



#### 細菌のコミュニケーション

#### “クオラムセンシング”:

#### 次世代創薬ターゲットになり得るか?

##### 1. 細菌も会話している?

正確な時期は定かではないが、ヒトは歴史上のある時点で共通化された発声方法および文字、すなわち「言語」を獲得した。そして、高度に発達した言語を活用することで、個人対個人の意志・思考・概念・感情の共有、さらには地域・国といった、集団間での交渉や取り決めを円滑に行えるようになった。このことが、有史以来極めて高度な文化を築き上げることを可能とし、ヒトをヒトたらしめている要因の一つであることは疑いの余地がない。一方、ヒトの場合ほどに複雑ではないが、ヒト以外の動物も音声（もしくは音波）、またはフェロモンなどの化学物質を言語として用いることで、意思伝達や相互感知を行うことがわかっている。おそらく、広義の「言語を介したコミュニケーション」という形態は、生命の進化の過程で徐々に形成されていったものなのであろう。一体どれほど多様な生物がそのような機構を有しているのであろうか?

近年の研究により、単純な構造からなる真性細菌（細菌）にも、シグナル分子を介した細胞間情報伝達システムが存在することが明らかになっている。この機構は“クオラムセンシング (quorum sensing)”と呼ばれ、環境中に存在する菌密度を互いに感知し合うことで、自分達自身の行動、つまり特定の遺伝子の発現・抑制による形質発現の最適なタイミングを決定する<sup>1,2)</sup>。その名の通り、“quorum (議会などの定足数の意)”を“sense (感知)”する機構なのである。クオラムセンシングは実に多くの種でその存在が確認されており、また緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) といった、時に深刻な病原性を示す細菌の病原因子発現にも深く関わっている。このことから、クオラムセンシングは細菌感染症治療における新たなターゲットとして近年注目を集めている<sup>3,5)</sup>。本稿では、*S. aureus*を代表例として、ペプチド性シグナル分子が関わるクオラムセンシングの機構研究と、治療を目指した応用例を紹介したい。



土釜 恭直

##### 2. クオラムセンシングのメカニズム

クオラムセンシングを媒介するシグナル分子はオートインデューサー (AI) と呼ばれる。これまでに複数のAIが発見されているが、主に3つのクラスが多くの細菌で利用される。1つ目は、アルキル鎖を有するアシルホモセリンラクトン (AI-1) であり、グラム陰性菌によって産生、利用されている。AI-1の炭素鎖の長さは菌種の違いによって異なり、また同一菌種内でも複数のAI-1が用いられる。一方、2つ目のクラスであるAI-2は、4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) を共通前駆体としたシグナル分子で、その合成酵素はグラム陰性、陽性菌いずれにも見られる。興味深いことに、AI-1が同一種内での情報伝達のみを担うのに対し、AI-2は同一種内だけでなく他菌種間での相互モニタリングにも利用されていると考えられている。正に、細菌世界の英語のような存在といったところである。AI-1、AI-2に関する詳細は、いくつかの文献を御覧頂きたい<sup>5,7)</sup>。

そして3つ目のクラスは、グラム陽性菌によって産生、利用されるペプチド性シグナル分子 AutoInducing Peptide (AIP) である。AIPの構造は、菌種によって多岐に渡り、直鎖状のものから環状ペプチドの場合もある。ここでは、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) によって用いられるAIPの構造を例として示した (図1)。システイン残基上でチオエステル結合によって架橋された環状ペプチドで、異なる配列を有する4つのサブクラス (AIP-1, -2, -3, -4) が同定されている<sup>8)</sup>。*S. aureus*の菌株は4つのAIPのいずれかを利用するため、AIPに対応してグループ I ~ IV のように分類される。

次に、AIPが媒介するクオラムセンシング機構の

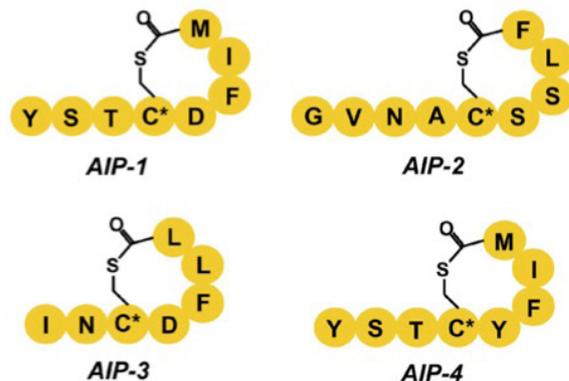


図1 AIP-1,-2,-3,-4の構造

概要を示す<sup>8)</sup>(図2)。なお、その他のシグナル分子の系においても、関与するタンパク質やターゲット遺伝子、構造修飾の有無などの細かい差異はあるが、基本的なメカニズムは共通している。*S. aureus*の場合、*agr*と呼ばれる一群の遺伝子によって制御されている。まず、AIP前駆体であるオリゴペプチドAgrDが合成され、トランスポーターであるAgrBを通じて細胞外へと放出される。このとき同時に、AgrBによって構造修飾を受けることでAIPに変換される。環境中のAIPの濃度は、細胞数、すなわち菌密度と比例する。菌密度の上昇によりAIPが一定の濃度に達すると、AIPと対応する膜表面上のレセプタータンパク質AgrCとの結合が促進される。AgrCはヒスチジンキナーゼと共役した二成分制御系であり、AIPの結合によりAgrAを介したリン酸化カスケードを引き起こす。その結果、エフェクター遺伝子RNAIIIの転写が促進されることにより、毒素やバイオフィーム形成に関わる各種分泌タンパク質や膜タンパク質の発現のスイッチングが行われる。また、リン酸化されたAgrAは*agr*オペロン全体の転写も促進するため、一度シグナル伝達が成立すると一連のサイクルは自己増幅的に進行していくことになる。このメカニズムにより、菌密度依存的な、言い換えれば成長フェーズに合わせた遺伝子発現の調節を達成している。増殖初期はまだ細菌数が少なく生存に不利なので、増殖に有利な環境整備に専念し、十分な増殖が見込める段階に達したときに初めて宿主への攻撃を開始するわけである。興味深いことに、*S. aureus*の各菌株グループ(I~IV)が利用するAIPとは異なるサブクラスのAIP(heterologous AIP)では、AgrCとの結合様式が変化するため、シグ

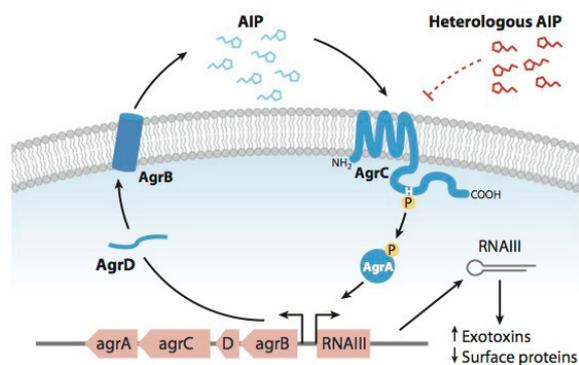


図2 AIPが媒介するクオラムセンシング機構(参考文献8より)

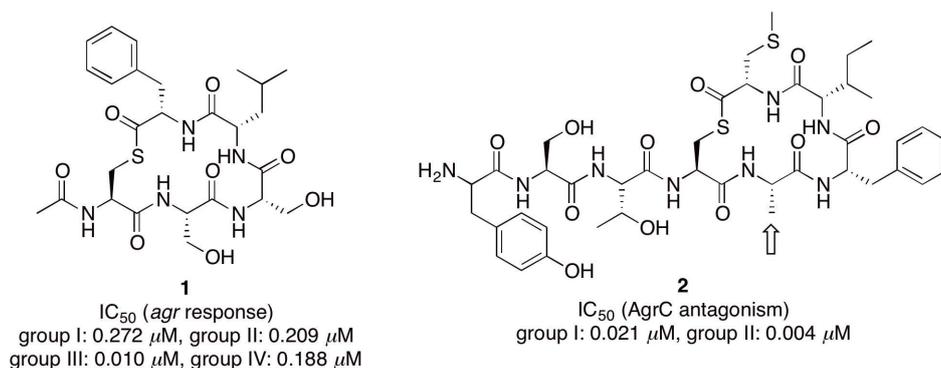


図3 グローバル阻害活性を示すAIPアナログ(矢印はAspからAlaへの変更部分)

ナル伝達が進行せずに結果的にクオラムセンシングを阻害してしまう。これは、同じ*S. aureus*といっても、菌株グループが異なればはや“敵”であり、お互い妨害し合うことを意味する。実際に、I~IVのグループ分けは進化の系統分類に関連している<sup>8)</sup>。クオラムセンシングが、自己の遺伝子の繁栄を最適化するために構築された実に巧妙なシステムであることが垣間見える一例である。

### 3. AIPアナログによる*agr*-クオラムセンシングの制御

前項で、*S. aureus*が*agr*オペロンによって駆動するクオラムセンシングを基に、バイオフィーム形成や毒素産出のタイミングをコントロールしていることを述べた。したがって、この機構を任意に制御することができれば、毒素産出を停止させるなど病原性抑制へと応用できると考えられる。この考え方は、*S. aureus*の*agr*欠損株において皮膚膿瘍<sup>9,10)</sup>や心内膜炎<sup>11)</sup>といった症状の呈示が有意に低減したことを示した動物実験からも支持されている。Muir, Novickらのグループは、前項で述べたAIPサブクラスが有する交差阻害活性に着目し、AIPのアナログ合成および活性評価による構造活性相関研究、ならびに有用なクオラムセンシング阻害剤探索を行った<sup>12)</sup>。その結果、*S. aureus*の菌株グループI~IV全てに対して阻害活性を示すグローバル阻害剤**1**(図3)を見出した。**1**はAIP-2のテール部分をもたない類縁体であるが、グループI, III, IVだけでなく、ペアレントグループであるグループIIの株に対しても高い阻害活性を示した。そして彼らは、AIPの環状骨格はレセプタータンパク質AgrCの認識に重要であり、残りの2~3アミノ酸残基からなるテール部位は、シグナル伝達に重要なAgrCの活性化を担っているのではないかと推測している<sup>13)</sup>。一方でChanらは、AIP-1をベースとしたアナログ**2**(図3)が*S. aureus*のグループI, II両方の種に強い阻害活性を示すことを報告した<sup>14)</sup>。**2**はAIP-1の環状骨格上のアスパラギン酸をアラニンに置換したアナログであり、Muir, Novickらのアナログ**1**とは異なりテール部分は修飾されずにそのまま残っている。それにもかかわらず、ペアレント菌株(この場合はグループI株)に対しても阻害活性を示した点を考慮すると、先に述べた考察(環状部位: AgrCの認識, テール部位: AgrCの活性化)ほど作用メカニズムは単純ではない

と思われる。詳細なメカニズム解明にはさらなる構造活性相関研究が待たれるところであるが、いずれにせよ「AIPアナログの設計・合成・利用」は、*agr*システムの理解、制御および治療への応用に向けた有用なアプローチとして期待される。

#### 4. 抗 AIP 抗体：S. aureus 感染症治療に向けて

最後に、筆者が在籍しているKim D. Janda 研究室で達成された、抗 AIP 抗体による*agr*-クオラムセンシング機構の制御研究について紹介したい<sup>15)</sup>。クオラムセンシングを阻害するためには、レセプタータンパク質を塞ぐという方法だけでなく、シグナル分子そのものをなんらかの方法で除去してしまうという戦略もあり得る。そこで彼らは、AIPに対する抗体を取得・利用することで、*agr*システムを効率良く阻害できると考えた。抗体は、その特異性の高さから次世代型医薬の一つとして近年注目されている通り、医薬品としてのポテンシャルが高いため、得られた成果をそのまま創薬研究へと応用しやすいという狙いもあった。

まず彼らは、AIP-4の構造を基にハプテン $3$ を設計、合成した(図4)。AIPに含まれるチオラクトン構造は、抗体作製の過程で加水分解もしくはアミノリシスにより開環してしまう可能性があったため、ハプテン $3$ ではより安定なラクトン構造に置換している。そして、リンカーを介してキャリアタンパク質とのコンジュゲートを作製し、マウスの免疫化後、モノクローナル抗体 AP4-24H11 ( $K_d$ (AIP-4) ~ 90 nM) を得ることに成功した。

AP4-24H11を添加して*S. aureus* (グループIV) を培養すると、予想通りAIP-4の作用が中和されることにより、*agr*システムに支配されている $\alpha$ -hemolysin, protein Aの発現が制御されることがわかった(図5)。ここで注意したいのは、通常、*S. aureus*の*agr*-クオラムセンシングが“オン”になると、 $\alpha$ -hemolysinの発現は促進され、protein Aの発現は抑制されるという点である。つまり、AP4-24H11を添加すると、 $\alpha$ -hemolysinの発現は抑制できる代わりにprotein Aの産生が促進されてしまう。しかし、*S. aureus* 感染による急性疾患の場合は、 $\alpha$ -hemolysinによって引き起

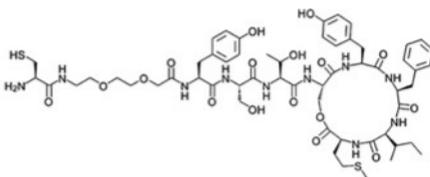


図4 AIP-4構造を基にしたハプテン $3$

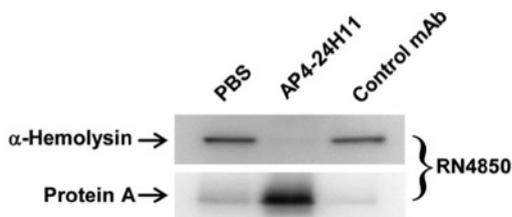


図5 ウェスタンブロッティングによる*S. aureus* (RN4850株)の $\alpha$ -hemolysinおよびprotein Aの発現解析

こされる免疫細胞や組織細胞破壊が最も深刻である。従って、急性症状の治療という観点から見れば、AP4-24H11の利用は十分価値あるものと考えられる。実際にJandaらは、*S. aureus*に感染させたヌードマウスを用いたモデル実験によってその有用性を例証している(図6)。AP4-24H11を投与しなかった場合、大きな皮膚膿瘍を発症し、ほとんどの個体(>80%)が24時間以内に死亡した。一方、AP4-24H11を投与した場合、顕著な膿瘍形成は確認されず、全ての個体が観察期間の8日間生存した。本報告は、AIP-*agr*システムの制御というアプローチが、臨床応用に向けて有用な戦略になり得ることを直接示した点で意義深い。

#### 5. おわりに

古の時代より細菌感染症は人類にとっての脅威であり、「20世紀の奇跡」とまで称えられた抗生物質の登場は、細菌との戦いに終止符を打つものと思われた。しかし、抗生物質の乱用は、細菌達を驚くべきスピードで進化させ、近年になって多剤耐性菌まで出現してしまう事態となった。もはや抗生物質一辺倒では太刀打ちできなくなる日も近いかもしれない。細菌にとって抗生物質とは、自らの生命を脅かす存在であるため、過度の使用は強力な進化圧として作用する。一方、クオラムセンシングの妨害は、直接生命活動を停止させられるわけではなく、「会話」を止められるだけなので、強い進化圧にはなりにくいと考えられている。クオラムセンシング機構には未だに不明な点も多いが、今後さらに解明されていけば、感染症治療におけるパラダイムシフトの起点になるかもしれない。

最後に、ペプチドニュースレターに寄稿の機会を与えてくださいました早稲田大学の小出隆規先生に深く感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Fuqua, W. C.; Winans, S. C.; Greenberg, E. P. *J. Bacteriol.* 1994, **176**, 269-75.
- 2) Engebrecht, J.; Neilson, K.; Silverman, M. *Cell* 1983, **32**, 773-81.
- 3) Suga, H.; Smith, K. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003, **7**, 586-91.
- 4) Rasmussen, T. B.; Givskov, M. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006, **296**, 149-61.
- 5) Lowery, C. A.; Salzameda, N. T.; Sawada, D.; Kaufmann, G. F.; Janda, K. D. *J. Med. Chem.* 2010, **53**, 7467-89.
- 6) Tsuchikama, K.; Lowery, C. A.; Janda, K. D. *J. Org. Chem.*



図6 *S. aureus* (RN4850株) 感染ヌードマウスを用いた AP4-24H11による膿瘍形成阻害  
上段：*S. aureus* ( $1 \times 10^8$  cells)+ PBS, 下段：*S. aureus* ( $1 \times 10^8$  cells)+ AP4-24H11 (0.6 mg)

- 2011, **76**, 6981-9.
- 7) Ng, W. L.; Bassler, B. L. *Annu. Rev. Genet.* 2009, **43**, 197-222.
- 8) Novick, R. P.; Geisinger, E. *Annu. Rev. Genet.* 2008, **42**, 541-64.
- 9) Mayville, P.; Ji, G.; Beavis, R.; Yang, H.; Goger, M.; Novick, R. P.; Muir, T. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, **96**, 1218-23.
- 10) Wright, J. S., III; Jin, R.; Novick, R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, **102**, 1691-6.
- 11) Cheung, A. L.; Eberhardt, K. J.; Chung, E.; Yeaman, M. R.; Sullam, P. M.; Ramos, M.; Bayer, A. S. *J. Clin. Invest.* 1994, **94**, 1815-22.
- 12) Lyon, G. J.; Mayville, P.; Muir, T. W.; Novick, R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, **97**, 13330-5.
- 13) Lyon, G. J.; Wright, J. S.; Muir, T. W.; Novick, R. P. *Biochemistry* 2002, **41**, 10095-104.
- 14) Scott, R. J.; Lian, L. Y.; Muharram, S. H.; Cockayne, A.; Wood, S. J.; Bycroft, B. W.; Williams, P.; Chan, W. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003, **13**, 2449-53.
- 15) Park, J.; Jagasia, R.; Kaufmann, G. F.; Mathison, J. C.; Ruiz, D. I.; Moss, J. A.; Meijler, M. M.; Ulevitch, R. J.; Janda, K. D. *Chem. Biol.* 2007, **14**, 1119-27.

つちかま きょうじ  
スクリプス研究所 化学科  
tkama@scripps.edu

## ペプチド合成活性を有する微生物酵素の探索と有用短鎖ペプチド合成法の開発

### 1. はじめに

ペプチドはアミノ酸同士がペプチド結合（アミド結合）を介して複数個連結した化合物である。単体のアミノ酸そのものにも生理活性が報告されているが、これらが連結してペプチドとなることで、構成するアミノ酸単体にはみられない物性や生理活性を発現する場合が多い。アミノ酸が2分子連結したジペプチドでさえ、もとのアミノ酸の有用な生理機能を保持しながらも溶解性や安定性が向上し、またもとのアミノ酸よりもはるかに多様な生理機能を示すことがある。例えば、Val-Tyrにはアンジオテンシン変換酵素阻害による血圧降下作用<sup>1)</sup>、Arg-PheやArg-Trpには動脈弛緩による血圧降下作用<sup>1)</sup>、Leu-Ileには抗うつ薬としての効果、Tyr-Argには鎮痛作用、β-Ala-Hisには抗酸化作用、Glu-Trpには免疫抑制効果などと、多彩な活性が報告されている。また、Asp-Phe-OMe（アスパルテム）は砂糖の約200倍の甘味を示すことから低カロリー甘味料として広く用いられている。輸液の成分として重要なGlnは、Ala-GlnとなることでGln単体と比較して、溶解度で16倍、酸に対する安定性も格段に向上することが報告されている。さらに、自己組織化を起こしてハイドロゲ



木野 邦器

ルを形成する短鎖ペプチドは再生医療用の骨組み素材としての利用が期待されている。このようにペプチドには様々な機能や用途が期待され、その研究分野ならびに応用可能な分野は多岐にわたる。アミノ酸が2個連結したジペプチドだけでも400（=20×20、タンパク質構成性アミノ酸で考えた場合）種類の組み合わせが存在し、さらに鎖長が増すごとにその多様性も指数関数的に増大し、無限大の可能性を秘めている。実際に、これら短鎖ペプチドが生体内においても重要な生理的役割を果たしていることが最近の研究により明らかにされている。しかしながら、未だ多くの短鎖ペプチドについては生理機能や物性面についての検討は行われておらず、その一因として、ペプチドの安価でかつ効率的な生産方法が確立されていないなど供給面での問題点を挙げる事ができる。

このような背景において、筆者らは微生物由来のペプチド合成活性を有する酵素の探索とそれら酵素を利用した効率的な短鎖ペプチド合成法の開発研究を進めており、本稿ではその概略を紹介する。

### 2. L-アミノ酸リガーゼの発見とジペプチド合成

ペプチドの合成法には、化学合成法と酵素法がある。現在最も一般的で広く利用されているのは前者に分類される固相合成法である。しかしながら、本合成法は反応に供するアミノ酸に保護基の導入が必要であることや反応時のラセミ化、大量の有機溶剤や縮合剤を使用するなどの化学合成法における共通の課題に加え、反応が煩雑であるため経済性、効率面での課題もあり、大量合成には不向きであるといえる。

一方、酵素法ではプロテアーゼやエステラーゼと呼ばれる加水分解酵素の逆反応を利用した方法が古くから検討されているが、本方法も基質となるアミノ酸に保護基が必要であることや、使用している酵素が元々は分解酵素であるために、生成したペプチドが再度分解されてしまうなど、収率の観点からも非効率的で課題が多い。また、すべての生物が普遍的に有しているリボソーム依存型のタンパク質合成システムによって生体起源のペプチドの合成は可能であるが、大量合成を前提とする工業的手法としては当然利用できない。

最近になって、L-アミノ酸リガーゼ (Lal<sub>EC</sub> 6.3.2.28) と命名された新規酵素 YwfE が協和発酵工業 (株) (現 協和発酵バイオ (株)) の田畑らによって報告された<sup>2)</sup>。Lal は ATP の加水分解反応と共役して保護基を持たない遊離のアミノ酸同士を直接連結することが可能である (図1)。さらに、この Lal 遺伝子 ywfE を高発現させた組換え微生物を用いることで、輸液原料として需要のある Ala-Gln の発酵生産法を確立している<sup>3)</sup>。Lal を用いた手法は、基質に保護基が不要であることや、反応が水系でかつ温和な条件で進行することから環境負荷低減型の生産プロセスを組むことがで

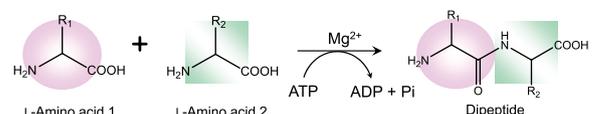


図1 L-アミノ酸リガーゼ (Lal) の反応模式図

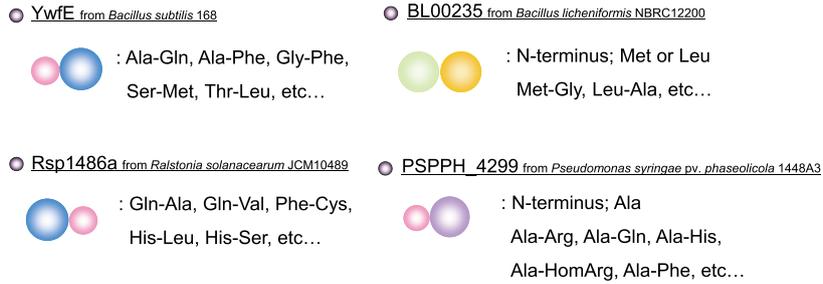


図2 *in silico* スクリーニングで見出したLalと基質異性

きるため、モノ作りには最適な酵素であるといえる。また、発酵法への応用も可能であることから大量合成にも適している。

田畑らは、目的とする酵素が、遊離のアミノ酸同士をα位で結合してジペプチド生成反応を触媒する唯一の酵素Ddl (EC 6.3.2.4) に類似していると予測して*in silico*スクリーニングを行い、機能未知タンパク質の中からYwfEを見出すことに成功している。筆者らは、Lalの基質異性の拡張を目的として、ゲノム情報を利用してYwfEのホモログ酵素を探索し、新たに数種類のLalの探索に成功している<sup>46)</sup>。それぞれに基質異性の違いがあり、酵素の多様性に基づく基質異性の拡張が可能であることを実証した(図2)。

しかしながら、この方法では合成可能なペプチドの種類は酵素の基質に対する特異性に依存してしまうため、限られた種類のペプチドしか合成できない欠点もある。しかも、既報のLalはアミノ酸が2個連結したジペプチド合成反応を触媒するが、3個以上のアミノ酸が連結したオリゴペプチドを合成することはできなかった。

筆者らは、多種多様なペプチドの効率的な合成法の確立を目的として、新たな基質異性を有する微生物

由来Lalの探索を精力的に進めており、これまでに戦略の異なる方法でオリゴペプチドの合成も可能とする新規酵素の探索に成功している。また、大腸菌由来のタンパク質修飾酵素にポリアミノ酸合成活性を見出し、以下にその概略を示す。

### 3. 植物病原ペプチド合成細菌からのLalの探索

筆者らは、タバコ野火病の原因物質であるペプチド性植物病原物質Tabtoxin (TβL-Thr: 図3)とそれを生産する微生物*Pseudomonas syringae*に着目した。既にTabtoxin合成遺伝子クラスターが特定されていたが、当該クラスター中に存在する各種遺伝子がコードするタンパク質がどのような機能を担っているかは明らかにされていなかった。そこで、Tabtoxinのペプチド結合形成をLalが担っているものと推定し、合成遺伝子クラスターを精査した結果、候補遺伝子*tabS*を見出すことに成功した。TabSは、タンパク質構成性アミノ酸20種類にβ-Alaを加えた21種類のアミノ酸の組み合わせのうちその約60%にあたる136の組み合わせでジペプチド合成反応を触媒し、極めて広範な基質異性を有することを明らかにした。また、これまでに見出したLalではN末端に配するアミ

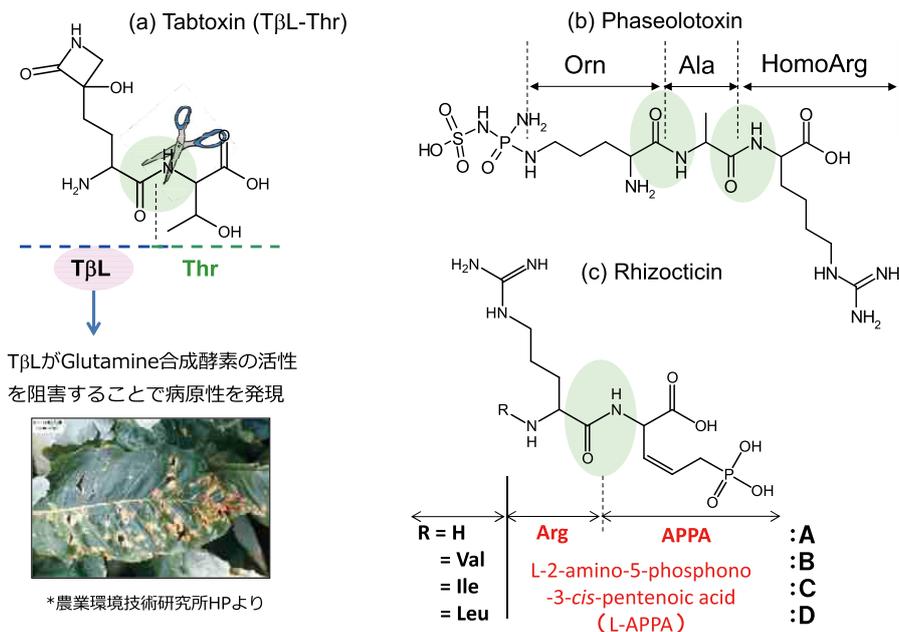


図3 Lalが合成に関与する二次代謝産物

ノ酸に対しての特異性が高く、C末端に配するアミノ酸に対しては特異性が低いという特徴が多く見受けられ、2種類のアミノ酸基質(A, B)を使用した場合には、ホモジペプチド(AA, BB)や、目的のヘテロ型(AB)とは逆の配列を持つジペプチド(BA)が副生してしまうなどの問題があった。しかし、TabSでは、ジペプチドを合成する際に「N末端に配するアミノ酸(Gln, Arg, Lys, Tyr, Asn, Pro, Phe, His, Met, Leu)」と「C末端に配するアミノ酸(Thr, Val, Ile, Ser, Ala, Cys, Trp, Gly)」とに明確な基質の選択性を示すことから、従来のLalでは困難であった副生成物の無い選択的なジペプチド合成が期待される(図4)。実際に前述の有用ジペプチドArg-Phe, Arg-Trp, Leu-Ile, Gln-Trp(Gln-Trpを脱アミド化してGlu-Trpを取得可能)を基質アミノ酸対比70%以上の高収率で合成が可能であることを確認している(図5)<sup>7)</sup>。

また、インゲンマメに対して「かさ枯病」を起こす植物病原微生物である*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*からも上記と同様の作業仮説と戦略によってジペプチドAla-Xaa(Xaaは任意のアミノ酸)の合成反応を触媒するLal: PSPPH\_4299を見出すことに成功している。PSPPH\_4299はPhaseolotoxinの骨

格の一部であるAla-HomoArgの合成反応も触媒し、Phaseolotoxin合成を担う酵素であることを強く示唆する結果を得た<sup>8)</sup>。

本成果は、微生物の二次代謝産物に関する情報と既存の遺伝子配列ならびに各種データベースを組み合わせることで新たなLalの探索と工業的利用への可能性を見出すことに成功した例である。さらに、PhaseolotoxinやTabtoxinの生合成機構やLalの生体内での役割についても重要な知見を提供するものである。

#### 4. ペプチド性抗生物質生産菌からのLalの探索

YwfEは前述のように*in silico*スクリーニングによって初めて見出されたLalであるが、結果的に*Bacillus subtilis* ATCC6633が生産するペプチド性抗生物質Bacilysin(Ala-Anticapsin)の合成遺伝子クラスター内の*ywfE*によってコードされるタンパク質であった。この結果を踏まえ、これまでに微生物が生産するペプチド性抗生物質は多く報告されていることから、その合成反応を触媒する酵素の中に新たな機能を有するLalが存在すると予測した。そこで、筆者らはペプチド性抗生物質Rhizocitcinの生産菌*B. subtilis*

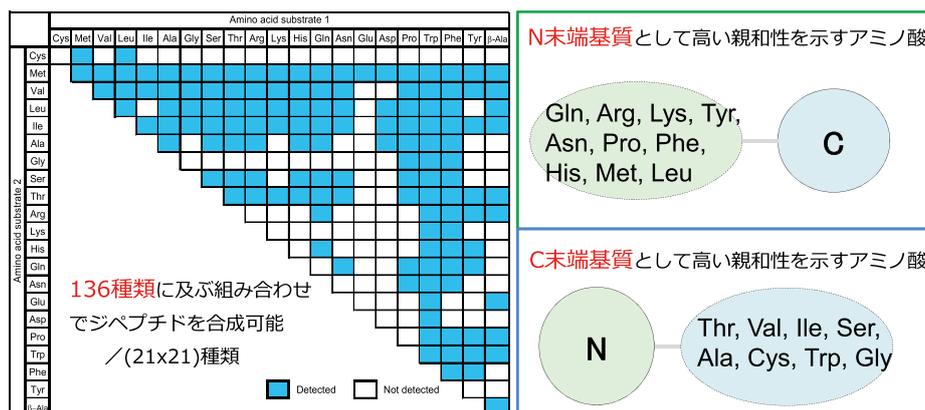


図4 ペプチド性植物病原物質生産菌から見出したTabSの基質親和性

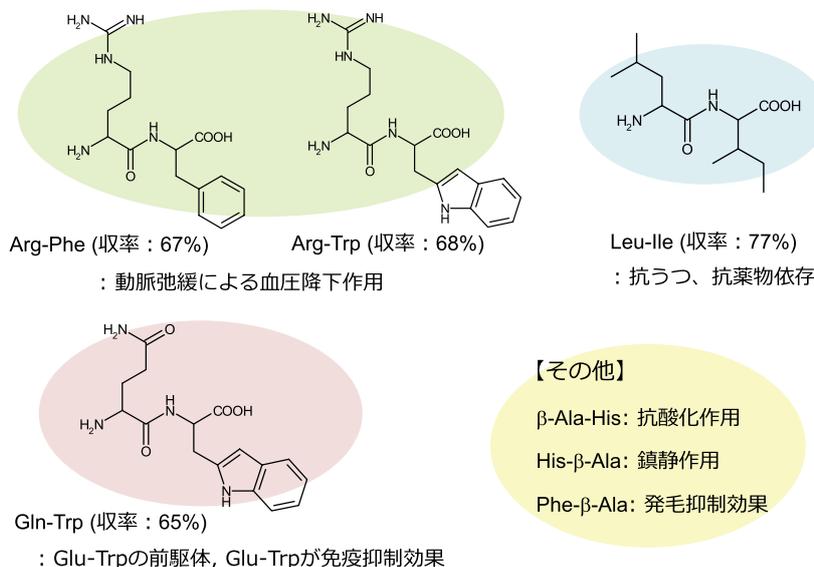


図5 TabSによって合成可能な有用ジペプチド

NBRC3134に着目した。

Rhizoctinは構成アミノ酸の種類によって、4つの構造体が報告されている。Rhizoctin AはN末端にArg, C末端に非タンパク質性アミノ酸 L-2-amino-5-phosphono-3-cis-pentenoic acid (APPA) を配したジペプチド (Arg-APPA) であり, Rhizoctin B, C, Dは, さらにそのN末端に分岐鎖アミノ酸が結合したトリペプチド (R-Arg-APPA, R=Val, Ile, or Leu) である (図3)。しかし, Rhizoctinにおいては生合成に関わる酵素や遺伝子に関する情報や生産菌のゲノムDNAの情報などは皆無であったため, 培養菌体から目的の活性を有するタンパク質の単離精製を検討した。通常は, 微生物の有するペプチダーゼなどによりペプチドが速やかに分解されるため活性検出は困難であるが, 検出法を工夫することでArg 特異的にペプチド結合を形成するタンパク質精製に成功した。当該精製タンパク質のN末端アミノ酸配列情報から, PCR法によって当該遺伝子 (*rizA*と命名) を取得し, 組換え酵素を用いて活性の検証を行った結果, ArgをN末端に配する種々のヘテロジペプチドを合成する新たなLalであることが明らかになった。なお, *rizA*は1,242bp (RizA: 413アミノ酸残基, 46.3 kDa) で, これまでに取得しているYwfE, RSp1486a, BL00235との相同性はアミノ酸レベルで, それぞれ20%程度と低く, 従来の*in silico*スクリーニングでの探索は困難であることが伺える<sup>9)</sup>。

## 5. オリゴペプチド合成酵素の発見

RizAにジペプチド合成活性のあることは確認できたが, トリペプチドの合成活性は見られなかったことから, 筆者らはトリペプチドであるRhizoctin B, C, Dの合成に関わるL-アミノ酸リガーゼが別に存在しているものと仮定し, *rizA* 遺伝子周辺の配列解析を実施した。その結果, Rhizoctin 生合成への関与が推定される一連のORFと, その中から*rizA*とは別に, リガーゼ酵素に特有なATP-graspモチーフを有するタンパク質をコードした遺伝子 (*rizB*と命名) を見出すことができた。この組換えRizBにおいては, ValとArg-Ser (Arg-APPAが入手困難であることからその代替として使用) を基質としてVal-Arg-Serを合成するだけでなく, 分岐鎖アミノ酸を基質として2~5量体のオリゴホモペプチドの合成活性を有してした (表1)<sup>10)</sup>。RizBの発見は, オリゴペプチド合成活性を有するLalを取得した初めての例となる。これまでのLalではジペプチドしか合成することができなかったが, RizBによってさらに長鎖のペプチド合成が可能となり, 合成可能なペプチドの種類を飛躍的に増大させることができた。

さらに, これら酵素遺伝子を解析したところ, 推定Rhizoctin 生合成遺伝子クラスターは約14kbpのDNA断片上にあり, 14種類のORFはBLAST検索からそれぞれの酵素機能を推定することができた。Rhizoctinと同じくC-P結合を有するphosphinothricinやfosfomycinおよびBialaphosの生合成酵素の情報を踏まえ, Rhizoctin 生合成経路の推定も可能であった。これら成果は, 新たな抗生物質合成への応用展開の可能性を示唆するものである。

## 6. ゲノム情報を活用したオリゴペプチド合成酵素の探索

オリゴペプチド合成を可能とするRizBのアミノ酸配列をクエリーとして*in silico*スクリーニングによるRizBホモログ酵素の探索を行った (表2)。抗生物質Nikkomycinの生合成に関与するNikS以外はその機能も予測がつかない推定タンパク質であり, いずれも相同性が低かったが, 新たに5種類のオリゴペプチド合成酵素を見出すことに成功した<sup>11)</sup>。20種類のアミノ酸を基質にしたホモペプチドの合成活性を反応と同時に遊離するリン酸量で比較すると, 脂肪族アミノ酸やMetを基質とするRizBと似た反応特性を示したが, 最大6量体までのオリゴペプチド合成を確認することができた (表3)。ジペプチドあるいはトリペプチドも基質とし, 一部のヘテロ型オリゴペプチド合成も可能である。また, オリゴペプチド合成では沈殿物の形成やペプチドの自己組織化による結晶析出などが観察され, 例えば, Leuのホモペプチドでは反応直後に反応液がゲル状に変化し, PheとLeuとの反応液では針状結晶の析出が観察できる。

## 7. タンパク質修飾酵素 RimKを用いたポリアミノ酸合成

これまでに見出したLalでは8量体までのオリゴペプチド合成は可能であったが, さらに鎖長の長いペプチドやポリマーの合成は不可能であった。最近, 筆者らは, 大腸菌由来のリボソームS6タンパク質のC末端にGluを付加するタンパク質修飾酵素であるRimKに, 遊離のGluを基質としてPoly- $\alpha$ -Gluを合成する活

表1 RizBによって合成されるオリゴペプチドのLC-ESI-MS解析

Substrate 1	Substrate 2	Product <sup>a</sup>	
		Homopeptide	Heteropeptide
	Arg	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V-R, V <sub>2</sub> -R, V <sub>3</sub> -R
	Lys	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -K
	His	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -H, V <sub>3</sub> -H
	Gln	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -Q, V <sub>3</sub> -Q
	Asn	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -N, V <sub>3</sub> -N
	Ala	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -A
	Ser	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -S
	Thr	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -T
	Gly	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -G
Val	Leu	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , L <sub>2</sub> , L <sub>3</sub>	V <sub>2</sub> -L, V-L <sub>2</sub>
	Ile	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , I <sub>2</sub> , I <sub>3</sub>	V <sub>2</sub> -I, V-I <sub>2</sub>
	Met	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , M <sub>2</sub>	V <sub>2</sub> -M, V-M <sub>2</sub>
	Phe	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -F, V <sub>3</sub> -F
	Trp	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	V <sub>2</sub> -W
	Tyr	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.
	Glu	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.
	Asp	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.
	Pro	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.
	Cys	V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>	n.d.

<sup>a</sup> Symbols: n.d., not detected. Homopeptides are shown as X<sub>n</sub> (X, amino acid; n, peptide length). Heteropeptides are shown as X<sub>n</sub>Z<sub>n</sub> (X and Z, amino acids; n, peptide length [n>1]) because the sequences of them were not determined. For example, X<sub>2</sub>Z means tripeptides of X-X-Z, X-Z-X, or Z-X-X.

性のあることを見出した<sup>12)</sup>。本酵素はLalと同様に無保護のアミノ酸を基質とし、ATPの加水分解反応と共役してペプチド結合を形成するが、ペプチド鎖の伸長方向はLalとは逆方向であり、C末端方向へ1分子ずつ伸長していくことを明らかにしている。また、本酵素は耐熱性を有し、pHによって合成ポリマーの鎖長が変化するなど工業利用面にもユニークで有利な特性を示している(図6)。従来、微生物由来の酵素としてポリ-ε-リジンやポリ-γ-グルタミン酸など側鎖部分での結合を有するポリアミノ酸合成酵素の報告があったが、α-位での結合を有するポリアミノ酸合成酵素は世界で初めての発見となる。現在、ホモログ酵素の探索に加え、本酵素における基質特異性の改変可能性を鋭意検討している。

## 8. おわりに

これまでに筆者らは種々の微生物からLalを取得しており、それぞれに特徴的な特性を有した酵素であることを明らかとした。トリペプチド以上のオリゴペプチド合成を可能とする酵素も初めて発見し、現在では、多くのオリゴペプチドの合成をカバーできるようになってきた。いずれの酵素もアミノ酸レベルでは相同性が20%程度と低く、これらの生体内における役割とその起源に興味をもたれる。現在、詳細な酵素学的解析や立体構造解析を進めており、それら情報を踏まえて、既存酵素の基質特異性の改変も可能であると考えている。多くのLalは非天然型アミノ酸やその誘導

体も基質として認識するため、多様なLalを組み合わせることで、用途に合わせた任意ペプチドの画期的な合成プロセスの構築も夢ではないと考えている。実際に、筆者らの研究室で開発したヒドロキシプロリンや

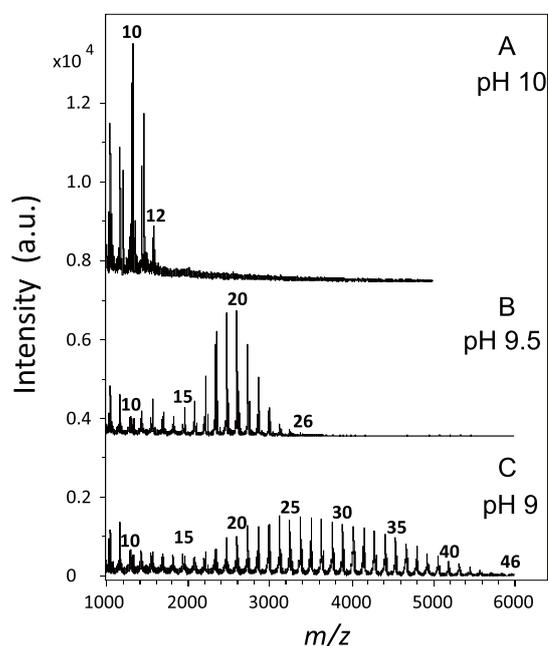


図6 RimKによって合成されるPoly-α-Gluの反応pHによる変化

表2 *in silico* スクリーニングで探索したRizBホモログ酵素

Gene name or Locus tag	Source	Length (AA) <sup>a</sup>	Homology <sup>b</sup> (%)	
<i>rizB</i>	<i>Bacillus subtilis</i> NBRC 3134	408	-	28
BL02410	<i>Bacillus licheniformis</i> NBRC 12200	405	62	29
Haur_2023	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779	408	39	30
spr0969	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC BAA-255	400	33	24
plu2197	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i> DSM 15139	395	32	28
<i>nikS</i>	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 31160	424	28	-
BAD_1200	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM 1275	395	27	23
Ldb1692	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NBRC 13953	408	26	23
CV_0806	<i>Chromobacterium violaceum</i> NBRC 12614	392	23	26

<sup>a</sup> AA, amino acid.

<sup>b</sup> Amino acid sequences of the candidates were compared with those of RizB (left column) and NikS (right column).

表3 オリゴペプチド合成酵素と生成物

Protein	Substrate specificity and Product <sup>a</sup>
RizB ( <i>Bacillus subtilis</i> NBRC 3134)	Val(5), Leu(5), Ile(4), Met(5), Trp(2)
BL02410 ( <i>Bacillus licheniformis</i> NBRC 12200)	Val(5), Leu(5), Ile(4), Met(5), Trp(3), Phe(3)
Haur_2023 ( <i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779)	Val(4), Leu(4), Ile(3), Met(4), Trp(2), Phe(3)
Spr0969 ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC BAA-255)	Val(6), Leu(6), Ile(5), Met(6), Trp(2), Phe(2)
BAD_1200 ( <i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM 1275)	Val(5), Leu(6), Ile(4), Met(6), Trp(8), Phe(6), Tyr(5)
CV_0806 ( <i>Chromobacterium violaceum</i> NBRC 12614)	Val(4), Leu(4), Ile(2), Met(3), Trp(2)
Tlr2170* ( <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1)	Cyanophycin / multi-L-arginyl-poly [L-aspartic acid]
RimK** ( <i>Escherichia coli</i> )	Poly-L-α-glutamic acid (~ 46 aa)

<sup>a</sup> Val(4) as product means tetrapeptide of Valine.

\* Arai T., et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 69 (2008).

\*\* Kino K., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 2019 (2011).

ヒドロキシリジン製造法<sup>13)</sup>を併せ、これらを含むジペプチド合成にも成功しており、コラーゲン類似ペプチドの合成可能性を見出している。また、Lalを用いたジペプチドの工業的生産プロセスは別途検討されており、輸液等有用なAla-Gluでは休止菌体や発酵法による効率的な生産法も構築されている<sup>3,14)</sup>。こうした革新的な技術の確立により、様々なペプチドの安価な供給が可能となり、ペプチドの医薬品や食品、化粧品などの広い分野での用途開発の進展に貢献するものと確信している。

本研究は、研究室スタッフである新井利信博士をはじめとして研究室の多くの学生諸氏の努力によってなされたものであり、ここに感謝します。また、Arg-Pheの血管弛緩作用に関する研究では京都大学の日向耕作准教授との共同研究である。また、本研究の一部は、協和発酵バイオ(株)との共同研究でなされたものである。

最後に、寄稿の機会を与えていただきました早稲田大学理工学術院の小出隆規教授に感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Kagebayashi T., Kotani N., Yamada Y., Mizushige T., Arai T., Kino K., Ohinata K., *Molecular Nutrition and Food Research*, in press.
- 2) Tabata K., Ikeda H., Hashimoto S., *J. Bacteriol.*, **187**, 5195-5202 (2005).
- 3) Tabata K., Hashimoto S., *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6378-6385 (2007).
- 4) Kino K., Nakazawa Y., Yagasaki M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 536-540 (2008).
- 5) Kino K., Noguchi A., Yagasaki M., *J. Biosci. Bioeng.*, **106**, 313-315 (2008).
- 6) Kino K., Noguchi A., Arai T., Yagasaki M., *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 39-41 (2010).
- 7) Arai T., Arimura T., Kino K., The 31st European Peptide Symposium, Copenhagen, Denmark, 5-9 September, 2010.
- 8) Arai T., Kino K., *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **72**, 3048-3050 (2008).
- 9) Kino K., Kotanaka Y., Arai T., Yagasaki M., *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **73**, 901-907 (2009).
- 10) Kino K., Arai T., Tateiwa D., *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **74**, 129-134 (2010).
- 11) Arai T., Kino K., *Biosci. Biotechnol., Biochem.*, **74**, 1572-1577, (2010).
- 12) Kino K., Arai T., Arimura Y., *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 2019-2025, (2011).
- 13) Hara R., Kino K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **379**, 882-886 (2009).
- 14) 植田充美監修, 微生物によるものづくり, 木野邦器, ジペプチド合成酵素の探索とジペプチド生産技術の開発, シーエムシー出版 (2008).

きのくいき  
早稲田大学理工学術院  
先進理工学部応用化学科  
kkino@waseda.jp

## 天然由来 Aib 含有ペプチドの核酸医薬への応用

### 1. はじめに

核酸医薬品(アンチセンス, siRNA, リボザイム, アプタマー, デコイ核酸など)は、核酸をマテリアルとし、疾患関連分子の遺伝子発現や機能を抑制することで、病気の発症や進行を止める作用をもつ薬剤のことをさす<sup>1)</sup>。近年の遺伝子科学の発展に伴い、疾患関連遺伝子の同定が進み、今後益々、核酸医薬品の重要性が増加することが予測される。現在のところ核酸医薬品として日の目を見た化合物は筆者の知るところ、AIDS患者におけるサイトメガロウイルス網膜症治療薬 Vitravene (1998年)と加齢黄斑変性症治療薬 Macugen (2008年)の2種のみである。これら核酸医薬品の開発の障壁となっているのは、核酸分子が生体内酵素であるヌクレアーゼによって容易に分解されることや極性高分子である核酸分子が疎水性の高い細胞膜を透過する能力に乏しいこと等が挙げられる。前者の解決策として、核酸分子の化学的な修飾が活発に行われており、ヌクレアーゼ耐性を獲得した機能性核酸が種々報告されている<sup>2)</sup>。一方、後者の問題点に関しても膜透過機能を兼ね備えた塩基性脂質、膜透過性ペプチドや種々の高分子化合物などのデリバリーツールが数多く報告されている<sup>3)</sup>。

筆者はこれまでに真菌(*Trichoderma viride*)由来の抗菌性ペプチド、ペプタイボールについて研究を行ってきた<sup>4)</sup>。ペプタイボールとは7~20残基程度のペプチドでその構造の特徴は、N-末端にアシル基、C-末端にアミノアルコールが結合しており、 $\alpha$ -aminoisobutyric acid (Aib, U)を高率に含有しているペプチド群である。ペプタイボールは膜に作用し、イオンやその他の物質の膜透過を促進させることが知られている。著者らも、11残基のペプタイボール、trichorovin (TV) や20残基のtrichocellin (TC)類が人工平面膜に対してイオンチャンネルを形成することや牛副腎髄質細胞に対してカテコールアミン放出活性を有していることを明らかにしてきた(図1)<sup>5)</sup>。ペプタイボールの膜に対する透過能に着目し、その作用を期待して核酸医薬品に用いられるオリゴヌクレオチド(ODN)を細胞内に導入し、導入されたODNの機能発現について研究を行っている。本寄稿ではそれらの結果を紹介する。

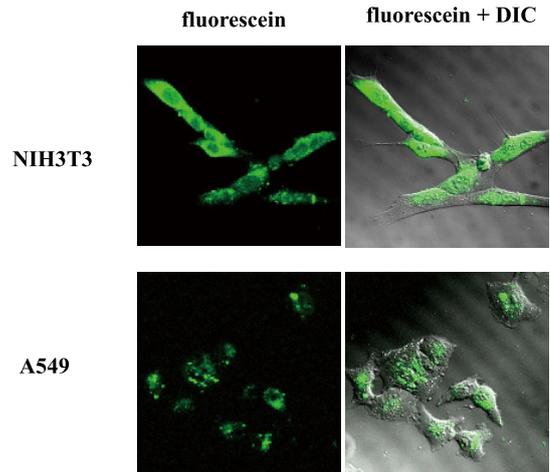
### 2. 11残基ペプタイボールTV-XIIa 誘導体の細胞膜に対する挙動<sup>6)</sup>

ペプタイボールは抗菌活性や膜に対するイオンチャンネル活性等に関する報告例は多いが、細胞や細胞膜に対する動的挙動を観察した報告例は少ない。筆者らが単離、構造決定した11残基のペプタイボールの細胞における動的挙動を観察する目的で、TV-XIIa 蛍光ラベル化体誘導体を合成しその挙動の検討を行った。またペプタイボールに特異的に含有しているAib残基の影響を検討するために、TV-XIIaの分子内に3残



和田 俊一

基含有しているAib残基をアラニン (Ala) に置換し、その影響を検討した。蛍光ラベル化 TV-XIIaペプチド (**1-FI**) 及びそのAib → Ala置換体 (**2-FI**) の細胞内取り込みについて、2種の哺乳類細胞、マウス胚繊維芽細胞 (NIH3T3)、ヒト肺癌細胞 (A549) を使い、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 及びフローサイトメトリー (FACS) を用いて蛍光観察を行った。図2に **1-FI** (1.0 μM) を細胞に作用させた時のCLSM像を示した。そのCLSM図を精査すると、**1-FI**はNIH3T3、A549の両細胞において顕著に膜を透過し、細胞質内に拡散、そしてやや核内にも移行していることがわかった。一方、**2-FI**においては (ここでは示していないが)、やや膜透過し細胞質内への局在が認められるが、**1-FI**と比較するとその膜透過量は顕著に少なかった。**1-FI**のいずれの濃度においても、膜への蓄積は認められず、細胞質内に移行していることが観察された。この蛍光ラベル化ペプチドの細胞膜透過性を定量的に評価してみると (図3)、**1-FI**は濃度依存的にNIH3T3、A549両細胞において細胞内に取り込まれていることが分かった。一方、**2-FI**も細胞内に取り込まれていることが確認されたが、その膜透過性は低く、**1-FI**と比較すると顕著な膜透過能の違いがわかった。これらの結果より、TV-XIIaは膜中でイオンチャンネルを形成するのみではなく、ペプチド自身が細胞膜透過を起こすことがわかった。また分子内に含有するAib残基が膜透過機能発現に重要な役割を果たしていることがわかり、TV-XIIaのODNのデリバリーツールとしての可能性を示すことができた。



DIC: differential interference contrast image

図2 TV-XIIa 蛍光誘導体 (**1-FI**) のNIH3T3、A549細胞における挙動

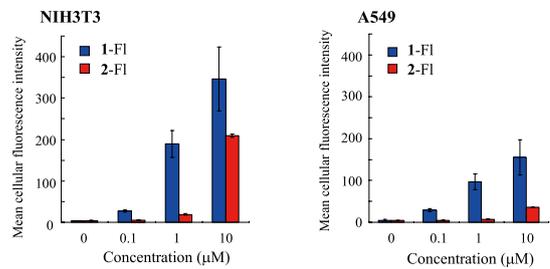


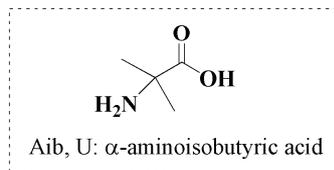
図3 TV-XIIa 蛍光誘導体 (**1-FI**) とそのAla置換体 (**2-FI**) の膜透過性の定量的評価

(A)

TV-XIIa: Ac-U-N-I-I-U-P-L-L-U-P-Iol

TC-A-I : Ac-U-A-U-A-U-A-Q-U-L-U-G-U-U-P-V-U-U-Q-Q-Fol

Ac: acetyl; Iol: isoleucinol; Fol: phenylalaninol



(B)

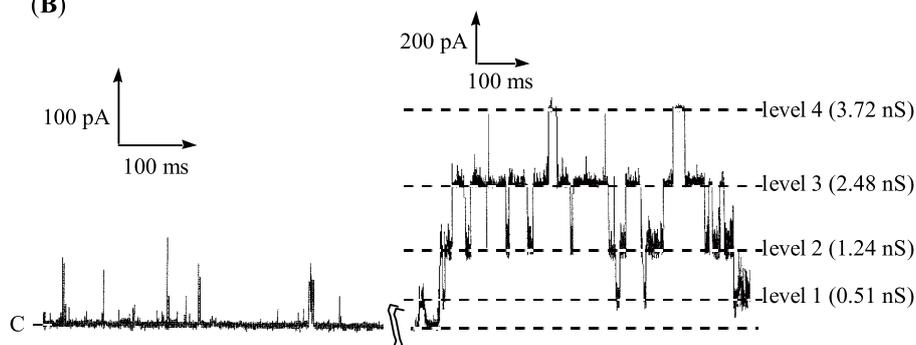


図1 Trichorovin-XIIa (TV-XIIa) と trichocellin-A-I (TC-A-I) のアミノ酸配列 (A) と TV-XIIa の人工平面膜におけるイオンチャンネル活性 (B)

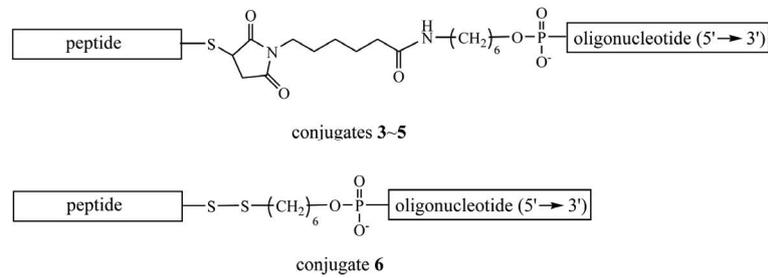
### 3. 11残基ペプチドTV-XIIa-核酸コンジュゲート体の膜透過性とアンチセンス効果<sup>7)</sup>

TV-XIIa 誘導体の膜透過性を明らかにすることができたので、次に、TV-XIIa-ODNの共有結合を介したコンジュゲート体を合成し、その細胞膜透過性及びアンチセンス効果についての検討を行った。アンチセンスODN (A-ODN) を用いるアンチセンス法とは、メッセンジャー RNA (mRNA) と相補的塩基配列を有する20mer程度のODNを細胞内に導入し、mRNAとODNが相補的に結合、タンパク質への翻訳を阻害する手法である。

コンジュゲート体の合成に関しては、架橋試薬 *N*-6-maleimidocaproyloxysuccinimide 或いは2,2'-dipyridyl disulfideを用いてC-末端にシステインを結合させたTV-XIIaと5'-末端にアミノ基或いはチオール基を有した20mer ODNとを反応させることによって行った。用いたODNの塩基配列は、p53遺伝子のエクソン10の

1071-1090番目に対するアンチセンス鎖、及びネガティブコントロールとしてそのセンス鎖を用いた (図4)。蛍光ラベル化コンジュゲート体 **3** のA549細胞に対する膜透過能について図5に示した。TV-XIIaが結合していない蛍光ラベル化20mer ODNのみではほとんど膜透過が認められなかったが、コンジュゲート体 **3** は濃度及び時間依存的に細胞内に移行していることが分かった。また、コンジュゲート体は、10  $\mu$ M, 24h インキュベーションしても毒性を示さなかった。

次に、コンジュゲート体 **4** ~ **6** を用いてA549細胞のp53タンパク質の発現に対するアンチセンス効果をウエスタンブロット法を用いて検討した。1  $\mu$ Mの濃度においては、アンチセンス鎖を有するコンジュゲート体 **4** 及び **6** はほとんど活性を示さなかったが、5  $\mu$ Mに濃度を上昇させると、それぞれ50%、20%のタンパク質発現量の低下が認められた (図6)。一方、コントロールのコンジュゲート体 **5** はまったく



conjugate	peptide <sup>a</sup>	oligonucleotide (5'→3')
<b>3</b>	Ac-UNIIUPLLUPIC-NH <sub>2</sub>	CCCTGCTCCCCCTGGCTCC-FI <sup>b,c</sup>
<b>4</b>	Ac-UNIIUPLLUPIC-NH <sub>2</sub>	CCCTGCTCCCCCTGGCTCC <sup>c</sup>
<b>5</b>	Ac-UNIIUPLLUPIC-NH <sub>2</sub>	GGAGCCAGGGGGAGCAGGG <sup>d</sup>
<b>6</b>	Ac-UNIIUPLLUPIC-NH <sub>2</sub>	CCCTGCTCCCCCTGGCTCC <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Ac: acetyl; U:  $\alpha$ -aminoisobutyric acid. ペプチドのC-末端システインの側鎖チオール基を用いてオリゴヌクレオチドとコンジュゲートさせた。<sup>b</sup>FI: fluorescein. <sup>c</sup>アンチセンスオリゴヌクレオチドはホスホロチオエート体を用い、その塩基配列は p53 遺伝子のエクソン 10 に位置する 1071-1090 番目の塩基配列に対して相補的塩基配列を有するものを用いた。<sup>d</sup>コントロールとしてそのセンス鎖を用いた。

図4 TV-XIIa-オリゴヌクレオチドコンジュゲート体の構造

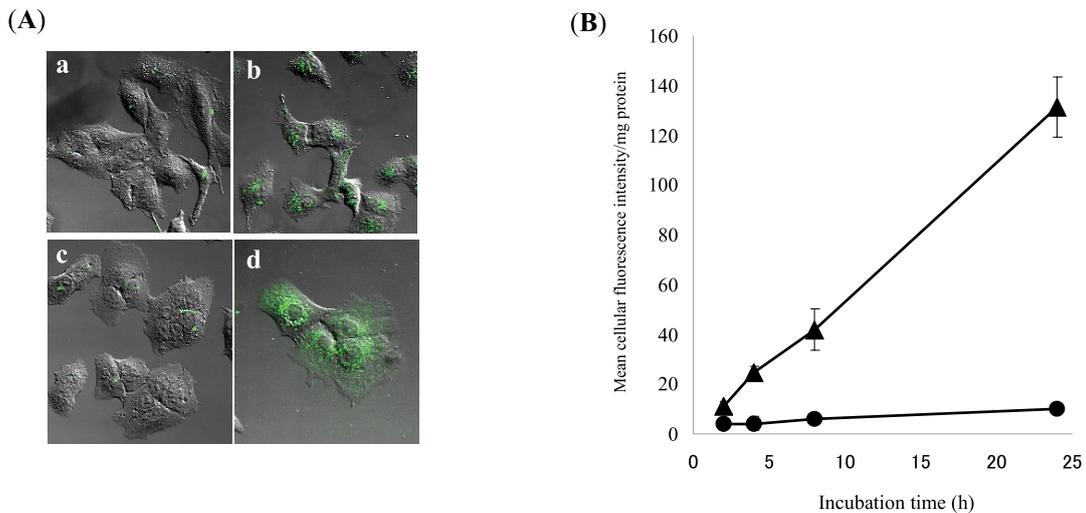


図5 TV-XIIa-オリゴヌクレオチドコンジュゲート体 **3** のA549細胞に対する膜透過性. (A) 共焦点レーザー顕微鏡像. TV-XIIaが結合していない蛍光ラベル化20mer ODN (a, c) 或いはコンジュゲート体 **3** (b, d) を1.0  $\mu$ M, 37°C, 2h (a, b) 或いは24h (c, d) インキュベーションした。(B) 細胞内移行量の時間変化. TV-XIIaが結合していない蛍光ラベル化20mer ODN (●) 或いはコンジュゲート体 **3** (▲) を1.0  $\mu$ M, 37°C, 2 ~ 24h インキュベーションした。

阻害作用を示さなかった。しかし、トランスフェクション試薬であるlipofectamine 2000の阻害率(A-ODN 1  $\mu$ Mで約80%阻害)に比べると弱いものであった。細胞毒性の観点からみると、lipofectamine 2000の顕著な細胞毒性に対してコンジュゲート体はほとんど細胞毒性を示さない。これらの結果から考慮すると、TV-XIIaは核酸医薬品に用いられるオリゴヌクレオチドを毒性を示さず細胞内に移行させ、その機能を発現させることができたことから、TV-XIIaが有用なデリバリーツールになる可能性を示すことができた。

#### 4. 膜透過性ペプチドMAP中のAlaをAibに置換<sup>8)</sup>

膜透過性ペプチドMAP (Model Amphipathic Peptide) は、疎水性アミノ酸 (Leu, Ala) と親水性塩基性アミノ酸 (Lys) を組み合わせてデザインされた両親媒性ヘリックスペプチドである<sup>9)</sup>。このMAPの細胞膜透過性やMAPを用いた核酸分子のデリバリーが報告されている<sup>10)</sup>。

筆者がこれまで扱ってきたAibをペプチド中に組み込むと、コンフォメーションの自由度が制限され、そのペプチドはヘリックス構造を指向することが知られており<sup>11)</sup>、また脂溶性の増大による膜に対する親和性の上昇や生体内での安定性の上昇などが認められる。そこでMAP中のAla残基をAibに置換 [MAP (Aib)] すれば、膜への親和性上昇による膜透過性の向上や生体内での安定性 (酵素耐性) を有した膜透過性ペプチドを創製できるのではないかと考え、MAP (Aib) の

合成、評価を行った (図7)。

まずコンフォメーションについては、Trisバッファー/トリフルオロエタノール中で、両者は類似したヘリックス構造をとり、デザインしたMAP (Aib) が目的とした両親媒性ヘリックス構造を取っていることを示唆した (図8)。またトリプシンやプロナーゼに対する酵素安定性については、MAP (Aib) が両酵素に対して耐性を示すことがわかった (図9)。またここでは示していないが、ペプチドの膜透過性やペプチドを用いた核酸分子の細胞内導入に関しても、MAP (Aib) がより優れていることがわかった。これらの結果から、Aibをペプチド中に組み込むことによって、より優れた膜透過性ペプチドを創製することができた。

#### 4. 終わりに

著者は、天然物化学から研究をスタートし、分離、構造決定、生理活性とその特性を生かした応用研究へと発展してきた。今回示したように、Aib含有ペプチドを用いてオリゴヌクレオチドのデリバリーを行うことができたが、まだまだ核酸医薬品への応用レベルには達していない。この化合物をリード化合物としてまたは新たな発想のもとに研究を行い、核酸医薬品の発展に貢献できるように研究を続けていく予定である。

この研究のきっかけを与えていただいた藤多哲朗先

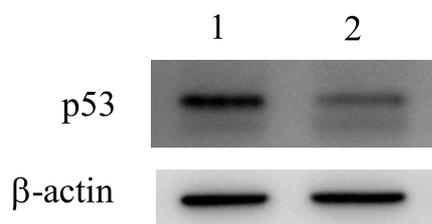


図6 TV-XIIa-オリゴヌクレオチドコンジュゲート体3のアンチセンス効果  
レーン1: 無処理 (細胞のみ); レーン2: 5  $\mu$ Mのコンジュゲート体3

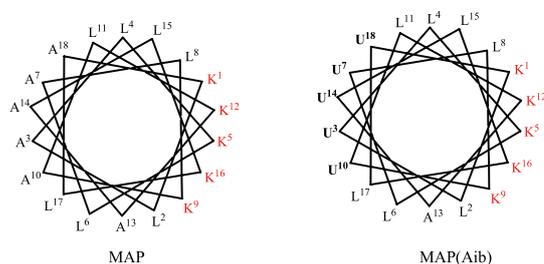


図7 MAPとMAP (Aib) のアミノ酸配列とヘリカルホイールダイアグラム  
C-末端のGCは蛍光ラベル化のために結合させた。

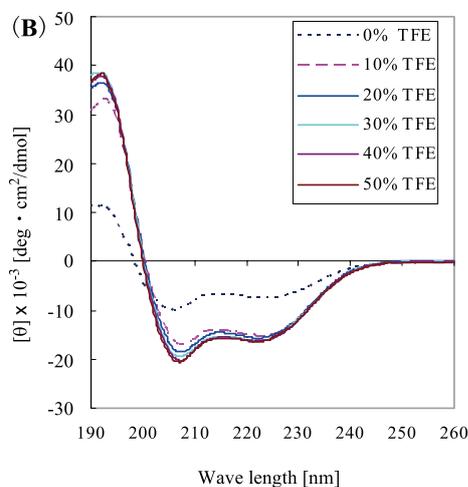
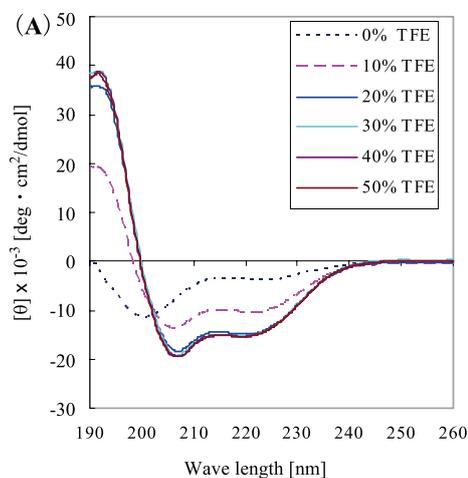


図8 Trisバッファー/トリフルオロエタノール中でのMAP (A) とMAP (Aib) (B) のCDスペクトル

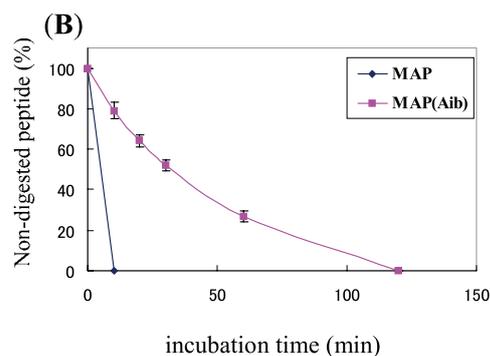
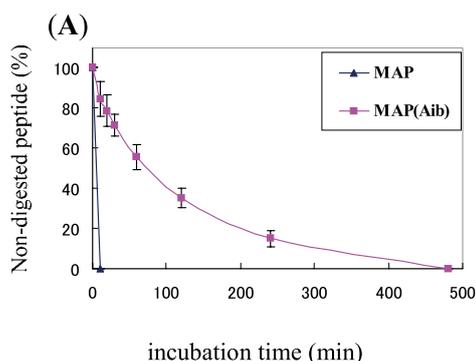


図9 MAPとMAP (Aib) のトリプシン (A) およびプロナーゼ (B) に対する耐性評価

生 (京都大学名誉教授)、核酸に関する有益な御助言をいつも与えてくださる浦田秀仁先生 (大阪薬科大学教授) に感謝いたします。また執筆の機会を与えてくださった小出隆規先生 (早稲田大学教授) に感謝いたします。

#### 参考文献

- 1) Stull, R. A.; Szoka, F. C. *Pharm. Res.*, **12**, 465 (1995); Whitehead, K. A.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **8**, 129 (2009); Agrawal, S. *Trends Biotechnol.*, **14**, 376 (1996); Pawlak, W.; Zolnerek, J.; Sarosiek, T.; Szczylik, C. *Cancer Treat. Rev.*, **26**, 333 (2000); Thompson, J. D. *Drug Discov. Today*, **7**, 912 (2002).
- 2) 関根光雄, 多比良和誠 編, 「RNAi 法とアンチセンス法」講談社サイエンティフィック (2005).
- 3) Stanton, M. G.; Colletti, S. L. *J. Med. Chem.*, **53**, 7887 (2010); Brasseur, R.; Divita, G. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes*, **1798**, 2177 (2010); Schmidt, N.; Mishra, A.; Lai, G. H.; Wong, G. C. L. *FEBS Letters*, **584**, 1806 (2010); Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **61**, 953 (2009); Troiber, C.; Wagner, E. *Bionconj. Chem.*, **22**, 1737 (2011).
- 4) Wada, S.; Nishimura, T.; Iida, A.; Toyama, N.; Fujita, T. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3095 (1994); Wada, S.; Iida, A.; Akimoto, N.; Kanai, M.; Toyama, N.; Fujita, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 910 (1995).
- 5) Wada, S.; Iida, A.; Asami, K.; Fujita, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 2275 (1996); Wada, S.; Iida, A.; Asami, K.; Tachikawa, E.; Fujita, T. *Biochim. Biophys. Acta*, **1325**, 209 (1997).
- 6) Wada, S.; Hitora, Y.; Tanaka, R.; Urata, H. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **18**, 3999 (2008).
- 7) Wada, S.; Hitora, Y.; Yokoe, S.; Nakagawa, O.; Urata, H. *Bioorg. & Med. Chem.*, **20**, 3219 (2012).
- 8) Wada, S.; Tsuda, H.; Okada, T.; Urata, H. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **21**, 5688 (2011).
- 9) Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes*, **1414**, 127 (1998).
- 10) Oehlke, J.; Birth, P.; Klauschenz, E.; Wiesner, B.; Beyermann, M.; Oksche, A.; Bienert, M. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 4025 (2002).

- 11) 田中正一, 有機合成化学協会誌, **60**, 125 (2002).

わだ しゅんいち  
大阪薬科大学  
機能分子創製化学研究室  
wada@gly.oups.ac.jp

#### 第15回ペプチドフォーラム開催報告

2012年3月16日 (金), 長浜バイオ大学・命江館において, 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, クリプタイトドからペプチド医薬食品への考察」(主催: 日本ペプチド学会, 共催: 長浜バイオ大学) を開催致しましたので報告させていただきます。

本フォーラムは, まず木曾良明・長浜バイオ大学客員教授による挨拶ではじまり, 続いて向井秀仁准教授による「クリプタイトド: その存在意義と産業的応用」, 吉川正明・生産開発科学研究所研究室長による「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」, 南野直人・国立循環器病センター研究所薬理部長による「ペプチドーム解析とペプチドの潜在能力の探索」, および木曾客員教授による「ペプチド化学を基盤とする創薬」に関する講演があり, 最後に向井准教授が閉会の挨拶を行いました。本フォーラムでは, 新しい生理活性ペプチドの発見とその創薬および機能性食品への応用について, 様々な視点に立った講演が行われました。全国の大学・公的研究所や製薬, 化学, 食品などの様々な企業から140名以上の参加者を得て活発な討論が行われました。またフォーラム終了後, 命江館・食堂においてミキサーが開かれ, その際も演者を囲んで活発な討論が行われていました。さらに当日の講演内容については, 日経バイオテク誌 (2012年4月



木曾 良明



向井 秀仁



9日号) およびそのホームページ, メールニュースでも紹介されるなど, 高い関心を集めました。

このように本フォーラムは様々な方々に参加していただき大変有意義なものとなりました。この場をお借りして, ご講演いただいた諸先生方, またご支援いただいたペプチド学会の皆様方に厚く御礼申し上げます。

{

 きそ よしあき  
 むかい ひでひと  
 長浜バイオ大学ペプチド科学研究室
 
}

### 第49回ペプチド討論会

#### 会 期

平成24年11月7日(水)～9日(金)

#### 会 場

かごしま県民交流センター  
(鹿児島市山下町14番50号)

#### ホームページ

<http://www.peptide-soc.jp/jps49/>

日本ペプチド学会のHPからアクセスできます。

#### 主 催

日本ペプチド学会

#### 共 催

日本化学会・日本薬学会・日本農芸化学会・日本生化学会

#### 発表申込・アブストラクト受付期間

7月10日(火)～8月13日(月)

(発表申込とアブストラクトの締切は同日です)

#### 受諾通知

9月初旬(E-mailにて通知予定)

#### 討論主題

- 1) アミノ酸およびペプチドの化学
- 2) 生理活性ペプチドの単離, 構造決定および合成
- 3) ペプチド合成の新規な戦略と方法論
- 4) ペプチドの構造-機能相関
- 5) ペプチドの医学・薬学的研究
- 6) ペプチドインフォマティクス
- 7) ペプチドに関連したケミカルバイオロジー
- 8) ペプチドの構造解析
- 9) ペプチドのバイオマテリアルへの応用
- 10) その他広くペプチド科学に関する研究

#### 発表形式

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

#### 発表申込方法

第49回ペプチド討論会の上記HPより「発表申込およびアブストラクト登録」フォームに情報を入力後, アブストラクトを郵送してください。詳細はHPを参照してください。

#### 参加登録 事前参加登録締切 9月30日(日)

一般(含プロシーディング):

(ペプチド学会員・共催学会員) 6,000円,

(非会員) 10,000円

学生(プロシーディング無し):

(ペプチド学会員・共催学会員) 3,000円,

(非会員) 5,000円

(注) 10月1日以降は当日登録となり, 一般会員で, 2,000円, 学生会員で1,000円高くなります。

#### 懇親会

11月8日(木) マリンパレスかごしま

参加費: 一般8,000円, 学生4,000円

#### 市民フォーラム

日時: 平成24年11月10日(土) 午後

場所: 鹿児島大学郡元キャンパス内 稲盛会館

(鹿児島市郡元1丁目21-40)

討論会世話人 杉村和久

(鹿児島大学大学院理工学研究科)

#### 問い合わせ・申込先

〒890-0065 鹿児島市郡元1丁目21-40

鹿児島大学大学院理工学研究科

化学生命・化学工学専攻

第49回ペプチド討論会事務局

E-mail: [jps49@apc.kagoshima-u.ac.jp](mailto:jps49@apc.kagoshima-u.ac.jp)

FAX: 099-258-4706

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-8686 箕面市稲 4-1-2

(榊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)