris-HCl, pH 7.0, 25 $^{\circ}$ C)。(B) KClまたはNaClの添加にともなう0.2 μ M PSO-1のAM (515 nm) に対するTAMRA (581 nm) の蛍光比。

両端は伸びた状態で約63Å離れていると考えられる。FAMとTAMRAのFörster半径 $R_0 = 55\text{\AA}$ と期待されるので、 K^+ 非存在下ではFRETは観察されず、 K^+ 存在下で大きなFRETが観測されると期待された(図5A)。しかし、FAT-0のみでもFRETによるTAMRA蛍光が観測され、 K^+ 添加によってチェア型4本鎖を形成するもののFAMとTAMRAの蛍光減少のみ観察された。 F_{585}/F_{518} よりFRET効率は高いものであったが、蛍光減少のみ生じたのは二つの色素が近接しすぎるために色素間の直接的な相互作用によってクエンチングが同時に起こったためであった。そこでFAMとTAMRAをピレンに置き換えたPSO-pyを合成した(表1)。PSO-pyは K^+ 添加に伴ってピレンエキシマー発光が観察された⁷⁾。このことは、先のクエンチングの理由を証明するものであった(図5B)。更にトロンビンアプタマー配列の5'末端にチミン連続配列を導入することによって二つの色素の距離をクエンチングが起こらない程度まで離すことを試みた⁶⁾。例えば、TBA配列

の5'末端に5個の塩基を導入したFAT-5(表1)は、それ自体でのFRETは抑えられたものの Na^+ に対する K^+ の選択性は大きく減少した(図5C)。これは新たに4本鎖形成に関与しないリン酸アニオン5個分が導入されたことによるものと考えられた。

4. PSO誘導体の細胞への導入

上記で合成したPSO-1, FAT-0, FAT-5, PSO-pyの細胞導入を検討した。これらプローブは細胞に作用させただけでは細胞内へ導入されなかった。そこで、ビーズロード法によって細胞内へこれらのプローブを導入した。しかしながら、これらプローブは核に濃縮され、その後細胞死を起こすことが明らかとなった。例えば、FAT-5においては、HeLa細胞へ導入した場合、導入された57個の細胞中70%が4時間以内に細胞死を起こすことが明らかとなった。過去の論文においてTAB配列は、核内のヌクレオリンと相互作用し、細胞死を促すことが知られており、本系の場合の同様の

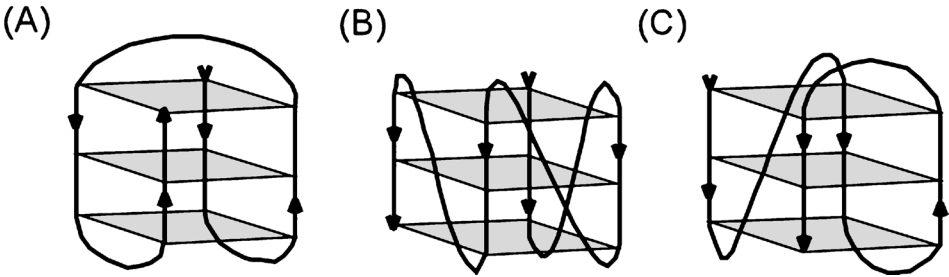


図4 ヒテロメア配列DNAで見出された多様な4本鎖構造(左からバスケット, プロペラ, ハイブリッド型である。)

表1 TBAを基本骨格としたPSO誘導体

Abbreviation	Sequence
TBA	GGT TGG TGT GGT TGG
FAT-0	FAM- GGT TGG TGT GGT TGG-TAMRA
FAT-5	FAM- TT TTA GGT TGG TGT GGT TGG-TAMRA
PSO-py	Py-GGT TGG TGT GGT TGG-Py

FAM:

TAMRA:

PSO-py

作用機構で細胞死へ導かれたものと考えられた。そこで、TBAを K^+ センシング部位としてFAM, TAMRA, ビオチンの導入を検討した。FAMをDNAへ導入し、TAMRAとビオチン部分を導入したペプチド鎖の連結を試みた。これは、TBA以外にDNA鎖を導入すると K^+ に対する選択性が低下することを加味して中性のペプチド鎖の導入を行ったのである。また、導入されたビオチンは、アビジンと複合化することによってヌクレオリンとの相互作用と核膜への通過を阻害させるために導入したものである。

5. PSO-5の合成⁸⁾

上記の分子設計によってPSO-5の合成を行った。合成経路を図6に示した。TBA配列を有するオリゴブクレオチドの5'-末端にアミノ基を3'-末端にFAMを導入したPSO (FAM) とSulfo-SMCCとの反応によって5'-末端にマレインイミドが導入されたPSO (FAM) -maleimideを合成した。これに別途合成したN-端にビオチン、C-端にシステイン、側鎖の途中にリジンを導入したペプチドBiotin-Acp(6)-Gly-Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly-Cysを連結させた。その後リジン部分と5(6)-carboxytetramethyl-rhodamine succinimidyl esterを反応させることによってリジン部にTAMRAを導入した。各中間体および最終生成物であるPSO-5は逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって精製した。PSO-5とストレプトアビジン (streptavidin, StAv) との1:1混合サンプルはゲル電気泳動の移動度が大きく減少したことよりPSO-5がStAvと複合体を形成したことが示された。また、別途核排出ペプチドsnurportin 1 (SNUPN) の1から15残基までのペプチドのN-末にビオチンを導入した

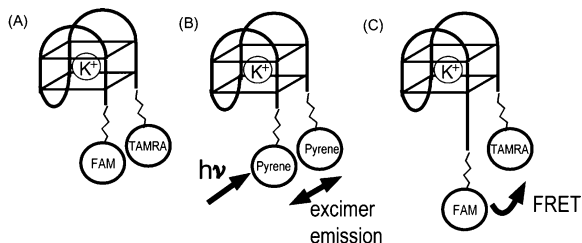


図5 FAT-0 (A), PSO-py (B), FAT-5 (C) の K^+ による4本鎖形成とその際の色素間の位置関係

B-NES (Biotin-Acp-Trp-Ser-Arg-Ser-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-NH₂)を合成した。このペプチドは α -ヘリックス構造を形成する。最終的にPSO-5と三つのB-NESをStAvに導入した複合体を形成させ、これを細胞内 K^+ 蛍光イメージングに利用した。

PSO-5の Na^+ , K^+ に対する解離定数は、それぞれ12.1 mM, 639 mMであり、 Na^+ に対する選択性は53であった。TBAのみの選択性が350倍であったので、それに比べ約7倍以下の選択性の低下であったが、この条件でさえ報告されている K^+ プローブの中で一番高いものであった。更に、StAv, B-NESとの複合化によって Na^+ , K^+ に対する解離定数は2.2 mM, 529 mMとなり、 Na^+ に対する K^+ の選択性は241と極めて増大した (TBAのみに比べ2/3倍)。

6. 細胞内へのPSO-5の導入と細胞内 K^+ イメージング⁸⁾

ビーズロード法によってPSO-5をHeLa細胞へ導入した。PSO-5は8時間後において導入された85細胞中18%が細胞死したのみでそれ自体でも細胞死をかなり抑えることができた。しかし、核への局在化は観察された。そこでStAvと複合化させ細胞に導入した。これによっても同条件下152個の導入されたHeLa細胞中19%の細胞死が観察されたのみであったが、それでも核への局在化は観察された。フルオレセイン導入StAvのみをビーズロード法によってHeLa細胞に導入した場合も核への局在化が観察されたので、StAvは核膜を通過できて、かつ核へ濃縮されやすいのかも知れない。しかし、ビオチン化核排出ペプチドB-NESストレプトアビジンの残りの三つの結合サイトへ導入した複合体の場合は、177個の導入細胞に対して14%の細胞死が観察されたが、細胞質にPSO-5を留まらせることに成功した (図7A)。細胞内の K^+ 濃度変化のリアルタイムイメージングのためにPSO-5複合体を導入したHeLa細胞にAmphotericin B (細胞膜のエルゴステロールと結合して細胞膜透過チャネルを形成する。 K^+ の細胞外への流失を促進), Bumetanide ($Na^+/K^+/2Cl^-$ 共輸送体阻害剤。 K^+ の細胞内流入を阻害), Ouabain (Na^+/K^+ -ATPase阻害剤。 K^+ の細胞内流入を阻害)を導入後、リアルタイム蛍光イメージングを行った。結果を図7Bに示した。

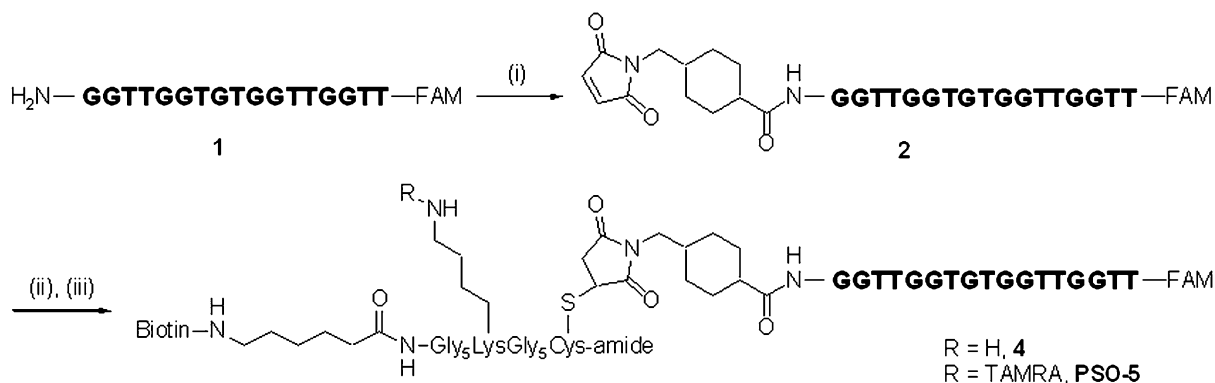


図6 PSO-5の合成法。(i) : sulfo-SMCC/PBS buffer (pH 7.4), (ii) : Spacer peptide (Biotin-AcpGly₅LysGly₅Cys-amide) /100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), (iii) : Tetramethylrhodamine (TAMRA) succinimidyl ester/PBS buffer (pH 7.4).

F_{585}/F_{517} の時間経過から時間とともに F_{585}/F_{517} 値の減少が見られた。これは、細胞内からの K^+ の流出に伴う、濃度減少を示唆するものである。 F_{585}/F_{517} 値の減少は約2.5時間で一定になった。これまでリアルタイムで K^+ 流出を調べた例は報告されていないが、Anderssonらは、96ウェルプレートで培養したヒト肺癌細胞に同様の薬剤を添加して細胞内カリウムイオン濃度変化を、PBFIをプローブとした蛍光測定により解析している。その研究では添加後2時間から3時間でカリウムイオン濃度の減少が示されている。したがって本研究でのHeLa細胞への薬剤添加後のカリウムイオン濃度減少が2.5時間で定常に達した結果は妥当であると考えられる。本系においてカリウムイオン濃度変化を蛍光イメージングにおいて蛍光強度比というリアルタイムな情報として捉えることができた点は新規で意義深いものである。

7. 細胞表面へのPSO-5の局在化と細胞間 K^+ イメージング⁹⁾

PSO-5を細胞表面に局在化させることができれば細胞間の化学シグナルとしての K^+ の流出が観測されるものと期待される。特に細胞間は145 mM Na^+ 存在下で数mMの K^+ の変化を観察する必要がある。このためには、 Na^+ に対して高い K^+ 選択性を有する K^+ 蛍光プローブが要求されている。PSO-5がこれに適していると期待される。PSO-5の細胞膜外への結合には、細胞膜に多く存在する糖鎖に結合するbiotin化Concanavalin A (Con A), StAvを介して結合させることを試みた。概念を図8Aに示す。HeLa細胞に7 μ M Con A 100 μ L, 14 μ M StAv 100 μ L, 5 μ M PSO-5 50 μ Lの順で30 min ずつ, 5% CO_2 37°C でインキュベートした。培地としてDMEM(-) 2 mLを用い, KClを滴下したときのPSO-5の応答を共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図8B)。KCl添加前,

FAM由来の蛍光が観察され, PSO-5が細胞外へ固定化されていることを確認出来た。これにKClを添加したところ, 添加に伴いTAMRA由来の蛍光へと変化した。これより細胞表面のカリウムイオン濃度変化のモニタリングに成功した。PSO-5を細胞表面に固定化した状態で, アポトーシス誘導剤(10 μ M Amphotericin B,

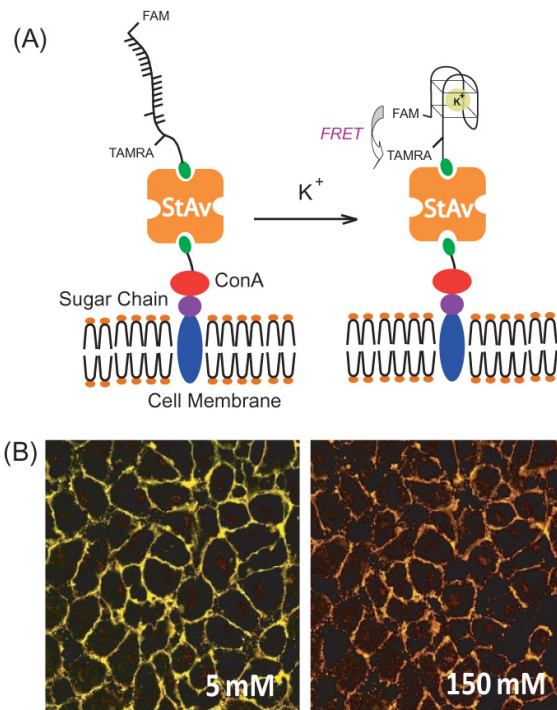


図8 (A) 細胞表面へのPSO-5の局在化の手法と (B) これによる局在化させたPSO-5による細胞表面での5 mMまたは150 mM K^+ の蛍光イメージング。励起光494 nm, 写真はFAMに対するTAMRAの蛍光比を示している ($F_{541-637}$ nm/ $F_{493-553}$ nm)。

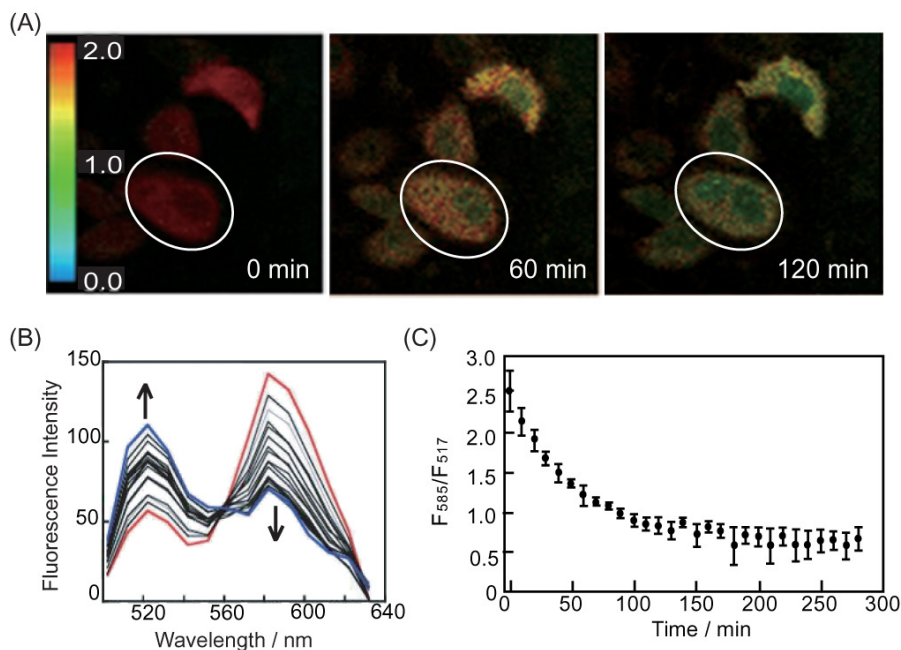


図7 (A) HeLa細胞にアポトーシス誘導剤を添加したときの K^+ イメージング画像. (B) (A) のサークル内の蛍光変化. (C) 蛍光レシオ値 F_{585}/F_{517} の時間変化.

Bumetanide, Ouabain in DMEM (10 % FBS) 300 μ L)を加えてアポトーシスを誘導し、細胞内からカリウムイオン流出を行わせた。薬剤添加直後から蛍光のレシオ値 R の増大が観察され、約 2.5 時間で一定になった。先の K^+ 流出に伴う細胞内の K^+ 濃度減少と一致するものであり、細胞内から K^+ が流出する様子をリアルタイムで観察できたものと考えられた。

8. おわりに

PSO-5 を利用して細胞内外の K^+ のリアルタイム蛍光イメージングに成功した。このシステムを脳や神経細胞へ応用することができれば、 K^+ 波の時空間蛍光イメージング等が可能になると期待される。また、創薬開発に関しても細胞に K^+ チャンネルに影響を与える薬剤のスクリーニングのために行われているパッチクランプ法に代わる簡便な手法を提供できる可能性がある。これらの可能性を実証すべく今後検討を加えていきたい。

本研究は、研究室のスタッフと学生の努力の結果であります。また、PSO を細胞レベルまで高めることができたのは大阪大学・永井健治教授の助けによるものです。さらに文科省のグラントの助けもなければ研究を進めることができませんでした。感謝いたします。

参考文献

- 1) C.-C. Shieh, M. Coghlan, J. P. Sullivan, M. Gopalakrishnan, *Pharmacol. Rev.*, **52**, 557–593 (2000).
- 2) P. Padmawar, X. Yao, O. Bloch, G. T. Manley, A. S. Verkman, *Nat. Methods*, **2**, 825–827 (2005).
- 3) X. Zhou, F. Su, Y. Tian, C. Youngbull, R. H. Johnson, D. R. Meldrum, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 18530–18533 (2011).
- 4) H. Ueyama, M. Takagi, S. Takenaka, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 14286–14287 (2002).
- 5) S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, and S. Neidle, *Nucl. Acids Res.*, **34**, 5402–5415 (2006).
- 6) S. Nagatoishi, T. Nojima, E. Galezowska, B. Juskowiak, and S. Takenaka, *ChemBioChem*, **7**, 1730–1737 (2006).
- 7) S. Nagatoishi, T. Nojima, B. Juskowiak, and S. Takenaka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 5067–5070 (2005).
- 8) K. Ohtsuka, S. Sato, Y. Sato, K. Sota, S. Ohzawa, T. Matsuda, K. Takemoto, N. Takamune, B. Juskowiak, T. Nagai, S. Takenaka, *Chem. Commun.*, **48**, 4740–4742 (2012).
- 9) K. Sota, S. Ohzawa, S. Sato, T. Matsuda, K. Takemoto, B. Juskowiak, T. Nagai, S. Takenaka, unpublished data.

たけなか しげおり
九州工業大学大学院工学研究院
物質工学研究系応用化学部門
shige@che.kyutech.ac.jp

中性子ビームを用いた創薬標的タンパク質とペプチド性阻害剤の相互作用解析

1. はじめに

タンパク質をはじめとする生体高分子の多くは、構成原子の約半数を水素原子が占めている。水素原子は、存在や位置を低分子で得られた知見から理論的に予測できるといわれるが、本当にそうだろうか？タンパク質の複雑な機能の発現を担う水素原子は、タンパク質が分子表面に作り出した特殊な場において、様々な有機反応に寄与する。このような特殊な場に存在する水素原子を観測し、生じる反応を精度良く予測することは、未だ難しい。予測精度を向上させるには、理論計算で予測された水素原子の位置や反応性を、実験的な結果と比較し、相互に検証する必要がある。それでは生体高分子を構成する水素原子の位置を正確に把握するにはどうすれば良いであろうか？その一つの方法は、水素原子の検出に効果的な中性子ビームを用いて立体構造を解析することである。近年、量子ビームと呼ばれる言葉が使われる。量子ビームは、放射光やレーザー、イオンビームなどの高品位なビーム群の総称である。中性子ビームは、量子ビームの一つであり、主として実験用原子炉や加速器によって作り出される。中性子ビームを用いてペプチドや核酸、タンパク質などの生体高分子を作る水素原子の特徴を探ることにより、その複雑な構造と機能の相関を効果的に解明することができる。これらの科学技術は、わが国が世界に誇るべき有数のものであり、世界の生命科学研究の先端領域の開拓に貢献できるはずである。ここでは、中性子ビームを用いた生体高分子の構造・機能研究の最近のトピックスを紹介する。



黒木 良太

2. 中性子の特徴と構造解析の意義

中性子を用いて生体高分子の水素原子の構造を観測するには、中性子結晶回折法が用いられる。この手法による構造解析では、X 線の代わりに中性子ビームを用いるが、X 線結晶構造解析と同様に目的試料を結晶化する必要がある。したがって観測されるのは結晶場における静的な構造であるが、それゆえに水素原子を高い分解能で観測できる。タンパク質を構成する水素原子は電子数が 1 であり、X 線との相互作用が少ないため観測が難しい。しかしながら中性子は、各原子の原子核と相互作用し、相互作用の大きさは各原子固有の特徴を反映するため、水素原子やリチウム原子など軽い元素であっても検出を効果的に行うことができる(図 1)。水素原子をその同位体である重水素に置換すると、炭素原子と同様の大きさで相互作用するため、さらに観測が容易になる。

中性子を用いた水素原子の観測は、水分子との相互作用によって保持される立体構造や、分子認識において重要な水和構造に関する情報を与える。また様々な生物有機反応を触媒するアミノ酸の解離状態に関する情報も与えてくれる。これらの知見から、タンパク質

などの高分子が、どのようなメカニズムで相手の分子を認識し、どのように有機化学反応を触媒するのかを把握することができる。新たに得られた分子認識における知見は、新たな創薬プロセスの創生にも寄与すると期待される（図2）。

3. 中性子ビーム施設と結晶構造解析

日本国内には、生体高分子の立体構造解析を目的とした中性子回折計が3台設置されている。そのうち2台は、日本原子力研究開発機構の研究用原子炉の中性子ビームラインに設置された中性子回折計（BIX-3¹⁾、4²⁾）である。残りの一台は、2008年に稼動を開始した大強度陽子加速器施設・物質生命科学実験施設のBL-3に設置されたiBIX³⁾である。iBIXは、茨城県が産業利用を目的に建設したものであり、J-PARCの出力がまだ低いので生体高分子の本格的な解析には使われていない。前者のBIX-3、4は、世界中の中性子解析例の1/3～1/2に相当する18件の中性子構造解析に成功しており⁴⁾、現在解析数においては最も大きな寄与がある（図3）。世界的には中性子ビームラインは、フランスのラウエランジュバン研究

所（ILL）およびロスアラモス国立研究所・中性子科学センター（LANSCE）にそれぞれ1台ずつが稼働中であるが、日本に3台の装置が稼働中というのは大きな強みである。

中性子ビームによる生体高分子の立体構造解析は、現在多くの成果をあげているX線結晶構造解析と、ビームの種類（X線／中性子）が異なるだけで、ほとんど同じ手法（ソフトウェア）を使うことができる。近年では、1つの結晶試料から、X線回折データおよび中性子回折データの両方を取得し、同時に一つの構造を得る手法が主流である。すなわち水素原子以外の原子（炭素、酸素、窒素、イオン）は、より精度の高いX線回折データの寄与を多くして解析し、水素原子等の位置は主に中性子回折データを使って決定する手法である⁵⁾。

中性子回折実験には、いくつかの大きな制限がある。それは中性子ビームを当てる結晶試料に、大型の試料（結晶体積1～10 mm³）が必要なことである。これは中性子ビームの強度が低いからである。この体積はX線結晶構造解析で用いられる試料（結晶体積0.01～0.1 mm³）の千倍にも相当する。1 mm³の結

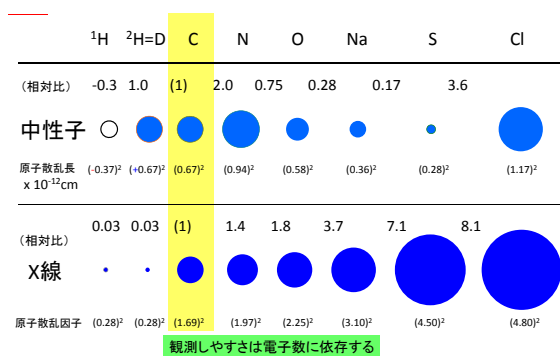


図1 中性子およびX線との各原子の相互作用の大きさ

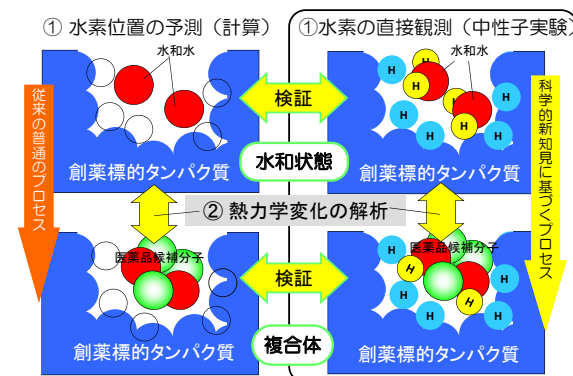


図2 水素原子位置の推定による従来の分子設計プロセスと水素原子位置の実測に基づく新しい分子設計プロセス

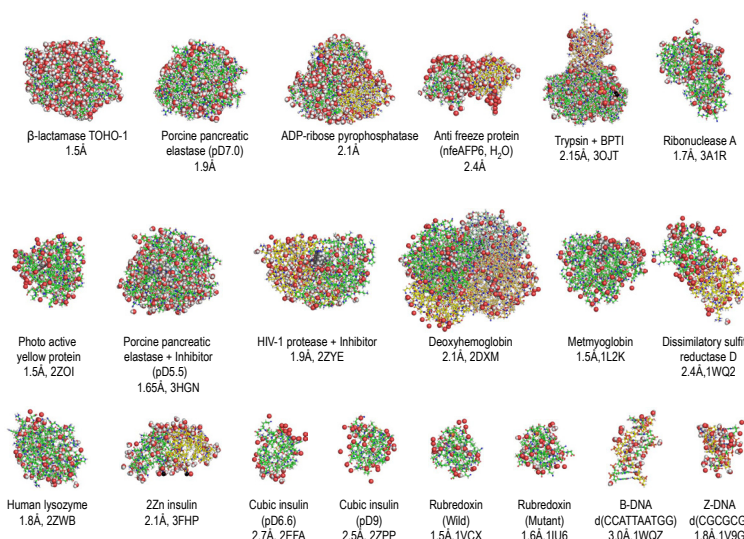


図3 原子力機構の研究用原子炉に設置された中性子回折計によるタンパク質や核酸の立体構造解析例

晶試料に約 1 mgの試料が含まれると仮定すると、少ない試料を用いて中性子解析用の結晶試料を作製するには、最低でも 1 バッチあたり数 mgの試料が必要であり、事前に結晶化条件の最適化を行う必要がある。また中性子回折データの収集には、約 1 か月という極めて長いビームタイムが必要である。したがってさらに高強度の中性子ビームと、それを生かすことのできる中性子回折計が必要である。

4. 中性子による分子間相互作用解明の実例

中性子を用いた生体高分子の構造解析では、水素原子や水と水の立体構造を含む重要な情報が得られる。この手法をペプチド性阻害剤と創薬標的タンパク質の相互作用解析に用いた例を紹介する。

私たちが手がけた創薬標的タンパク質の中性子構造解析は、ヒト免疫不全ウイルス由来のプロテアーゼ (HIV-PR)⁶⁾ とブタ膵臓エラスターゼ (PPE)⁷⁾ である。両者ともX線回折データと中性子回折データの両方を用いて 1 つの立体構造座標を決定した。ペプチドの認識においては、アミノ酸側鎖だけでなくペプチド結合そのものをタンパク質がどの様に認識するか、そしてアミノ酸側鎖の特徴をどのように見分けるかが重要である。ペプチド結合の認識には水素結合が寄与する。水素結合においては、水素原子は水素供与体と水素受容体の間の直線上 (水素供与体から見た水素原子の延長線上に水素受容体が存在) に存在すると思いがちであるが、多くの場合水素原子は直線上には存在していない⁸⁾。またヘリックスに存在する水素結合の一部に、分岐状の水素結合が見られることや⁸⁾、低分子や無機物で観測された低障壁水素結合 (Low Barrier Hydrogen Bond) の存在も明らかになった⁹⁾。このようにタンパク質には普通に見られる水素結合であっても、水素原子の観測が可能になることによって初めて、さまざまな特徴の違いが明らかになってきた。

さらに水素原子の観測によって、触媒基の解離状態を直接知ることができる。酵素による阻害剤の認識においては、触媒基の解離状態が阻害剤の親和性を左右する。ヒト免疫不全ウイルスプロテアーゼ (HIV-PR) の中性子構造解析 (図 4a) によって触媒基の水素原子の状態を観測した結果、触媒基として機能する 2 つのアスパラギン酸の一つ (Asp25) はプロトン化し、もう一つのAsp125は、脱プロトン化していることがわかった。一般にアスパラギン酸の側鎖カルボン酸のpKaは、3.4程度であるが、近接した 2 つのカルボン酸では、一方のカルボン酸のpKaが上昇し、もう一方のカルボン酸のpKaが下がって異常値を示す。HIV-PRへの阻害剤 (KNI272) の結合では、これら異常なpKaを有する 2 つのカルボン酸をうまく認識するような構造を有していることがわかった (図 4b)⁶⁾。

ブタ膵臓エラスターゼ (PPE) と阻害剤の複合体の中性子構造解析 (図 5a) では、セリンプロテアーゼのオキシアニオンホール (セリンプロテアーゼの機能発現を担う共通の構造) における阻害剤との相互作用も明らかになった。セリンプロテアーゼはオキシアニオンホールという特徴的な構造を用いて、ペプチド結合のカルボニル基を分極させることが知られる。PPEのオキシアニオンホールに結合した阻害剤の水酸基には

水素原子が結合しておらず (水酸基は中性域のpHでは通常解離しない)、水酸基が解離していることがわかった (図 5b)⁷⁾。これらの知見は、酵素と阻害剤の親和性を向上させるために、どのような方策をとればよいのか重要なヒントを与える。

5. 新しいビームラインの建設へ

中性子を用いた生物分子の結晶構造解析は、世界中でも40例ほどしか実施されていないが、新たな解析によって得られた水素原子の情報は、タンパク質の構造や機能に関わる新しい知見を次々と提供しており、水素原子の観測によって新しい発見が期待されている。原子力機構の研究用原子炉に設置された 2 台の中性子回折計は、ILLやLANSCEに設置された中性子回折計では難しい高い分解能の中性子回折データを取得することができる。しかしながらデータの収集には約 1 か月という極めて長いビームタイムが必要であり、回折実験に必要な結晶試料の体積も、1 ~ 10mm³と大きいことが問題である。そこで中性子回折データを効率よく収集する方法としてパルス中性子を用いる手法が開発されている。生体高分子の立体構造解析にパルス中性子を利用する回折計は、近年稼働を開始した大強度陽子加速器施設 (J-PARC) の茨城県生命物質構造解析装置 (iBIX) やLANSCEのProtein Crystallography Station (PCS) で実現されているが、両者とも大型蛋白質の解析には適していない。また前者は産業利用目的のビームラインであり、一般ユーザーに提供されるのは、全ビームタイムのわずか20%である。したがって結晶の格子長に関する制限が少ない一般研究者の利用を目的とした中性子ビームラインの建設が急務である。

そこで筆者らは、J-PARCの高効率の特性を生かした生体高分子の構造解析を目的とした中性子回折計の建設提案を行っている。この装置は、iBIXの基本設計を踏襲しているが、より効果的なデータ収集を目標として、比較的小型の結晶試料から中性子回折データを短時間で収集可能な回折計と、膜タンパク質やタンパク質複合体などの大型格子結晶試料から中性子回折データを取得できる長格子長専用回折計の 2 台を 1 つのビームラインに配置する予定である。後者の長格子長専用回折計では検出器をより大型のものに変更するとともに、大型格子長の試料に対応して回折点の分離を向上させるため、試料と検出器の間隔を広げた仕様とした。本装置の建設が実現し、水素原子の観測が可能となることによって、タンパク質と阻害剤の相互作用における新しい知見を得ることができる。ぜひ建設実現へのご支援をいただきたい。

6. 終わりに

中性子を利用したタンパク質結晶解析の歴史は長い。その利用は、パルス中性子の登場によっていよいよ身近なものになってきた。X線結晶構造解析によって蓄積された膨大な数のデータに、数の上で追いつくのは不可能であるが、共通の機能を発揮するタンパク質の代表例を一つ一つ丁寧に解析していくことによって、タンパク質の機能解明により近づくことができるはずである。また水素原子の観測は、タンパク質にお

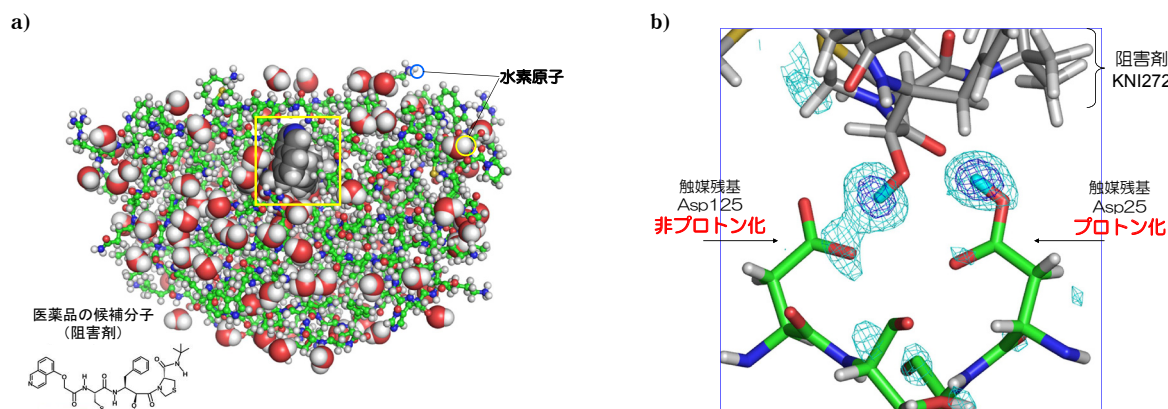


図4 ヒト免疫不全ウイルスプロテアーゼ (HIX-PR) の中性子構造解析

- a) 中性子を用いて観測したHIV-PRと阻害剤の全原子構造。炭素 (白またはグレー), 酸素 (赤), 窒素 (青)。溶媒である水は各原子のvan der Waals 半径を反映させた球で表示した。
- b) 活性アミノ酸残基と阻害剤の相互作用にかかわる水素原子。メッシュは中性子によって観測した原子核密度分布を示す。

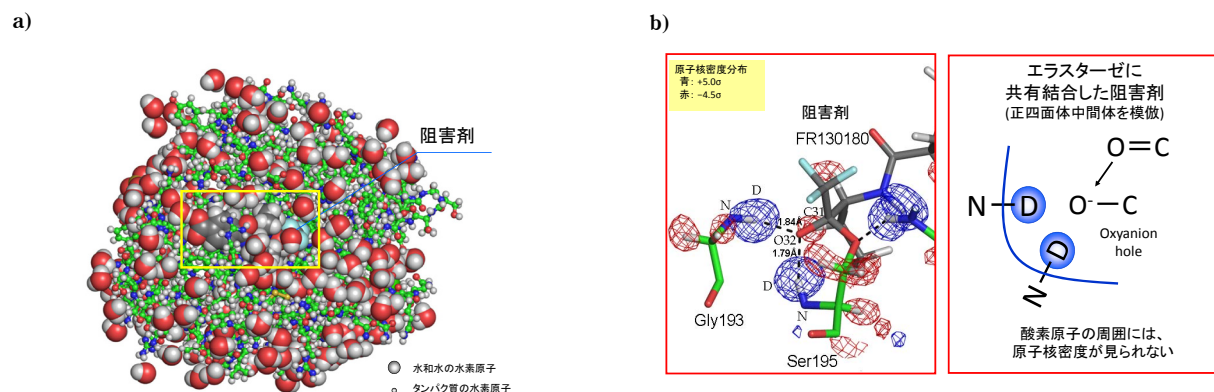


図5 プタ臍臓エラスターゼ (PPE) の中性子構造解析

- a) 中性子を用いて観測したPPEと阻害剤の全原子構造。色分けは図4と同じ。
- b) 基質結合部位 (オキシアニオンホール) と阻害剤の相互作用に関わる水素原子

ける水素原子位置の理論的な予測が正しかったのかどうかを検証することができる。検証の実現は、理論計算における予測の精度向上につながり、タンパク質と相互作用する医薬品候補分子の予測精度も飛躍的に向上すると期待される。

本研究は、日本原子力研究開発機構の量子ビーム応用研究部門を中心に、大学等との共同研究によって実施されたものであり、研究に参加された方々に感謝申し上げます。また執筆の機会を与えていただいた日本ペプチド学会の野水先生・坂本先生に深謝致します。

参考文献

- 1) Tanaka, I., Kurihara, K., Chatake, T., and Niimura, N. A high-performance neutron diffractometer for biological crystallography (BIX-3). *J. Appl. Cryst.*, **35**, 34-40. (2002)
- 2) Kurihara, K., Tanaka, I., Niimura, N., Refai Muslih, M., Ostermann, A. A new neutron single-crystal diffractometer dedicated for biological macromolecules (BIX-4). *J. Synchrotron Radiat.* **11**, 68-71. (2004)
- 3) Tanaka, I., Kusaka, K., Hosoya, T., Niimura, N., Ohhara, T., Kurihara, K., Yamada, T., Ohnishi, Y., Tomoyori, K., Yokoyama, T. Neutron structure analysis using the IBARAKI biological crystal diffractometer (iBIX) at J-PARC. *Acta Crystallogr D* **66**, 1194-1197. (2010)
- 4) Kuroki, R., Okazaki, N., Adachi, M., Ohhara, T., Kurihara, K., Tamada, T. Towards investigation of the inhibitor-recognition mechanisms of drug-target proteins by neutron crystallography. *Acta Crystallogr D* **66**, 1126-1130. (2010)
- 5) Adams, P.D., Mustyakimov, M., Afonine, P.V., Langan, P. Generalized X-ray and neutron crystallographic analysis: more accurate and complete structures for biological macromolecules. *Acta Crystallogr D* **65**, 567-573. (2009)
- 6) Adachi, M., Ohhara, T., Kurihara, K., Tamada, T., Honjo, E., Okazaki, N., Arai, S., Shoyama, Y., Kimura, K., Matsumura, H., Sugiyama, S., Adachi, H., Takano, K., Mori, Y., Hidaka, K., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., Kuroki, R. Structure of HIV-1 protease in complex with potent inhibitor KNI-272 determined by high-resolution X-ray and neutron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **106**, 4641-4646. (2009)
- 7) Tamada, T., Kinoshita, T., Kurihara, K., Adachi, M.,

Ohhara, T., Imai, K., Kuroki, R., Tada, T. Combined High-Resolution Neutron and X-ray Analysis of Inhibited Elastase Confirms the Active-Site Oxyanion Hole but Rules against a Low-Barrier Hydrogen Bond. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 11033–11040. (2009)

8) Niimura, N., Chatake, T., Kurihara, K., Maeda, M. Hydrogen and hydration in proteins. *Cell Biochem Biophys.* **40**, 351–369. (2004)

9) Yamaguchi, S., Kamikubo, H., Kurihara, K., Kuroki, R., Niimura, N., Shimizu, N., Yamazaki, Y., Kataoka, M. Low-barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 440–444. (2009)

くろき りょうた
独立行政法人 日本原子力研究開発機構
量子ビーム応用研究部門
量子ビーム機能性分子解析技術研究ユニット
kuroki.ryota@jaea.go.jp

中間径フィラメントの基礎研究と応用への取組み

1. はじめに

一般的な細胞生物学の教科書には、細胞骨格の主要なタンパク質繊維成分として、微小管、アクチンフィラメント（マイクロフィラメント）と並んで、中間径フィラメントの名前が必ず出てきます。しかし中間径フィラメントは、前二者と比べてあまりポピュラーという印象はありません。発見は1968年、故 石川春律先生（当時ペンシルベニア大学、群馬大学名誉教授）らによって培養筋細胞の電子顕微鏡観察によって最初に報告されました¹⁾。名称は、フィラメントの直径（10 nm）が微小管の直径（25 nm）とアクチンフィラメントの直径（6 nm）の中間であることに由来しています。その後、中間径フィラメントの研究は生化学や分子生物学的手法の発展に伴って進展してきましたが、まだ解明されていない課題が多いことも現状です。ここでは中間径フィラメントの不思議さや面白みについて、私の研究に触れながら紹介したいと思います。



安藤 祥司

2. 中間径フィラメントこそ最も細胞骨格らしい成分

中間径フィラメント（intermediate filament, 以下IFと略）は多くの真核細胞に存在し、細胞質全体に広がるタンパク質繊維のネットワークを形成しています²⁾。特に上皮細胞内では、IFの一種であるケラチンフィラメントがデスモソーム（細胞間の接合装置）に連結することによって、上皮層全体に広がるネット

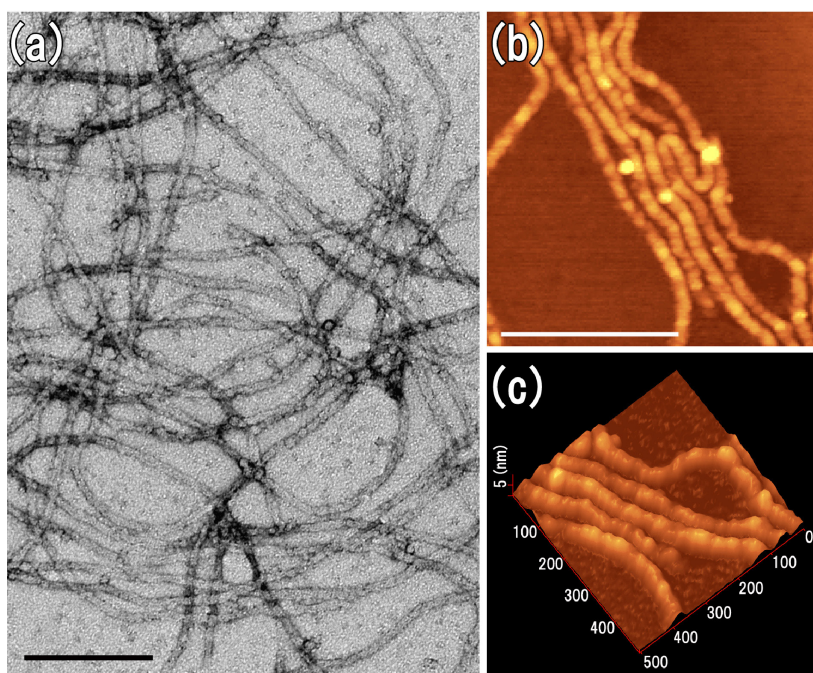


図1 中間径フィラメント（IF）の電子顕微鏡像（a）と原子間力顕微鏡像（b, c）
（c）は（b）を立体的に表示したもので、セグメント構造が確認できる。
スケールバー：（a）200 nm, （b）500 nm

ワークを形成し、上皮層の強度を増しています。また、神経細胞の軸索内にはニューロフィラメントが多数並行して存在し、さらにフィラメント間に架橋構造を形成しています。この三次元的な格子構造が軸索の形態形成と維持に働き、神経刺激の伝達を支えています。またIFは細胞核にも存在し、内膜の裏打ち構造である核ラミナを形成しています。特に有名なのはアフリカツメガエルの卵母細胞の核ラミナで、IFの一種であるラミンフィラメントが規則的に直交することでシート状の網目構造を形成し³⁾、核の構造の形成と維持に働いています。このように、IFの主な機能は丈夫な“ナノ構造”をつくり、細胞を内側から支持することによって、外からの機械的・物理的刺激に対抗して細胞を保護することだと考えられています。実際、IFを構成するタンパク質が遺伝子変異などの原因でIFをうまく構築できないと、細胞は弱くなり、いろいろな皮膚疾患や筋疾患を発症します⁴⁾。またIFの機能異常は、肝硬変、毛髪形成異常、白内障、脂質代謝異常にも関連することが報告されています。

IFの特徴の一つとして、不溶性が高く、細胞骨格成分の中で最も安定な構造体であることが挙げられます。微小管、アクチンフィラメントが、それぞれの可溶性構成タンパク質（チューブリン、アクチン）との間で、重合・脱重合の平衡状態を保ちながらフィラメント構造を維持しているのに対して、一度形成されたIFは極端に安定で、可溶性構成タンパク質への解離は8 M 尿素のように高濃度の変性剤を加えないと起きません。このようにIFの極端な安定性と不溶性は、細胞“骨格”という名前に最もふさわしいと言えます。ちなみに、8 M 尿素で可溶化したIFの構成タンパク質は、透析によって徐々に尿素を除くと、自発的に重合して再び安定なIFを形成します（図1）。この性質を利用した試験管内でのIF構築法は、細胞を用いた解析とともにIFを研究する上での重要な実験手法となっています。

3. IFを構成するタンパク質は多種類

IFを構成するタンパク質は多様で、ヒトの場合では75種類ほど存在します。IFタンパク質はアミノ酸配列の類似性などから、大きく5つのタイプに分類されています。5タイプのタンパク質はすべてが一つの細胞に存在するのではなく、組織や細胞の種類、また発生・分化の程度によって、それぞれ特異的なタンパク質が1～数種類存在します。具体的には、タイプⅠは酸性ケラチン、タイプⅡは中・塩基性ケラチンで、上皮細胞に存在します。ケラチンはIFタンパク質ファミリーの中で最も種類が多く、ヒトでタイプⅠは28種類、タイプⅡは26種類存在します。タイプⅢは間葉系細胞に存在するビメンチン、筋細胞のデスミン、アストログリア細胞のグリア線維酸性タンパク質です。タイプⅣは神経細胞のニューロフィラメントタンパク質で3種類、タイプⅤは核のラミンで数種類存在します。このようにIFタンパク質は多様で、その存在が細胞や組織の種類などによって異なることは、微小管とアクチンフィラメントの構成蛋白質であるチューブリンとアクチンには見られず、IFの大きな特徴です。

IFタンパク質はいずれも繊維状のタンパク質で、共

通する構造的特徴としてN末端側からヘッド、中央のロッド、C末端側のテイルと呼ばれる3つのドメイン構造をもっています（図2）。ロッドドメインはアミノ酸残基数がほぼ一定で、細胞質型IFタンパク質で約310、核ラミンで約350です。ロッドドメインの中には、 α -ヘリックス構造をとるサブドメイン1A、1B、2A、2Bが存在します。細胞質型IFと核ラミンのロッドの長さの違いは、核ラミンの1Bが細胞質型IFより42残基だけ長いことに起因します。また、1AのN末端約20残基と、2BのC末端約20残基は、生物種を超えて広く保存されていることが特徴です。皮膚や筋肉の疾患では、ケラチンやデスミンのこの領域に多くの変異が見つかっています。また、この領域に人工的に変異を導入した組換えタンパク質はIF形成能を失うことが報告されています。一方、ヘッドとテイルの長さやアミノ酸配列はタンパク質ごとに異なるため、この両末端ドメインが各タンパク質の性質や機能に大きく影響している可能性があります。ラミンのテイルには、核移行シグナルと膜結合用のイソプレニル化部位があります。

4. IFのリン酸化による機能制御

IFは微小管やアクチンフィラメントに比べると安定な構造物ですが、細胞分裂のときには一旦IFのネットワーク構造が崩壊しないと分裂に支障をきたします。この変化を起こす因子が何であるかが問題となります。この点に関して1980年頃から、細胞の分裂期にIFタンパク質のリン酸化量が上昇することが報告されるようになり⁵⁾、それまで不明であったIFの機能制御因子としてリン酸化が注目されるようになりました。そして1987年、愛知県がんセンター研究所の稲垣昌樹先生が、試験管内で構築したIFに、cAMP依存性キナーゼあるいはCキナーゼを作用させると、IFが崩壊（脱重合）することを報告しました⁶⁾。私はその年の夏から同研究所で勤務を始めたのですが、着任早々、稲垣先生は2枚の電顕写真を持ってこられました。1枚には、図1のようにビメンチンIFが複数本、ゆるやかなカーブを描きながら、互いに重なって写っていました。もう1枚は、そのIFにリン酸化酵素を働かせた結果生じた構造で、小さく不規則な形の粒がたくさん写っていました。私には、タンパク質が自発的に集合して直径10 nm、長さ数 μ mのきれいなフィラメントをつくるのが驚きでした。そして何より、リン酸化という修飾によって見事にフィラメント構造が崩壊す

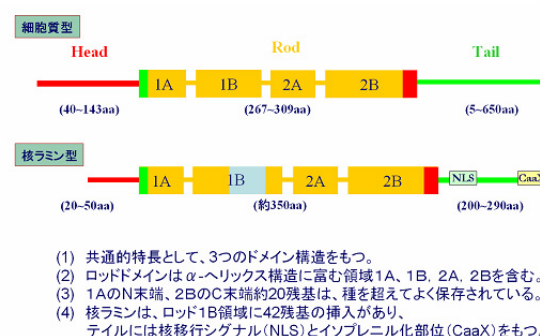


図2 IFタンパク質の3つのドメイン構造

ることが、大きな驚きでした。しかもこの現象は可逆的で、脱リン酸化酵素を働かせると、再びフィラメントを形成するとのこと。リン酸化によって、なぜこのようなことが起きるのか、その仕組みを探るため、リン酸化部位の解析をしようということで共同研究が始まりました。

用いた手法は当時では一般的なもので、まず、精製したビメンチンを試験管内で $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 存在下、cAMP 依存性キナーゼあるいはCキナーゼでリン酸化します。次に酵素による限定分解を行ったのち、放射線ラベルされたペプチド断片をHPLCで精製し、そのアミノ酸配列をプロテインシーケンサーで解析するというものでした。現在なら質量分析計を使うのですが、当時はESIもMALDIもまだ普及していませんでした。当初、簡単だと思っていたものの結果はなかなか得られず、名古屋の暑い夜に、HPLCカラムから溶出された多数のフラクションの放射線量を測定していたことが懐かしく思い出されます。結局、イオン交換と逆相のHPLCでペプチドの純度をあげることで、シーケンサーでリン酸化部位（主にSer）を決定するのに、エドマン分解時にリン酸化部位からはずれるリン酸基の放射線量を手がかりにするのではなく、リン酸化部位を化学的に他のアミノ酸誘導体に変換し、その位置をシーケンサーで決定することが鍵となって、結果が出るようになりました。この誘導化では、純化したリン酸化ペプチドを塩基性条件化でエタノールと反応させて、リン酸化Ser残基をS-エチルシステインに変換します。この反応ではリン酸基がはずれて途中にデヒドロアラニンを経由するのですが、この不飽和アミノ酸は九州大学大学院の学生時代に、恩師である泉屋信夫先生（現九州大学名誉教授）の研究室で抗菌性ペプチドのグラミシジンSに導入した経験があり、これも何かのご縁かと当時思いました。

最初に解析したビメンチンの結果は、cAMP 依存性キナーゼとCキナーゼによるリン酸化部位はすべてN末端のヘッドドメインに集中しているという興味あるものでした⁷⁾。その後、他のIFタンパク質について、いろいろなキナーゼによるリン酸化部位を稲垣研究室の若い人達が尽力して次々と決めていきました。これらの結果、IFタンパク質のヘッドドメインは種々のキナーゼによってリン酸化を受け、それが引き金となってIFを脱重合させることがわかりました。ヘッドドメインの重要性は、酵素の限定分解やタンパク質工学的手法によってヘッドドメインを除去したタンパク質がIFを形成しないことから、それまでにも指摘されていました。また、ヘッドドメインはArg残基を比較的多く含み、このアミノ酸の重要性も指摘されていました（ただし、Arg残基の位置や配列がIFタンパク質間で保存されていることはない）。リン酸基は、IF形成に重要なArg残基の働きをマスクすることによって、脱重合を誘起する可能性があります。

リン酸化部位の決定はその後、リン酸化部位に特異的な抗体の開発に発展しました。最初、抗原に使うリン酸化ペプチドは合成ペプチドにキナーゼを作用させて調製していましたが、まもなく化学的に合成できるようになりました。リン酸化ペプチドの化学合成は、ペプチド化学の分野でも一時期トピックになっていま

した。この抗体は、リン酸化されたIFタンパク質のみを特異的に認識し、非リン酸化体には反応しません。稲垣先生のグループはこの抗体を使って、細胞分裂期の前半（核分裂期）と後半（細胞質分裂期）で、異なる複数のキナーゼが、異なる細胞内局在でIFをリン酸化し、機能制御していることを見つけました⁸⁾。複数のキナーゼとしては、cdc2キナーゼ、Cキナーゼ、Rhoキナーゼなどが挙げられます。リン酸化部位に特異的な抗体は、その後、いろいろなタンパク質の細胞生物学的解析に応用されています。一方、IFタンパク質のリン酸化部位の解析は、各種キナーゼの基質認識機構の解析にも発展しました。中でも私が個人的に面白く感じたのはcdc2キナーゼで、この酵素はSer/Thr-Pro-Xxx-Arg/Lys-という配列のSer/Thrを好んでリン酸化するPro指向性のキナーゼです。この配列をもつペプチドのPro残基をGlyに置換してもリン酸化は起きませんが、sarcosine (N-Me-Gly) やN-Me-Alaに置換するとリン酸化が若干起り、6員環のpiperidine-2-carboxylic acid や4員環のazetidine-2-carboxylic acidではさらにリン酸化されやすくなり、やはり5員環のProが最もリン酸化されやすいという結果でした⁹⁾。酵素の識別能の繊細さを改めて認識しました。

5. IFタンパク質がIFをつくる仕組みはまだよくわかっていない

微小管とアクチンフィラメントの形成機構については、それぞれの構成タンパク質どうしが互いにどのような相対的な配置で重合しているのかが、既に解明されています。しかし、IFについてはまだ結論が出ていません。教科書によっては構成タンパク質からIFが組み立てられていくようすが図示されていますが、大部分は想像したものです。

IFタンパク質は多種類存在しますが、いずれも基本的に直径約10 nmのIFをつくります。ただし、1種類だけで重合してIFをつくるもの、複数の種類が重合することで初めてIFをつくるもの、単独でも複数でもIFをつくるものがあります。

IF形成機構の解析は、前述した試験管内でのIF形成実験によって主に進められてきました。ただし、最終的にIFを形成する条件（pH、イオン強度、温度など）はタンパク質によって異なるので、最適化が必要になります。その最適化が非常に困難な場合もあり、例えばラミンのIFはなかなか試験管内では形成できません¹⁰⁾。

今のところ、IFタンパク質がIFをつくる過程について、確かだと思われることは、IF形成のごく初期段階までです（図3）。まず、単量体のIFタンパク質が2本、平行にN末端とC末端をそろえて、ロッドドメインを介してコイルド-コイル構造をつくります。この段階でケラチンは必ずタイプIとIIが会合します。次に、2本の二量体が逆平行に並んで、半分の長さ程度ずれたように会合して四量体をつくります。そのずれ方にも2通りあって、N末端側半分どうしが重なり合う場合と、C末端側半分どうしで重なり合う場合があります。この四量体までは、主にアメリカNIHのSteinertら¹¹⁾や、ドイツMax Planck研究所のWeberら¹²⁾が、緻密なタンパク質化学の手法や電顕などを

用いて解明しました。しかし2通りの四量体がなぜできるのか、さらに四量体がどのような配置で会合することでIFとなるのか、その詳細はまだわかっていません。このように解析が進まない大きな原因として、IFタンパク質の不溶性が高く、結晶化しにくいことが挙げられます。

最近、ドイツがん研究所のHerrmannらは、電顕などの解析から、約8本の四量体が側面どうしで会合することで短いフィラメント（unit length filament, ULF）をつくり、このULFが縦方向に連結してIFをつくるという説を出しました²⁾。佐賀大学医学部に移った私は、理工学部の大石祐司先生に共同研究を申し込み、ビメンチンのIF形成過程を原子間力顕微鏡で立

体的に観察することにしました。その結果、1個のULFは見かけ上の長さが約80 nmで、4つのセグメント構造をもつことがわかりました。そしてULFに別のULFが1個連結するごとに長さにして平均40 nm、2つ分のセグメントずつ伸長するという結果を得ました。これらの結果から詳細は略しますが、ULFとそれが縦方向に多数連結したIFの中では、四量体はフィラメントの軸方向に平行に配置しているのではなく、フィラメントの軸に対して約10度の角度で（おそらく右回りに）互いにねじれあうように配置しているというモデルを提出しました¹³⁾（図4）。今後このモデルを検証するには、例えば高分解能の電子顕微鏡を用いた三次元像解析などの手法が必要だと思われます。

6. ヘッドドメインの役割

リン酸化部位の決定以降、ヘッドドメインはIF形成でどんな役割を担っているのかが気になります。可能性として、ヘッドドメインは他のドメインと相互作用することによってIFタンパク質間の会合に働くことが考えられます。そこで私は、ヘッドドメインと相互作用する相手領域の探索を行いました。まず、ビメンチンをリジルエンドペプチダーゼで処理することによってヘッドドメイン（96残基）を切り出し、これを表面プラズモン共鳴装置（BIAcore）のセンサーチップ上に固定化しました。そこにタンパク質工学の手法で調製したロッドドメインや各サブドメインを流し、結合するものを探しました。テイルドメインは欠失させてもIFを形成するので、候補から除外しました。その結果、ロッドのC末端に位置する2Bサブドメイン（97残基）が濃度依存的に強く結合することが示されました。さらに2BサブドメインのN末端を順次欠失させても結合には影響しませんが、保存されたC末端20残基を欠失させると結合が消失しました。次に、C

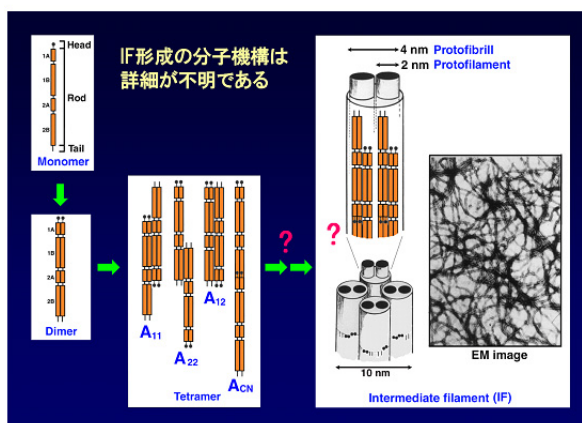


図3 IFの形成過程

四量体（Tetramer）のうち、 A_{11} と A_{22} はそれぞれ二量体が2本、逆平行にN末端側半分あるいはC末端側半分で重なりあっている。 A_{12} は逆平行で両末端が揃っている。 A_{CN} はULF 1個では存在せず、ULFの連結によって形成される構造。

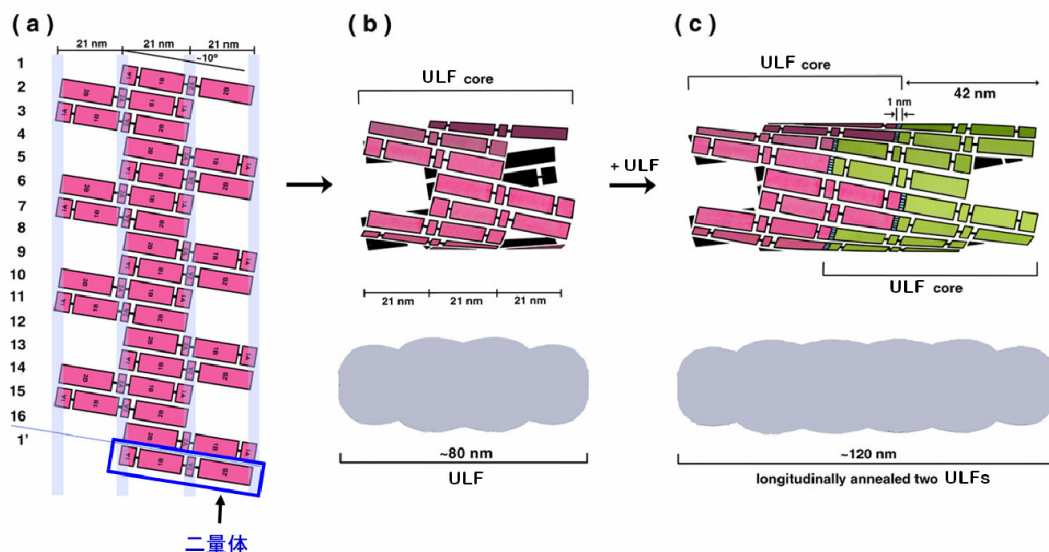


図4 ULFの形成とその連結のモデル

(a) (b) 二量体が A_{11} 、 A_{22} 、 A_{12} の様式で四量体を形成しながら合計16本（四量体としては8本）会合してULFを形成する。図の赤い四角はロッドドメインを表す。四量体はフィラメント軸（水平方向）に対して約10度の角度で互いにねじれあっている。ヘッドとロッド（図では省略）は重なり合って、セグメント構造の凸部分を形成する。(c) 2つのULFは末端を櫛合わせるように連結する。その結果、軸方向に約40 nm、2つ分のセグメントの長さだけ伸長する。この連結で A_{CN} の配置が形成される。

末端20残基に相当する合成ペプチドをセンサーチップに固定化したところ、ヘッドドメインは結合しましたが、cAMP 依存性キナーゼでリン酸化したヘッドドメインは結合しませんでした¹⁴⁾。これらの結果から私達は、ビメンチンのヘッドドメインは、2BサブドメインのC末端20残基と相互作用することで、IF形成に働いていると結論しました。一方最近、カリフォルニア大のグループは電子常磁性共鳴(EPR)スペクトルの解析から、四量体において、ビメンチンのヘッドドメインはロッドのN末端に位置する1Aサブドメインと相互作用するという報告をしています¹⁵⁾。また、Max Planck 研究所のTraubらは、溶液中で形成されたヘッドとロッドドメインの複合体を超遠心機で分離する手法を用いて、ヘッドはロッドのN末端側半分よりもC末端側半分と強く結合することを示しています¹⁶⁾。IFタンパク質とそのフラグメントは、会合状態によって表面構造が変化する可能性も考えられ、こういったところにもIF研究の難しさがあります。

一方、ヘッドドメインのIF形成に重要な構造要素を探る目的で、このドメインにアミノ酸置換や部分的な欠失を導入した変異体がこれまでに多数調製されました。一つ例をあげると、タイプⅢに属するIFタンパク質は、ヘッドドメインのN末端近傍に-Tyr-Arg-Arg-Xxx-Phe-という配列を共通してもつため、その意義について関心がもたれていました。Herrmannらは、この配列のArgと芳香族アミノ酸を別々に他のアミノ酸に置換した*Xenopus*ビメンチンの変異体を調製したところ、いずれも正常なIFを形成せず、電顕で凝集体のみを観察したことから、このタイプⅢの保存配列はIF形成に必須であると報告しました¹⁷⁾。しかし実験はやってみないとわからないもので、私達もmouseビメンチンで同様な変異体を調製したのですが、Argを置換するとやはりIFを形成しませんが、芳香族アミノ酸(特にTyr)を置換すると意外にもULFの連結が野生型よりも速く進行し、短時間でIFを形成することがわかりました¹⁸⁾。しかし形成されたIFは互いに集まって束になる傾向が見られたため、それを防ぐためには重合条件として加えるNaCl濃度をビメンチンに最適な150 mMから50 mMに下げる必要がありました。このNaCl濃度では、ULFの連結速度は通常に戻りました。少なくともこの結果は、ヘッドドメインの配列がIF形成に最適な塩濃度を左右することを示しています。理由はまだわかりませんが、上記配列中のArg残基がIF形成時のロッド(1A? 2B?)との相互作用に重要で、そのArg残基のコントロールに近傍の芳香族アミノ酸(特にTyr)が働いている可能性を考えています。ご周知のようにArg残基はフォールディングやタンパク質間相互作用において重要で、水素結合、疎水性相互作用、cation- π 相互作用など多機能性を発揮しますが、Tyrはcation- π 相互作用の最適な相手残基です。

7. IFタンパク質の分子進化の解析

上記3. で述べたようにIFタンパク質は共通する構造的特徴をもつことから、ある祖先型タンパク質から分子進化してきた可能性が考えられます。前出のWeberらは無脊椎動物の細胞質に存在するIFタンパク質やその遺伝子を解析し、その構造が核ラミンと脊椎

動物の細胞質型IFタンパク質の中間的な構造であることを報告しました¹⁹⁾。具体的には、ロッドドメインは核ラミンのように約350残基なのですが、テイルの核移行シグナルと膜結合用のイソプレニル化部位を欠いていたのです。私は佐賀大学医学部の高井成幸先生(現 佐賀大学名誉教授)から、プラナリア(左右対称な動物の中で最も単純な構造をもつ扁形動物)の面白さについて伺っていたこともあり、この動物がもつIFタンパク質の遺伝子解析を始めました。佐賀市近郊の古湯温泉から少し山登りした小川で、プラナリアを採集しました。余談ですが、採集方法は高井先生のオリジナルで、30分程で大きいものから小さいものまで、ウヨウヨ獲れました。採集後は、温泉に入ってから大学に帰るのが習慣でした。ちなみにその小川のプラナリアは、既に高井先生らが5S rRNAの配列を決めた血統書つきです。遺伝子技術を農学部の穴井豊昭先生に教えていただきながら、cDNAクローニングとシーケンス解析を行いました。その結果、ロッドドメインは約350残基で核ラミンに長さが匹敵するのですが、核移行シグナルとイソプレニル化部位を欠く細胞質型のIFタンパク質をコードしていました。その後、*in situ hybridization*や医学部の河野 史先生からご指導いただいた免疫電顕などで、このタンパク質はプラナリアが岩などに粘着する際に働く細胞で特異的に発現されていることがわかりました[論文作成中]。

これまでのところ、IFタンパク質の祖先型は核ラミンの構造に近く、その後、核移行シグナルとイソプレニル化部位を失って無脊椎動物の細胞質型IFタンパク質に進化し、さらにロッドドメインの1Bサブドメイン42残基を失って脊椎動物の細胞質型IFタンパク質へと進化したと考えられています。脊椎動物の細胞質型IFタンパク質は、多様に分化した細胞の機能に対応できるように、さらに分子進化してきた可能性があります。

8. IFのナノ素材としての解析と応用

2. でIFは細胞骨格成分の中で最も安定な構造体であると記述しましたが、IFの材料科学的な特性を明らかにする解析が種々進められています。例えば、粘弾性を解析した報告がなされており、IFのネットワークはアクチンフィラメントや微小管に比べてやわらかく弾性があり、剪断されにくいことが示されています²⁰⁾。また、ビメンチンとデスミンはどちらもタイプⅢに属しますが、後者の方がより剪断されにくいなどの違いが指摘されています²¹⁾。最近では、九州大学理学部の水野大介先生らのグループが、ビメンチンIFのネットワーク中に微小なコロイド粒子を埋め込み、その運動性から力学的特性を評価するマイクロレオロジーの解析を進めておられます[論文作成中]。一方、原子間力顕微鏡のカンチレバーで直接、IFの1本ずつに力刺激を加えて、その変形(伸張や崩壊)のようすからIFの力学特性を評価する解析も行われています²²⁾。今後は、IFタンパク質の種類や疾患関連の変異によって、IFの力学特性がどのように異なるのかについても解析が進められるでしょう。

IF構造の特殊性を利用して、新たなナノ構造を構築することも、今後の興味あるテーマです。最近、佐

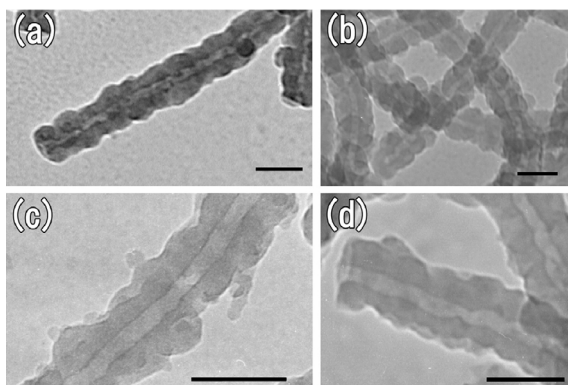


図5 ビメンチンIFを鋳型にしてつくったシリカナノチューブの透過型電子顕微鏡像（スケールバー：50 nm）

賀大学理工学部の中島謙一先生との共同研究で、ビメンチンのIFを鋳型にしてtetraethoxysilaneの重合を行わせ、その後、サンプルを焼結することでシリカのナノチューブを形成することに成功しました²³⁾ (図5)。このナノチューブは長さ数 μm 、外径35–55 nm、内径約10 nmで、その表面に見られる周期的な“こぶ”状の構造はIFのセグメント構造を反映している可能性があります。今後は、IFタンパク質と他のタンパク質のカメラを作製することにより、新しい機能性ナノ素材をつくり出せるのではないかと期待しています。

9. おわりに

近年、IFは単なる細胞の機械的支持体として機能するばかりではなく、細胞内シグナル伝達、アポトーシス、組織の損傷治癒などにも深く関連することが報告されるようになりました。IFは縁の下の方力持ちとして派手さはありませんが、最初考えられていたよりも広範な機能を細胞内で果たしている可能性があります。IFタンパク質が分子進化によって種類を増やしてきた理由や意義が、これからの構造・機能相関の研究で解明されていくと思います。さらに、こうしたIFに関する基礎研究の成果が、今後、医療現場での病気の診断や、組織再生などの分野で応用されることを期待しています。IFの研究人口は、欧米に比較して日本では少ないのが現状です。この拙文がきっかけとなって、IFに関心をもって頂ける方が増えれば幸いです。

ここで紹介した研究では、本文中にお名前を記させていただいた多くの先生方にお世話になりました。改めて心よりお礼申し上げます。また、実際に実験に取り組んでくれた佐賀大学医学部 郷原みさん、田端寿美氏、学生諸氏に感謝いたします。

最後にペプチドニュースレターに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 寛先生に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) H. Ishikawa, R. Bischoff, H. Holtzer, *J. Cell Biol.* **38** (1968) 538–555.
- 2) H. Herrmann, U. Aebi, *Annu. Rev. Biochem.* **73** (2004) 749–789.
- 3) U. Aebi, J. Cohn, L. Buhle, L. Gerace, *Nature* **323** (1986)

560–564.

- 4) J.E. Eriksson, T. Dechat, B. Grin, B. Helfand, M. Mendez, H.M. Pallari, R.D. Goldman, *J. Clin. Invest.* **119** (2009) 1763–1771.
- 5) R.M. Evans, L.M. Fink, *Cell* **29** (1982) 43–52.
- 6) M. Inagaki, Y. Nishi, K. Nishizawa, M. Matsuyama, C. Sato, *Nature* **328** (1987) 649–652.
- 7) S. Ando, K. Tanabe, Y. Gonda, C. Sato, M. Inagaki, *Biochemistry* **28** (1989) 2974–2979.
- 8) M. Inagaki, Y. Matsuoka, K. Tsujimura, S. Ando, T. Tokui, T. Takahashi, N. Inagaki, *BioEssays* **18** (1996) 481–487.
- 9) S. Ando, T. Ikuhara, T. Kamata, Y. Sasaki, S. Hisanaga, T. Kishimoto, H. Ito, M. Inagaki, *J. Biochem.* **122** (1997) 409–414.
- 10) K. Isobe, R. Gohara, T. Ueda, Y. Takasaki, S. Ando, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71** (2007) 1252–1259.
- 11) P.M. Steinert, L.N. Marekov, D.A. Parry, *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 24916–24925.
- 12) N. Geisler, J. Schunemann, K. Weber, *Eur. J. Biochem.* **206** (1992) 841–852.
- 13) S. Ando, K. Nakao, R. Gohara, Y. Takasaki, K. Suehiro, Y. Oishi, *Biochim. Biophys. Acta* **1702** (2004) 53–65.
- 14) R. Gohara, D. Tang, H. Inada, M. Inagaki, Y. Takasaki, S. Ando, *FEBS Lett.* **489** (2001) 182–186.
- 15) A. Aziz, J.F. Hess, M.S. Budamagunta, J.C. Voss, P.G. Fitzgerald, *J. Biol. Chem.* **285** (2010) 15278–15285.
- 16) P. Traub, A. Scherbarth, W. Wieggers, R.L. Shoeman, *J. Cell Sci.* **101** (Pt 2) (1992) 363–381.
- 17) H. Herrmann, I. Hofmann, W.W. Franke, *J. Mol. Biol.* **223** (1992) 637–650.
- 18) R. Gohara, S. Nishikawa, Y. Takasaki, S. Ando, *J. Biochem.* **144** (2008) 675–684.
- 19) A. Erber, D. Riemer, M. Bovenschulte, K. Weber, *J. Mol. Evol.* **47** (1998) 751–762.
- 20) P.A. Janmey, U. Euteneuer, P. Traub, M. Schliwa, *J. Cell Biol.* **113** (1991) 155–160.
- 21) M. Schopferer, H. Bar, B. Hochstein, S. Sharma, N. Mucke, H. Herrmann, N. Willenbacher, *J. Mol. Biol.* **388** (2009) 133–143.
- 22) L. Kreplak, H. Herrmann, U. Aebi, *Biophys. J.* **94** (2008) 2790–2799.
- 23) R. Gohara, D. Liu, K. Nakashima, Y. Takasaki, S. Ando, *J. Biochem.* **146** (2009) 627–631.

あんどう しょうじ
 崇城大学 生物生命学部 応用微生物工学科
 andosho@bio.sojo-u.ac.jp

15th Korean Peptide and Protein Symposiumの 参加報告

昨年の12月1日に15th Korean Peptide and Protein Symposium (KPPS) が韓国 Ochang にて開催されました。本学会のChairはSeoul National UniversityのYoon-Sik Lee 先生です。私は今回幸運にもTravel awardを頂き、この学会に参加してきました。



畠中 孝彰

開催地であるOchangはソウルより100 km程南の韓国中部に位置しており、Incheon 空港からはバスとタクシーを乗り継いで3時間程度かかります。今回の学会が私の初の韓国遠征であり、行きは私一人だったため、当初は目的地に到着できるかどうか非常に不安でした。しかし、なんとかなるものですね。交通機関がよく整っていたのが大きいですが（特にタクシーの数が多い上に安い）、意外にもすんなり開催場所のKorean Basic Science Institute (KBSI) Ochang Centerに到着することが出来ました。Ochang Centerに到着後も、ゲートの管理人さんに訪問理由を告げると、夜中であつたにもかかわらず、すぐに今回のシンポジウムの世話人の一人であるJeong Kyu Bang 先生が迎えに来てくれました。Bang 先生は日本での研究経験があるとのことでしたが、それにしても日本語が上手く、フランクな方だったのが印象的でした。その後、Bang 先生に2日間お世話になるドミトリへ案内していただいたのですが、部屋に入った瞬間のほっとした気持ちは忘れることができません。トラブルに合うことはなかったのですが、長距離を移動したことや、日本からのフライトの都合により、Ochang Centerに到着したのが21時前後になってしまったこと、さらには、Ochang Centaerは研究施設ですので周辺にはほとんど何もなく、200 mほど先に一軒コンビニの光が見えるだけだったことなど、不安だらけの一日目でした。余談ですが、ドミトリは非常に新しく、トレーニングルームも併設されており、夜中にもかかわらずトレーニングされている方がいらっしゃいました。また、各部屋にはエアコンと床暖房、シャワールームが整備されて



KBSI Ochang crener 入場ゲート

おり、エアコンは操作リモコンがハングル文字で表記されていたため全く使いこなせませんでしたが、床暖房が暖かく2日間快適に過ごすことが出来ました。

シンポジウム当日、受付には多くの人が集まっており、外見だけでは日本人と韓国人を区別するのはなかなか困難でしたが、よく観察してみると、話しをしている人々が韓国の学生もしくは先生方、おとなしい人々が日本人学生という非常にわかりやすい構図でした。同じような外見の集団の中で、聞こえてくる言葉が全く理解できないというのは不思議な感覚ですね。シンポジウムはYoung scientist symposiumから始まり、Plenary Lecture, Structure of Peptide and Proteins, Synthetic Methods, Peptide Discoveryと5つのトピックで計17人の方の研究発表を聞くことができました。Young scientist symposiumにおいては、韓国学生8人が熱心にそれぞれの研究内容を英語で発表されました。彼らの英語が非常に流暢であることに驚きつつも感心し、とても良い刺激を受けました。彼ら全員が賞をもらっていたのも頷けます。また、日本人研究者としては、東海大学の北條裕信先生が糖タンパクの合成法について、私の担当教官である鹿児島大学の伊東祐二先生がIgA結合ペプチドのデザインについてそれぞれ発表され、熱いディスカッションを交わされておりました。私もポスターセッションに演題を登録しており、前日から発表のイメトレをばっちりとしていたのですが、いざ出番がきてみると、ほとんど発表を聞きに来てもらえないという初めての経験をしました。ポスターを眺めに来た学生に「Can I explain?」と声をかけもしたのですが、首を横に振られる結果となり、やるせない気持ちになると共に、発音が悪かったのか？それとも表現？いやどちらも？それともまさか怖かった？と、自分に足りない英語力を再認識する良い機会になりました。いえ、本当はちょっと凹みました。発表を聞きに来てもらえないのがこんなに辛いとは。。。日本の学会でも、海外の方のポスター発表を聞きに行く学生は少ないですが、彼らの気持ちを何となく感じる事ができたので、これからは積極的に聞きに行こうと思います。

その後の発表においても、The Catholic University (ソウル) のEun Seong Lee 先生が発表されたpHセンシティブな多糖を用いた薬剤のデリバリーに関する研究や、Dongguk University (ソウル) のTak Jin Kang 先生が発表されたpeptidyl-tRNAのdrop-offを利用した環状ペプチドの合成など、興味深い内容のものが多く、非常に良い勉強になるとともに、今後の研究にさらに意欲が沸く機会となりました。その夜のBanquetでお酒が出なかったのは少々残念でしたが、終始和やかな雰囲気美味しい韓国料理を楽しめたのはいい思い出です。

翌日、ソウルまで戻る際には、韓国版の新幹線KTX (Korea Train eXpress) を利用しました。日本の新幹線と同じようにあまり揺れることもなく、バスとタクシーで3時間近くかかった距離も40分程度で走破し、車内は無線LANも使える非常に便利な電車でした。また、韓国といえば焼肉という安易な発想から、ソウル市内にて焼肉をいただいたのですが、当時日本では幻と化していたユッケを食べることができたのは

感動的でした。

以上今回の15th KPPSにおいては、日本の学会とは勝手が違ったためいろいろと戸惑うこともありましたが、興味深い話を沢山聞くことができ、海外での貴重な体験も多くしました。これらの経験を今後の研究や、次の国際学会に生かしていきたいと思います。ま



2013年大阪にて開催されるAsia-Pacific international peptide symposiumと50回日本ペプチド討論会の宣伝

た、最後になりましたが、今回の15th KPPS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、そしてこのような執筆の機会を与えて下さった九州工業大学大学院の坂本寛先生、その他ペプチドニュースレター編集委員の先生方に心より感謝申し上げます。



KTX (Korea Train eXpress)



Osong 駅構内にて 左から、東海大学 朝比奈雄也さん、私、東海大学 北條裕信先生



ソウル市内の焼肉屋にて 左 私、右 伊東先生



ソウル駅構内

はたなか たかあき
鹿児島大学大学院 理工学研究科
システム情報科学専攻
k7808291@kadai.jp

AKABORI MEMORIAL AWARD 2012 Call for Nominations

This award was established in 2000 by the Japanese Peptide Society in commemoration of Dr. Shiro Akabori based on the donation by Dr. Rao Makineni. We are now calling for Nominations for the Akabori Memorial Award 2012 until June 30, 2012. The recipient of the Akabori Memorial Award 2012 will present his/her Award Lecture at 49th Japanese Peptide Symposium to be held in Kagashima, Japan from November 7th to 9th, 2012.

Past recipients

2000 Gunther Jung (University of Tübingen, Germany)
2002 Yasutsugu Shimonishi (Osaka University)
2004 Geoffrey Tregear (Howard Florey Institute, Melbourne, Australia)
2006 Jean Martinez (Universités Montpellier I et II, France)
2008 Yoshiaki Kiso (Kyoto Pharmaceutical University)
2010 Stephen Kent (University of Chicago)

How to submit a nomination:

1. A brief statement of nomination (no more than 1,000 words).
 2. The nominee's Curriculum Vitae and List of Publications.
 3. One additional recommendation letter in support for the nominee.
 4. No more than 5 selected reprints (PDF files).
- PDF files of all the documents should be sent by e-mail.

Deadline, June 30, 2012.

The nominating documents should be sent to:

Dr. Yoshiaki Kiso
Chair, Akabori Memorial Award Committee
Laboratory of Peptide Science
Nagahama Institute of Bio-Science and Technology
1266 Tamura Cho, Nagahama City, Shiga 526-0829,
JAPAN
Tel: 81-749-64-8100
Fax: 81-749-64-8140
E-mail: y_kiso@nagahama-i-bio.ac.jp

第44回若手ペプチド夏の勉強会開催のお知らせ

昨年は、東日本大震災の影響で開催を見合わせましたが、今年は44回目の勉強会を大阪にて開催いたします。今回は、大阪府大阪市にあります「ロッジ舞洲」(JR大阪駅からJR桜島駅まで約15分、JR桜島駅から施設までバスで約15分)にて、2泊3日で行います。若手研究者の相互親睦ならびに、それぞれのペプチド研究領域を超えた活発な議論ができる勉強会を目指して現在準備を進めています。参加方法等の詳細に関しては、追ってメール等にてお知らせいたします。夏の暑さに負けない、多数の「熱い」若手参加者をお待ちしております。

日時：平成24年8月5日(日)～7日(火)
場所：ロッジ舞洲 LODGE MAISHIMA
〒554-0042 大阪市此花区北港緑地2-3-75
TEL 06-6460-6688, FAX 06-6460-6700
<http://lodge.maishima.jp/>

世話人：島本 茂(近畿大学理工学部)
真鍋良幸(大阪大学大学院理学研究科)
(第44回若手ペプチド夏の勉強会に関してのお問い合わせは、E-mail: sshimamoto@life.kindai.ac.jp (島本)までお願い致します)

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：坂本 寛)