



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.87

2013年1月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

2013年。ペプチド科学、新たな出発へ

新年、明けましておめでとうございます。毎年、年が改まる度に新たな決意のもと、科学の新たなページ、新展開を求めて研究に邁進されることかと存じます。本年のご活躍を心よりお祈り致します。日本ペプチド学会も昨年4月には新執行部の発足を受けて、堅固な歩みを継続

すべく活動しております。11月には、鹿児島大学の杉村先生のお世話で、鹿児島市に於いて初めての討論会が成功裡に開催されました。市民フォーラムも盛況のうちに開催されました。会員の皆様のご協力に感謝申し上げます。

本年2013年は、討論会が始まってから50年の節目の年にあたり、11月にはペプチド研究所の豊島先生、西内先生のお世話により第50回の記念大会を大阪にて開催することになっています。また、この大会は第4回アジア-太平洋国際ペプチドシンポジウム (APIPS) と併催されます。APIPSは、その第1回目を私が世話人として2004年に福岡の地で開催しました。ペプチド討論会を数年に1回は国際学会として開催するという新しい方針で開始しました。それから10年の節目でもあり、APIPSは福岡から、オーストラリア(ケアンズ)、韓国(済州島)を経て、丁度一巡して再度日本で開催されることになりました。これも、記念大会としては相応しい慶事かと思えます。

さて、年頭に当たり、学会の存在意義などについて、雑感を綴ってみようと思ひ、以下に書き散らかしました。暇にまかせ、読み捨てて頂ければと思ひます。年会や討論会の意義は、新しい科学の展開について参加者相互に討論を通じて知識を深め合い、理解を共有し、そこからよりダイナミックな新展開への基盤をつくることにあります。そして、学会の意義はそうした機会を時宜に即して提供すること、共に造ることです。日本ペプチド学会の発展は、まさに、こうした会員の意識があつてこそその進展、伸展であり、高い意識で皆様とともに活動できることを願つてやみません。

生体構成成分の一つとして生命活動に重要なペプチドは、アミノ酸およびタンパク質とともに階層性を成し、大きなファミリーを成す機能性物質です。したがって、ペプチドの科学は、アミノ酸、タンパク質をも含め、これらを統括的に俯瞰する自然科学として究



下東 康幸

められるもの、と思ひます。また、研究においては、着目、着眼することも多種多彩であれば、その手法も多種多彩です。最近のニュースレターの内容を見れば、まさに百花繚乱で、充実感のある様相です。こうした多様性の集団であればこそ、相互の学問的な刺激もより効果的となり、勉強も進み、理解も深くなるのではないのでしょうか。ニュースレターはこのような役割を先導的に担っており、素晴らしい総説を毎号届けて頂いていると思ひます。ペプチド討論会でもこうしたことがより強く意識して取組まれるべき課題かも知れません。一時、様々な分野の研究者を学会に取り込んで、というような発想がありましたが、現状としては各研究者が同時にいくつもの学会に入会していることが多く、そうしたことは実現が困難であることが分かつて参りました。そうすると、年会である討論会に活躍の研究者を招いて、こうした他分野で展開しているペプチド科学について講演を依頼するような形で実現させることが可能ではと思ひます。ローカルには「ペプチドフォーラム」でこうした活動が実現しているかと思ひますが、討論会レベルでも考えるべきかも知れません。

長年、研究に携わっていると時に『目からうろこが落ちるような』体験をし、意欲が湧きあがるような思いをすることがあります。例えば私の場合で一例をあげると、ペプチドやタンパク質はアミノ酸がペプチド結合でつながった物質と教科書的に理解しておりました。しかしある時、『ペプチドやタンパク質は、ペプチド結合がC α 炭素を介してつながった物質』という話を聞き、そういう図を示されました。それで、「主鎖」と「側鎖」がその言葉通りに理解でき、ペプチド結合平面が水素結合で「巻いた構造=ヘリックス」「伸びた構造=ストランド」を取る様子が理解でき、前者を α 、後者を β とし、ペプチド結合平面の二面角の意味するところなど、水解するように分かった時は、ある種の衝撃を覚えたほどでした。それ以後は、講義を始め、いろいろな機会にそうしたことを伝えるようにしております。物事は理解が進むと、それについていろいろな問題意識が湧き、課題が見つかるものです。より良く理解し、そのために討議・議論し、基盤を共有する。こうしたことも学会活動の有意義な側面かと考えます。

良き学友、研究仲間を持つこと、つくることも大切な要因かと思ひます。特に、若いときの仲間は生涯の友として、ときに競い、ときに支え合い、得難い思いをすること多々あります。「夏の学校」での出会いは良い事例かと思ひます。留学中の海外の、海外からの

研究者との出会いも良い事例かと思えます。時に新しい研究領域を興したり、研究費を協同で申請したり、共同研究をしたり。学会の活動としては、科研費等での協同がもう少し活発であればという意見も聞きます。取組みとして必要ではと考えます。

学会について、雑感として思いつくままに書いてきました。ペプチド学会を一つの集いの場として、より良いものにできればと思います。2013年が皆様にとって良い年であることを祈っております。

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

第49回ペプチド討論会報告

第49回ペプチド討論会を、平成24年11月7日から9日の日程で、かごしま県民交流センターを会場にして開催し、11月10日には鹿児島大学・稲盛会館にて日本ペプチド学会・市民フォーラム2012「私たちの体と健康を支えるアミノ酸・ペプチド」という企画を行い、いずれも盛会に終了致しました。これも、本会議の開催にご尽力頂いた皆様および研究発表をされた先生方、また全ての参加者の方々のご支援とご協力の賜物であり、感謝申し上げます。

参加者は347名、口頭発表が53、ポスター発表が125でした。(懇親会：190名)

総会ではこれまでの研究業績が高く評価された研究者に対し各賞の授賞式が行われました。

Akabori Memorial Award:

Horst Kessler (Technische Universität München)

日本ペプチド学会奨励賞：

尾上誠良 (静岡県立大学薬学部)、重永 章 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・薬学系)



Kessler 教授、Basu 教授とともに

懇親会では、今回のペプチド討論会での研究発表と成果に対し、発表者へ表彰状と記念品を贈りました。以下の方々です。

若手口頭発表 最優秀賞 (Excellent Stone Award)：

橋本知恵 (東京医科歯科大学生体材料工学研究所)

優秀賞 (Good Stone Award)：

河野健一 (京都大学大学院薬学研究科)、坂口達也

(北海道大学大学院理学研究院)、佐藤浩平 (徳島大学大学院薬科学教育部)、薬師寺文華 (東京薬科大学薬学部)、水野 彰 (北海道大学大学院薬学研究院)



若手口頭発表受賞者

JPSポスター賞：

坂本 健 (徳島大学大学院薬科学教育部)、白幡祐貴子 (北海道大学大学院理学研究院)、大沢紗貴 (群馬大学工学部応用化学・生物化学科)、川上隆史 (東京大学大学院総合文化研究科)、川畑壮大朗 (鹿児島大学大学院 理工学研究科)、大崎勝弘 (京都大学化学研究所)、藤田裕子 (東京農工大学大学院農学研究院)、上野博史 (京都大学大学院薬学研究科)、川端久美子 (大阪府立大学大学院理学系研究科)、波多野寛 (関西大学化学生命工学部)



ポスター賞受賞者

招待講演は、韓国からDr. Bang Jeong-Kyu (Korea Basic Science Institute)とDr. Park Yoonkyung (Chosun University)のお二人、それとインドペプチド学会の理事をされていますDr. Gautam Basu (Bose Institute)に行って頂きました。

鹿児島での大会をお世話するにあたり、若干意識した事があります。若手研究者に発表の機会をできるだけ与えること、言葉を含めできるだけ国際標準に近づけること、海外からの参加者を違和感無く受け入れる体制で臨む、ということです。私どもの予想を越えて、ほとんどの口頭発表は英語で行われました。討論



ポスター会場風景

も座長の先生方の心強いご支援により、活発に英語で行われました。

言葉のハンディキャップを気にすることなく、果敢にチャレンジする若手研究者の姿は今後の本学会の未来を感じさせました。深い思考は母国語でなければならぬと云われます。国内での場合「その思考を表現するに足る言語がもし日本語であれば、自在に切り替えて議論を進めて構わない。しかし一方、国際的にメッセージを伝える手段をできるだけ優先する」ということなのではないかと思えます。Kessler教授が云っていました。「要旨集の表紙と最初の目次が日本語なのは、海外からの研究者をがっかりさせる」。

スケジュールが混んでいて、鹿児島を楽しめる時間があつたのかが気になる所ですが、来年の大阪での第50回ペプチド討論会とAPIPS2013の成功を期待しつつ、ご報告とさせていただきます。



懇親会風景

すぎむら かずひさ
鹿児島大学大学院・理工学研究科
kazu@be.kagoshima-u.ac.jp

Akabori Memorial Award 2012

Shiro Akabori deceased exactly 20 years ago leaving behind the foundations of peptide and protein chemistry in Japan. In his honor every two years the German and the Japanese Peptide Societies organize the Akabori conference in Japan or Germany. These meetings (and others) gave me the opportunity to meet my Japanese colleagues and friends regularly. I soon realized that Akabori has influenced our research in the last century as a truly pioneer and father of peptide chemistry in Japan.



Prof. Dr. Horst Kessler

My interest in peptide chemistry came relatively late in my career. I studied chemistry in Leipzig (escaping one week before the Berlin wall was built up – just in time*) and continued my studies in Tübingen to obtain my Ph.D. degree in 1966. My doctoral advisor was not the well known peptide chemist Ernst Bayer but Eugen Müller, in which group I performed copper-catalyzed carbene reactions with aromatic compounds. To characterize the products and prove the existence of cyclopropane rings I started to use NMR spectroscopy. As soon as I realized that line broadening of NMR signals can give us information about intramolecular mobility I became interested in these phenomena and started to investigate mechanisms of fast intramolecular rearrangements¹. However after several years in this field most principles were established and I was looking for another field to use my knowledge about conformational analysis by NMR.

I thought studying peptides would be interesting, as at this time there was not much knowledge about peptide conformations. However the flexibility of the peptide backbone requires constraints to cyclic structures to get reliable answers about peptide conformations. This was my start in the field of cyclic peptides.

Cyclic hexapeptides had been investigated by Ken Kopple and others whereas the conformations of cyclic pentapeptides and -tripeptides were largely unknown at this time. We used all available state of the art techniques for conformational analysis by NMR-spectroscopy but as soon as 2D NMR was invented by Richard Ernst we also started to apply these new pulse sequences.² Thanks to these advantages and several other novel pulse sequences^{3a} introduced by us we were able in the late 70ies to elucidate the conformation of several cyclic peptides. Some of the 2D NMR pulse sequences paved the way for 3D NMR - actually, we reported the first heteronuclear 3D experiment to elucidate the conformations of derivatives of Cyclosporin.^{3b} The conformation of Cyclosporin in chloroform was solved by us via a number of NMR

techniques at the same time as Kurt Wüthrich reported his first 3 D structures of proteins by NMR⁴.

Conformation is only of interest if we correlate this information with biological activity⁵. For this reason, we used NMR to determine the conformations of bioactive cyclic peptides. Structures were determined by NMR and Molecular Dynamics (MD) calculations first together with Rob Kaptein and later with Wilfred van Gunsteren, but we also contributed to technological developments, e.g. a force field for the solvent DMSO was developed to perform the MD calculations under experimental conditions.

The important role of the chirality of the amino acids in controlling the conformation of cyclic peptides let us to search for scaffolds with preferred conformations which can be used to present bioactive peptide sequences in different spatial structures. A correlation with the biological activity yields the optimal arrangement of the pharmacophors⁶. This procedure (dubbed "spatial screening") was also used for peptides containing the tripeptide sequence RGD. This sequence was discovered by Erkki Ruoslahti in fibronectin as a major cell-adhesion site. It is recognized by several subtypes of the adhesion receptors, the integrins. Our spatial screening method led to the development of c(RGDfV), a superactive ligand for the integrin $\alpha v\beta_3$, with low affinity for the platelet receptor $\alpha IIb\beta_3$ (high selectivity).⁷ It was later modified to the *N*-methylated peptide bond analogue Cilengitide c(RGDfNMeVal).⁸ This very potent and enzymatically stable peptide is now in clinical phase III for the treatment of brain tumors (glioblastoma)⁹.

My research has also focused in the study of proteins by NMR, from their solution structure, stability and folding, to their mutual interactions. E.g. we studied recently the interaction of the tumor suppressor protein p53 with Bclx¹⁰ and the chaperon Hsp90¹¹. The advantage of NMR over the X-ray structural methodology results from the fact that the molecules can be studied in solution which can be used for not-crystallizing proteins and conditions can be varied to mimic the biological environments. So we were able to determine the structures of the folded C-terminal¹² and N-terminal¹³ domains of spider silk under conditions of storage but also as found in silk fibers (different salt concentration and pH) which could explain how a spider can store a protein under very high concentration without aggregation but form in parts of a second a silk thread which has higher stability as any other material.

My interests of research have also explored other scientific areas: Recently we used optimized peptides or peptidomimetics to specifically target cancer related receptors such as the chemokine receptor CXCR4¹⁴ and several integrin subtypes. Optimized ligands are modified by attaching positron emitting nuclei (e.g. ¹⁸F or ⁶⁸Ga).¹⁵ Great attention has also been devoted to

multiple *N*-methylation of cyclic peptides as a new tool to achieve oral availability of biologically active peptide (drugs).¹⁶

Thus, my career has moved from organic chemistry via physical methods to bioactive peptides as drugs, and now faces new challenges in the fields of Molecular Imaging and biomaterials. I have always found peptide chemistry an exciting field which is ideally suited to perform multidisciplinary work for understanding biological function and for solving medicinal problems.

It is my pleasure to thank first all of my engaged coworkers who accompanied my research with passion and enthusiasm. They inspired me with new ideas and performed their experiments carefully and reliably. My thanks go also to the different institutions and companies which sponsored our research. I feel strongly honored to receive the Akabori Memorial Award and to follow the array of excellent peptide chemists who received it before.

References

- 1) H. Kessler; Detection of Hindered Rotation and Inversion by NMR Spectroscopy; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 219–235.
- 2) H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger; Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Background and Overview of the Experiments; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 490–536.
- 3) see e.g. a) H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock, H. R. Loosli; Assignment of Carbonyl Carbons and Sequence Analysis in Peptides by Heteronuclear Shift Correlation via Small Coupling Constants with Broadband Decoupling in t 1 (COLOC); *J. Magn. Reson.* **1984**, *57*, 331–336.
b) H. Kessler, P. Schmieder, H. Oschkinat; 3 D Heteronuclear NMR Techniques for Carbon-13 in Natural Abundance; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8599–8600.
- 4) H. R. Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H. P. Weber, T. J. Petcher, A. Widmer; The Conformation of Cyclosporin A in the Crystal and in Solution; *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 682–704.
- 5) H. Kessler; Conformation and Biological Activity of Cyclic Peptides; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–523.
- 6) H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller; Conformation of cyclic peptides. Principle concepts and the design of selectivity and superactivity in bioactive sequences by 'spatial screening'; *Pure & Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201–1205.
- 7) M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler; Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides: strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P 1 ; *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.
- 8) M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler; *N*-Methylated Cyclic RGD Peptides as Highly Active and Selective $\alpha v\beta_3$ Integrin Antagonists; *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.

- 9) C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, H. Kessler; Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate. Design, synthesis and clinical evaluation, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 753-768.
- 10) F. Hagn, C. Klein, O. Demmer, N. Marchenko, A. Vaseva, U. M. Moll, H. Kessler, Bcl-xL Changes Conformation upon Binding to Wild-type but Not Mutant p53 DNA Binding Domain, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 3439-3450.
- 11) F. Hagn, S. Lagleder, M. Retzlaff, J. Rohrberg, O. Demmer, K. Richter, J. Buchner, H. Kessler, Structural analysis of the interaction of the heat shock protein 90 with the tumor suppressor protein p53, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *10*, 1086-2114.
- 12) F. Hagn, L. Eisoldt, J. Hardy, C. Vendrely, M. Coles, T. Scheibel, H. Kessler, A highly conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly, *Nature* **2010**, *465*, 239-242.
- 13) F. Hagn, C. Thamm, T. Scheibel, H. Kessler; pH Dependent Dimerisation and Salt Dependent Stabilisation of the N-terminal Domain of Spider Dragline Silk - Implications for Fibre Formation, *Angew.Chem.Int. Ed.* **2011**, *50*, 310-313.
- 14) O. Demmer, A.O. Frank, F. Hagn, M. Schottelius, L. Marinelli, S. Cosconati, R. Brack-Werner, S. Kremb, H.-J. Wester, H. Kessler; A Conformationally Frozen Peptoid Boosts CXCR 4 Affinity and Anti-HIV Activity, *Angew Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8114-8117.
- 15) M. Schottelius, B. Laufer, H. Kessler, H.-J. Wester, Ligands for mapping $\alpha\beta3$ -integrin expression in vivo, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 969-980.
- 16) J. G. Beck, J. Chatterjee, B. Laufer, M. Udaya Kiran, A. O. Frank, S. Neubauer, O. Ovadia, S. Greenberg, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, Intestinal Permeability of Cyclic Peptides: Common Key Backbone Motifs Identified, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12125-12133.

* **Editor's note:** Editor asked him what had happened at that time. She got to know the following story. Here is the excerpt from his e-mail.

“Concerning my escape from East Germany (“DDR”) I could tell you a long story. I was prepared for the event long before and had copied all my certificates and signed by a lawyer and deposited in West Berlin. However, I wanted to finish my study in Leipzig and was already working for my Masters Thesis (in Inorganic chemistry !). Four weeks before the wall was erected there was an almost hidden article in the official newspaper, which we are forced to read (the newspaper, not the article). This was a faint hint that something will happen. Also everyday so many people escaped that an extrapolation yielded that the DDR is empty in one year.

Hence I took a train to Berlin (all my relatives, including my parents and my brother stayed in East Germany), which was controlled heavily and especially

young guys were filtered out and interrogated. This also happened to me and I could convince the police that I am only interested in culture to see in (East) Berlin. I was searched completely but I had nothing with me that could be taken as a sign to leave the country. The going by S-Bahn (city line) from east to west Berlin is a story to tell also. To make it short, I was immediately flown out of West-Berlin (August 8) to West Germany and in the camp I looked for a place to finish my study. I intended to be specialized in Physical Chemistry. In Tuebingen there was Kortüm, a well known physical chemist, who has written several text books. In my greenness I assumed that a professor who writes textbooks should also be a great scientist. The first years were not easy as I was really poor, but was steadily improved as I was supported by my supervisor Eugen Müller during my scientific work for the masters and Ph.D. Anyway, finally I ended in Organic Chemistry. I had an interesting life.”

Horst Kessler
Institute for Advanced Study, Technische
Universität München, Germany
horst.kessler@ch.tum.de

平成24年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

このたび、栄えある日本ペプチド学会奨励賞をいただきました。会長の下東康幸先生をはじめとする理事、監事、評議員の先生方、および選考にあられました諸先生方に心から感謝申し上げます。私は徳島大学大学院薬学研究科を修了後、米国スクリプス研究所 Kim D. Janda



重永 章

教授研究室にて研鑽を積んだのち、2005年より徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 大高 章先生研究室のスタッフとして研究に従事しています。本稿では大高研究室へ赴任後、一貫して行っております研究「刺激応答型アミノ酸の開発とペプチド機能制御への展開」について紹介させていただきます¹⁾。

1. はじめに

ペプチドを基盤とするケミカルバイオロジー分野において、その機能を外部から制御する方法論が求められています。外部からの刺激によるペプチド主鎖切断は機能の劇的变化が期待できることから、近年、精力的に研究が進められています (図1)。本手法では刺激により主鎖切断を誘起する刺激応答部位をペプチド中へ導入し、ここへ対応する刺激を与えることでその不活性化もしくは活性化を行います。現在までに開発された刺激応答部位は、特定の刺激にのみ応答するよう設計されています。このため、別の刺激に応答するペプチドを調製する場合、刺激応答部位を一から設計および合成しなおす必要がありました。これに対し著

者らは、保護基を置換するのみで種々の刺激に反応可能な人工アミノ酸、すなわち刺激応答型アミノ酸の開発を行うこととしました²⁾。

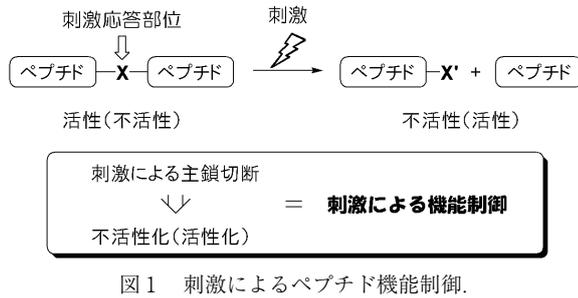
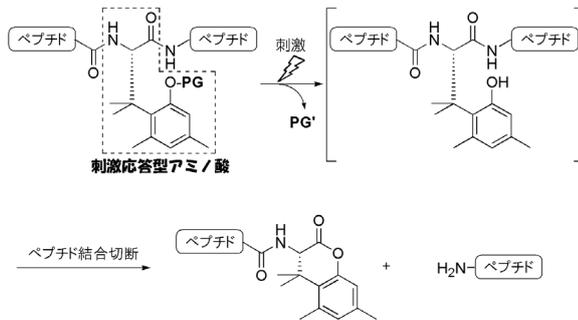


図1 刺激によるペプチド機能制御.

2. 刺激応答型アミノ酸の開発

刺激応答型アミノ酸の分子設計を図2に示します。図中のPGは、対応する刺激により除去可能な保護基を表します。刺激応答型アミノ酸を含むペプチドへ対応する刺激を与えると、まずPG部位が除去されます。生じた無保護トリメチルロック部位は、温和な条件下においてラクトン化反応を誘起します³⁾。この結果、ペプチド結合が切断される設計です。現在までにPG部位を種々置換し、紫外線応答型²⁾、近赤外二光子励起応答型⁴⁾、アルカリホスファターゼ応答型²⁾、チオール応答型⁵⁾、および低酸素環境応答型アミノ酸⁶⁾の開発に成功しています。あわせて、共通合成中間体の不斉合成法を確立し、一部刺激応答型アミノ酸の立体選択的合成を達成しています⁷⁾。さらに、アミノ酸配列がペプチド結合切断反応速度に与える影響についても明らかにしました⁸⁾。現在、他の刺激応答型アミノ酸の開発について検討しており、この内のいくつかは遠からず公表できそうです。



刺激	PG	刺激	PG
紫外線		アルカリホスファターゼ*	
近赤外二光子励起*		チオール*	
		低酸素環境	

図2 刺激応答型アミノ酸の分子設計 (PG: 刺激により除去可能な保護基; *ラセミ体として合成).

3. ペプチド機能制御への展開

冒頭でも述べた通り、ペプチドを基盤とするケミカルバイオロジー分野において、その機能を外部から制御する方法論が求められています。現在までに、種々

の機能制御法が報告されています。これら方法は活性型から不活性型への変換、もしくは不活性型から活性型への変換を可能とするものでした (図1)。これら手法は、ペプチド機能の“ON” → “OFF” もしくは “OFF” → “ON” 制御法と見做すことができます。これに対し著者らは、これまでに報告例のない “ON” → “ON” 制御法、すなわちある活性ペプチドへ刺激を与えることにより別の活性ペプチドへと変換する方法の開発を目指しました²⁾。分子設計を図3に示します。このペプチドは、紫外線応答型アミノ酸のN末端側に活性ペプチドAを、C末端側にはイソペプチド化により失活させたペプチドBを有します。このため本ペプチドは、まずペプチドA由来の活性を示します。ここへ紫外線を照射するとペプチド結合切断反応が起こり、イソペプチド中間体を生じます。この中間体はクリックペプチド同様、ただちにO → Nアシル基転移反応をおこし⁹⁾、セリンを含む活性ペプチドBを生成します。つまり本ペプチドの機能は、紫外線照射をトリガーとして“A”から“B”へと変換される設計です。

この設計に基づき、核-細胞質シャトルペプチドを開発しました。このペプチドはペプチドAとして細胞膜透過ペプチドおよび核移行シグナル配列を、ペプチドBとして核外移行シグナル配列を含みます。本ペプチドを細胞へ添加したところ、設計通りまず核内へ移行し (機能A)、紫外線照射をトリガーとして細胞質へ再移行する (機能B) ことが明らかとなりました。この結果から、著者らの設計したペプチド機能 “ON” → “ON” 制御法が細胞内においても実用可能であることが証明されました。

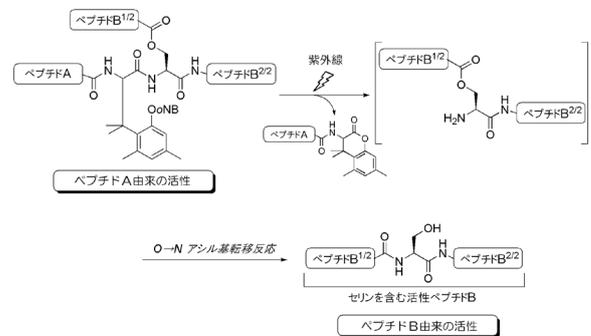


図3 紫外線応答型アミノ酸を基盤としたペプチド機能制御 (oNB: o-ニトロベンジル基).

著者らは、刺激応答型アミノ酸の他の応用についても精力的に研究を展開しています。詳細については割愛しますが、細胞内移行をトリガーとしてDNAを放出するDNA送達システムの基盤技術⁵⁾ やセラミド濃度の時空間的制御を可能とするケージドセラミド¹⁰⁾、低酸素環境応答型蛍光色素を開発しました⁶⁾ (図4)。この他にも “ON” → “ON” 制御系同様の機能変換を利用したin cellタンパク質ラベル化法の開発など、様々な応用研究が現在進行中です。また、刺激応答型アミノ酸と類似した分子骨格を基盤とした酵素活性制御系の構築についても鋭意検討しているところです¹¹⁾。

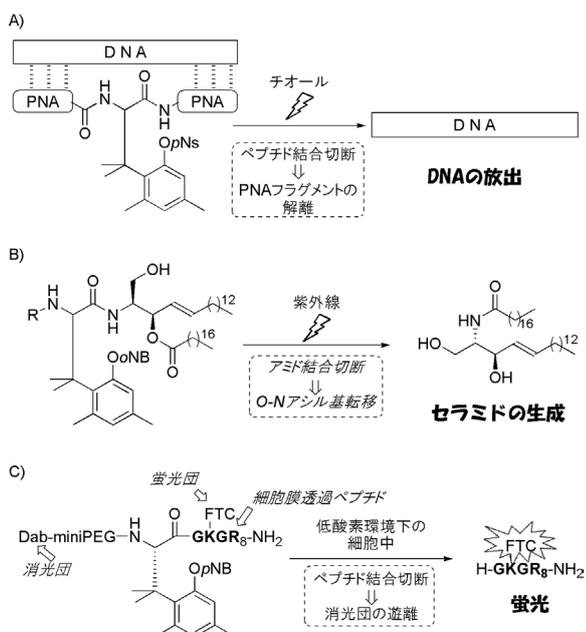


図4 刺激応答型アミノ酸の応用研究 (oNB: *o*-ニトロベンジル基; PNA: ペプチド核酸; pNs: *p*-ニトロベンゼンスルホニル基). A) チオール応答型 DNA 放出システム; B) ケージドセラミド; C) 低酸素環境応答型蛍光色素.

4. おわりに

以上、刺激応答型アミノ酸の開発とペプチド機能制御への展開について概説しました。著者は今後、刺激応答型アミノ酸を起点とした様々な基礎・応用研究をさらに展開し、これら成果をペプチド討論会にて発表できるよう精進するとともに日本ペプチド学会のさらなる発展に微力ながらも貢献したいと考えております。これからも学会員皆様のご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

最後になりましたが、本研究を行うにあたり終始温かくご指導くださいました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 大高 章先生に深く感謝いたします。あわせて、引用文献に記載しました共同研究者の諸先生方および学生の皆様に心よりお礼申し上げます。本研究の一部は科学研究費補助金 若手研究 (B)、基盤研究 (C)、新学術領域研究「融合マテリアル」(領域番号2206)、アステラス病態代謝研究会、武田科学振興財団、国際科学技術財団、三菱化学研究奨励基金、および有機合成化学協会味の素研究企画賞の助成を受けて行われたものであり、ここに深謝いたします。

参考文献

- 1) 重永 章. 薬学雑誌 **132**, 1075-1082 (2012).
- 2) A. Shigenaga, D. Tsuji, N. Nishioka, S. Tsuda, K. Itoh, A. Otaka, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1929-1931.
- 3) S. Milstien, L. A. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 1143-1147 (1970); M. Levine, R. T. Raines, *Chem. Sci.* **3**, 2412-2420 (2012).
- 4) A. Shigenaga, J. Yamamoto, Y. Sumikawa, T. Furuta, A. Otaka, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2868-2871.
- 5) A. Shigenaga, J. Yamamoto, H. Hirakawa, K. Ogura, N. Maeda, K. Morishita, A. Otaka, *Tetrahedron Lett.* **2010**,

51, 2525-2528.

- 6) A. Shigenaga, K. Ogura, H. Hirakawa, J. Yamamoto, K. Ebisuno, L. Miyamoto, K. Ishizawa, K. Tsuchiya, A. Otaka, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 968-971.
- 7) A. Shigenaga, J. Yamamoto, N. Nishioka, A. Otaka, A. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 7367-7372.
- 8) A. Shigenaga, J. Yamamoto, H. Hirakawa, K. Yamaguchi, A. Otaka, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2212-2216.
- 9) Y. Kiso, A. Taniguchi, Y. Sohma "Wiley Encyclopedia of Chemical Biology" Vol. 1, ed. by Begley, T. P., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2009, pp. 379-383.
- 10) A. Shigenaga, H. Hirakawa, J. Yamamoto, K. Ogura, M. Denda, K. Yamaguchi, D. Tsuji, K. Itoh, A. Otaka, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3984-3990.
- 11) A. Shigenaga, K. Morishita, K. Yamaguchi, H. Ding, K. Ebisuno, K. Sato, J. Yamamoto, K. Akaji, A. Otaka, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8879-8886.

しげなが あきら
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
(薬学系)
shigenaga.akira@tokushima-u.ac.jp

平成24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賜りまして大変光栄に感じております。学会長の下東康幸先生をはじめ、理事、幹事、評議員、選考委員の諸先生方に、本紙面をお借りしまして厚く御礼申し上げます。本稿では、受賞の対象となりました「生理活性ペプチドの高機能性誘導体設計と動態制御学的研究」についてご紹介させていただきます。



尾上 誠良

1. はじめに

私は岡山大学大学院薬学研究科を修了後、数年前まで企業に所属して医薬品の研究開発に従事しておりました。企業研究者となって一年目に、故・矢内原昇先生(静岡県立大学薬学部 名誉教授)が当時所属していた食品会社医薬品部門の顧問に就任され、たいへん厳しくも温かい先生独特の御指導を受ける好機を得ました。矢内原昇先生は残念ながら2001年に急逝され、その後、奥様の故・矢内原千鶴子先生(元・大阪薬科大学理事長、2011年に御逝去)が救いの手を差し伸べて下さり、引き続き御指導を受けることができました。予期せぬうちに矢内原御夫妻による指導を受けることが出来た筆者はたいへん幸運と常々感謝しつつ研究活動を進め、また、この御指導の御陰で自らの研究の方向性が徐々に固まって参りました。メガファーマ勤務を経て今は矢内原御夫妻がかつて教鞭をとられた静岡県立大学薬学部の教員となり、生理活性ペプチドの医薬応用を目指した高機能性誘導体とその体内動態制御を目的としたdrug delivery system (DDS) の開

発をテーマとして学生達と一緒に日々取り組んでおります。

2. 血管作動性腸管ペプチドの構造活性相関研究

一般に生理活性ペプチドは物理化学的ならびに生物化学的にハンドリングが容易でないことが多く、それ故、それらを医薬応用するには多くの化学的あるいは薬剤科学的な工夫が必要となります。たとえば (i) 構造改変による代謝安定性の向上、(ii) 作用持続のための製剤学的工夫、(iii) 副作用回避のための特異的薬物送達法の開発等を余儀なくされますが、我々も血管作動性腸管ペプチド (vasoactive intestinal peptide, VIP) の医薬応用を目指して種々検討を行っています。VIPは強い抗炎症作用と気管支平滑筋弛緩作用を併せ持ち、これらの興味ある生理活性により、炎症性呼吸器疾患治療薬としての応用が強く期待されています。また、網羅的な臨床・疫学調査によって、呼吸器系におけるVIP欠損と喘息発症の因果関係を示唆するデータが得られ、VIP受容体アゴニストの喘息治療薬としての可能性がより強く支持されています。しかし、VIPは体内においてペプチダーゼによって速やかに分解され、作用持続が短くなることに加え、経口投与では生物学的利用率が低いため薬理効果が発現しにくいなどの問題点が指摘されています。また、静脈内投与などの非局所投与では低血圧やその他の副作用の危険性が高まると予測され、これらの短所を克服するため、近年、戦略的創薬の観点から生物学的に安定なVIP誘導体の合成と標的臓器への特異的な薬物送達を指向した新規製剤の開発がグローバルに進められています(表1)¹⁾。まず、我々は多くの合成VIP誘導体を用いて代謝安定性やアデニル酸シクラーゼ活性化作用を指標にVIPの構造活性相関研究を網羅的に行い、新規誘導体開発の手がかりを探しました。その結果、(i) VIPの4, 5位アミノ酸はPAC1, VPAC1, VPAC2受容体間の選択性に寄与する²⁾、(ii) VIPのC末端へ

リックス構造はVPAC1/2受容体への結合に関与する³⁾、(iii) VIPの活性最小単位はN末から23残基である⁴⁾、(iv) 17位のメチオニンは酸化されるとヘリックス構造を壊し、活性を著しく低下させること¹⁾を示唆するデータをそれぞれ得ることができました。これらの情報を基にさらに構造活性相関研究を進展させた結果、15, 20, 21番目のアミノ酸残基であるLysをArgに変更し、17番アミノ酸残基のMetをLeuに置換したVIP誘導体([R^{15,20,21}, L¹⁷]-VIP)は代謝安定性において著しい改善をもたらすことを明らかにしました⁵⁾。さらに、この誘導体のC-末端を延長させた[R^{15,20,21}, L¹⁷]-VIP-GRR (IK312532)は更に高い代謝安定性を有し、*in vitro*および*in vivo*において天然のVIPよりも高い生物活性を示しました¹⁾。

3. 生理活性ペプチドの肺特異的DDS開発

代謝安定性に優れたVIP誘導体を得たものの、VIPまたはその誘導体の経口投与は低い酸安定性と乏しい膜透過性のために現実的ではなく、それ故、注射剤あるいはその他の投与形態の開発が医薬応用に際して必要不可欠となります(図1)。そこで我々はVIP誘導体の喘息や慢性閉塞性肺疾患(COPD)への適用を目指した粉末吸入製剤試作を検討しました。一般に吸入する粒子の粒径は薬物の肺到達量あるいは到達部位に大きな影響を与え、呼吸器系疾患への適用には数 μm 程度の粒径が好ましいと考えられています。一方、あまりにも細かい粒子(<0.5 μm)はタバコの煙と同様に呼気と共に体外に出てしまい、粒径のコントロールは極めて重要な課題です⁶⁾。そこで我々はVIP誘導体含有粒子の平均粒径を5 μm 以下にすべく、VIP誘導体とエリスリトールの混合物をJet millにて粉碎し、次に粒径50-60 μm の乳糖キャリアー(Respitose SV-003, DMV Japan)と混和することによって、安定した粉末吸入製剤を得ることができました。本製剤は人工肺モデルであるカスケードインパクトを用いた*in*

表1 既報のVIP受容体アゴニスト

	Affinity (IC ₅₀ ; nM) ²⁾		5	10	15	20	25	30
	VPAC1	VPAC2						
Naturally occurring peptides								
VIP	1.6	5.3	H S D A V F T D N Y	T R L R K Q M A V K	K Y L N S I L N			
PACAP27	2.0	10	- - - G I - - - S -	S - Y - - - - - - -	- - - A A V -			
VPAC1 agonists								
[A ^{11,22,28}]-VIP (Nicole et al. 2000)	0.9	2,352	Selectivity		- - - - - A - - - - - A - - - - - A			
[K ¹⁵ , R ¹⁶ , L ¹⁷]-VIP(1-7)/GRF(8-27) (Robberecht et al. 1998)	1.0	>30,000	>30,000		- - - - - N S - R K V L - R L S A R	- L - Q D - -		
GRF-6 (Ito et al. 2001)	2.6	>30,000	>11,538		- _p A - - I - - A ₁₆ A - R K V L A A L A ₁₆ A R	- A - A A A G ₁₆		
[R ¹⁶]-chicken Secretin (Robberecht et al. 1998)	60	5,000	83		- - - G L - - S E - S K M - G R A Q V Q	- F I Q N L M		
[Y ⁹ , Dip ¹⁸]-VIP (Tams et al. 2000)	0.1 ^{b)}	53 ^{b)}	482		- - - - - Y - - - - - Dip - - - - - - - -			
[A ^{2,8,9,11,19,22,24,25,27,28}]-VIP (Igarashi et al. 2005)	11.5	>30,000	>2,609					
VPAC2 agonists								
Ro 25-1392 (Xia et al. 1997)	>1,000 ^{d)}	9.6 ^{e)}	>104	acetyl-	- - - - - E - _m Y - K - - - - Nle - A -	K ⁺ - - - D ⁺ L K K K		
Ro 25-1553 (Bolin et al. 1995)	800	1.0	800	acetyl-	- - - - - E - - - - K - - - - Nle - A -	K ⁺ - - - D ⁺ L K K G G T		
BAY 55-9837 (Tsutsumi et al. 2002)	8,700	60	145		- - - - - V - A - - - - - V - A -	- - - Q - - K - K R Y		
BAY(Q9Q28C32)PEG43 (Pan et al. 2007)	>10,000	200	>50		- - - - - Q - - - - - V - A -	- - - Q - - K Q K R Y C-PEG(43kDa)		
PG 96-277 (Moreno et al. 2000)	1,000	3.0	333	acetyl-	- - - - - E - - - - K - - - - R Nle - A -	Nle - - - N L K K G G T		
Nonselective agonists								
stearyl-[Nle ¹⁷]-VIP (Gourlet et al. 1998)	5	1		stearyl-	- - - - - - - - - - - Nle - - - - - - - -			
[R ^{15,20,21} , L ¹⁷]-VIP-GRR (Onoue et al. 2004)		1.4			- - - - - - - - - - - R - L - - R R	- - - - - G R R		
[R ^{15,20,21} , L ¹⁷]-VIP(1-23) (Onoue et al. 2004)		48			- - - - - - - - - - - R - L - - R R - -			

*, Ro25-1392 と Ro25-1553 では Lys²¹ と Asp²⁵ の側鎖間で lactam ring が形成されている。Aib, α -aminoisobutyric acid; Gab, γ -aminobutyric acid; Dip, β , β -diphenyl-L-alanine; mY, methoxy-tyrosine.

in vitro delivery 予試験において、吸入したVIP誘導体のうち約30%が気道あるいは肺へ到達することを確認でき、吸入時の肺局所における薬効発現が期待できます。また、局所投与とすることで、注射での投与に比べてその投与量を減らすことが可能となり、また全身性の副作用軽減をもたらすものと考えます。

4. ペプチド性粉末吸入製剤の薬理効果

ラット気道炎症モデルを作成し、VIP誘導体粉末吸入製剤の作用について検証を行いました⁷⁾。抗原感作ラットではTh2細胞由来サイトカインのmRNAレベルの上昇が観察され、一方でIFN- β などTh1細胞由来サイトカインの変動は認められず、すなわち抗原感作がTh1/Th2バランスに影響を及ぼすことが示唆されます。これによって炎症性細胞の著しい肺組織内浸潤を認め、好中球およびマクロファージ由来の炎症の指標となる血漿中 Myeloperoxidase (MPO) 活性は有意な上昇を示します。一方、安定型VIP誘導体IK312532の粉末吸入製剤(50 μ g/rat)の前処置によって肺中の免疫系細胞の動員を著しく阻害し、気道粘膜の肥厚を有意に抑制することが明らかとなりました(図2A)。さらに炎症性バイオマーカーの有意な減少が認め、肺炎における既知の病態過程と合わせて、VIP誘導体の抗炎症活性には、炎症カスケードの上流に位置する細胞遊走因子や炎症性ケモカインの放出に対する直接的な調節機能が関与していることを示唆しました。また、近年COPDの病態をより反映しているタバコ煙曝露モデルでも同製剤の効果について検証を行いました⁸⁾。ラットにタバコを11日間連日曝露し、最終曝露の1時間後にIK312532粉末吸入製剤(50 μ g/kg)を気道内投与して各種バイオマーカーの変動をモニタリングしました。タバコ煙曝露群では上皮組織の著しい肥厚、炎症性細胞の浸潤、杯細胞の過形成さらには間質細胞におけるアポトーシス誘発が見られたものの、IK312532粉末吸入製剤投与群ではこれらの現象は有意に抑制されました(図2B)。この効果は肺胞洗浄液中ならびに血漿中の各種バイオマーカーと良い対応を示し、すなわち持続型VIP誘導体の粉末吸入製剤が強い炎症性呼吸器疾患に有用である可能性を強く示唆するものと考えました。

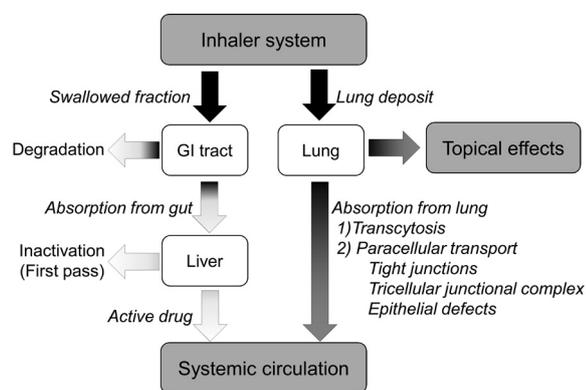


図1 ペプチド吸入製剤の体内動態。矢印の黒色はペプチド量を反映する。

5. より強い持続性を有した特殊粉末吸入製剤の開発

代謝安定性を向上させたVIP誘導体を用いても、十分な治療効果を得るためには1日に複数回の吸入を必要とする可能性があります。そこで、1日1回の投与を目指して生分解性ポリマーを用いた作用持続型粉末吸入製剤の開発を試みました⁹⁾。まず、以前我々がグルカゴンを対象として開発したエマルジョン溶媒拡散法によって徐放性製剤を試作したところ¹⁰⁾、平均粒子径140nmのnanosphereを獲得し、本粒子は約20%の初期バーストおよびその後の徐放性放出により24時間以内で約55%の放出を認めました(図3)。Nanosphereを含有した粉末吸入製剤の吸入特性評価を行ったところ、粉末吸入製剤として適切な吸入特性を持つことが明らかとなりました。この徐放性粉末吸入製剤と非徐放性吸入製剤をラットにそれぞれ投与(VIP誘導体として10 μ g/rat相当)したところ、いずれも投与後すぐに強い抗炎症作用を示しましたが、非徐放性吸入製剤では抗原感作後24時間では血漿中ならびにBALF中MPO活性の上昇を認めました。一方、徐放性粉末吸入製剤では少なくとも抗原感作後24時間程度まではその活性を保持し、すなわち、開発した新規製剤は投与回数が少ない非侵襲投与形態として今後の展開が期待されます。

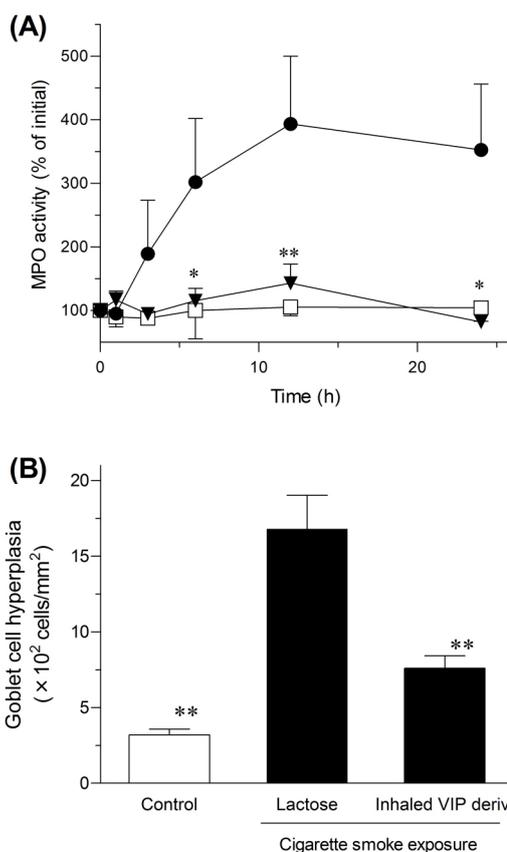


図2 VIP誘導体(IK312532)粉末吸入製剤の薬理作用。(A)抗原感作モデルにおける血漿MPO活性。□,コントロール;●,抗原感作モデルラット;吸入製剤を前投与した抗原感作モデルラット。(B)タバコ煙曝露モデルにおける杯細胞の過形成。**, $P < 0.01$;*, $P < 0.05$ vs 各モデルラットのデータ。

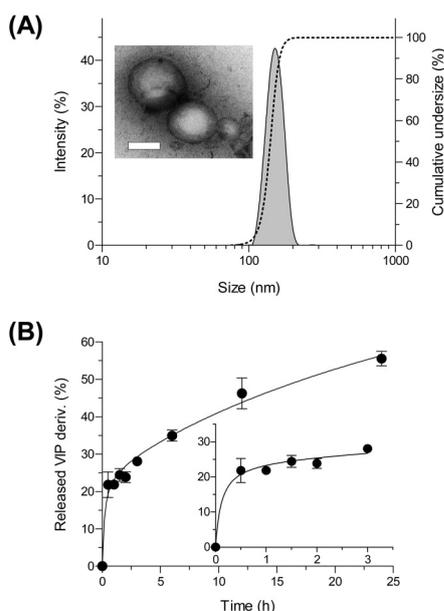


図3 VIP誘導体 (IK312532) 徐放性粉末吸入製剤。(A) 透過型電子顕微鏡観察における外観と動的光散乱法による粒度分布。バーは100nm。(B) 精製水中におけるペプチド放出挙動。

6. さいごに

本稿ではVIP誘導体のDDSについてご紹介しましたが、生理活性ペプチドの医薬応用の際には適切なDDSの開発が必須となることが多く、我々はより安全性と有効性の高い効果的DDS技術の開発に寄与したいと考えています。特にこれらの戦略的研究開発によって将来的にVIPまたはその誘導体が呼吸器疾患治療に大きく貢献し、VIPが“Very Important Peptide”とも称されるような日が来ることを強く期待するところです。

当該研究成果は、静岡県立大学名誉教授 故・矢内原昇博士、大阪薬科大学前理事長 故・矢内原千鶴子博士、静岡県立大学山田静雄教授の御指導、伊藤ハム株式会社医薬品部門（現 ILS 株式会社）ならびにファイザー株式会社所属時の多くの同僚研究者のご協力、多くの元・現学生の皆さんの努力の所産であり、本紙面をお借りして深謝致します。

References

- 1) Onoue, S., S. Yamada, and T. Yajima, *Bioactive analogues and drug delivery systems of vasoactive intestinal peptide (VIP) for the treatment of asthma/COPD*. Peptides, 2007. **28**(9): p. 1640-50.
- 2) Onoue, S., et al., *The neuromodulatory effects of VIP/PACAP on PC-12 cells are associated with their N-terminal structures*. Peptides, 2001. **22**(6): p. 867-72.
- 3) Onoue, S., et al., *Alpha-helical structure in the C-terminus of vasoactive intestinal peptide: functional and structural consequences*. Eur J Pharmacol, 2004. **485**(1-3): p. 307-16.
- 4) Onoue, S., et al., *Structure-activity relationship of synthetic truncated analogues of vasoactive intestinal peptide (VIP): an enhancement in the activity by a substitution with arginine*. Life Sci, 2004. **74**(12): p. 1465-77.

- 5) Onoue, S., S. Misaka, and S. Yamada, *Structure-activity relationship of vasoactive intestinal peptide (VIP): potent agonists and potential clinical applications*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2008. **377**(4-6): p. 579-90.
- 6) Onoue, S., et al., *In vitro and in vivo characterization on amorphous solid dispersion of cyclosporine A for inhalation therapy*. J Control Release, 2009. **138**: p. 16-23.
- 7) Onoue, S., et al., *New treatments for chronic obstructive pulmonary disease and viable formulation/device options for inhalation therapy*. Expert Opin Drug Deliv, 2009. **6**(8): p. 793-811.
- 8) Onoue, S., et al., *Inhalable powder formulation of vasoactive intestinal peptide derivative, [R15,20,21, L17]-VIP-GRR, attenuated neutrophilic airway inflammation in cigarette smoke-exposed rats*. Eur J Pharm Sci, 2010. **41**(3-4): p. 508-14.
- 9) Onoue, S., et al., *Inhalable sustained-release formulation of long-acting vasoactive intestinal peptide derivative alleviates acute airway inflammation*. Peptides, 2012. **35**(2): p. 182-9.
- 10) Onoue, S., et al., *Inhalable sustained-release formulation of glucagon: in vitro amyloidogenic and inhalation properties, and in vivo absorption and bioactivity*. Pharm Res, 2011. **28**(5): p. 1157-66.

おのうえ さとみ
静岡県立大学 薬学部 薬物動態学分野
onoue@u-shizuoka-ken.ac.jp

平成24年度 Excellent Stone Awardを受賞して

2012年11月7日から9日にかけて鹿児島県民交流センターで開催された第49回ペプチド討論会において若手口頭発表の機会を与えていただきました実行委員会の諸先生に、まずこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。修士1年生で初めてペプチド討論会に参加した際に若手口頭発表者の皆様が英語で質疑応答なさる姿を拝見して、私もいつかあの舞台上に立ちたいという憧れを抱きました。あれから4年たち、学生のうちに受賞できる最初で最後のチャンスでしたが、若手口頭発表者が多かったなかでExcellent Stone Awardを賜りましたこと、審査員の諸先生に厚く御礼申し上げます。壇上では緊張で震えていましたが、発表の機会を与えていただきながら弱気になるわけにはいかないと踏ん張った結果、最優秀賞という名誉な賞を賜り、驚きとともに皆様への感謝の気持ちでいっぱいになりました。それでは、受賞の対象になりました発表演題「Synthesis of an Artificial gp41-C34 Trimer as an HIV-1 Fusion Inhibitor」について簡単にご紹介させていただきます。



橋本 知恵

Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) はヒトの免疫系で重要な役割を果たすCD4陽性細胞に感

染し、免疫不全を引き起こすエイズの原因ウイルスです。HIV-1が発見されてから30年が過ぎた今、種々開発された抗 HIV-1薬の中から複数の薬剤を組合せて投与する多剤併用療法 (HAART) が成果を上げています。一方で、インフルエンザウイルスなどのウイルスとは異なり、未だ有効なワクチンが開発されていないというのが現状です。近年、先進国では唯一日本が、また中東および北アフリカなどでは新規感染者数が増加の傾向にあり、感染を予防および治療するためのエイズワクチン開発は急務であります¹⁾。

現在までに明らかにされている HIV-1 の宿主細胞への侵入機構を以下に示します。まず、HIV-1 外被タンパク質 gp120 は宿主細胞上の第一受容体 CD4 と結合した後に第二受容体 CCR5/CXCR4 と結合します。これらの結合によって HIV-1 外被タンパク質 gp41 の立体構造変化が誘起され、gp41 の N 末端が宿主細胞膜に突き刺さります。その後、gp41 の N 末端ヘリックス領域 (NHR) のホモ三量体と C 末端側ヘリックス領域 (CHR) のホモ三量体がヘテロ 6 量体 (6 helical bundle, 6HB) を形成することで HIV-1 と CD4 陽性細胞との間で膜融合が起こり、感染が成立します (図 1)。よって、6HB 形成を阻害すれば、膜融合および HIV-1 の侵入を阻害できると考えられます。

当研究室ではこれまでに、NHR の立体構造を特異的に認識する抗体によって 6HB 形成を阻害するため、NHR 由来ペプチド N36 を 3 本の等価なリンカーを有する C₃ 対称性テンプレート上に集積させた抗原分子 N36 trimer mimic の合成に成功しております。N36 trimer をマウスに免疫して得られた抗 N36 trimer 抗体は、抗原である N36 trimer の立体構造を特異的に認識し、抗 N36 trimer 抗体は N36 monomer を免疫して得られた抗 N36 monomer 抗体よりも 4 倍高い中和活性を示しました²⁾。標的分子の立体構造を模倣した抗原分子設計が有効であることが示唆されたことから、N36 trimer と同様に CHR 由来ペプチド C34 を C₃ 対称性テンプレート上に集積させた C34 trimer は、抗原である C34 trimer の立体構造を認識する中和抗体を誘導するのではないかと考えました。

まず、ペプチドの水溶性向上のために C34 のアミノ酸配列の C 末端に Arg と Glu の繰返し配列 (RE)₃ を挿入し、C 末端をチオエステル化したペプチド C34 monomer-thioester を合成しました (図 2 a)。また、コントロールペプチドとして C 末端をチオエステル

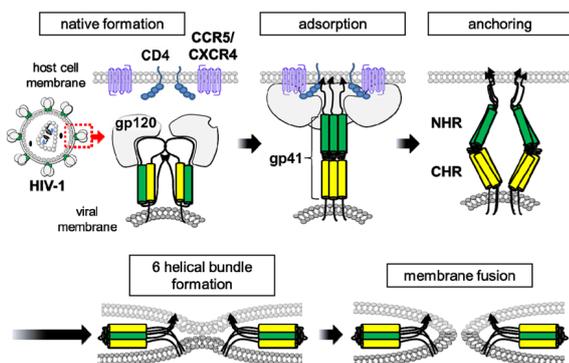


図 1 HIV-1 と宿主細胞との膜融合機構

化しないペプチド C34 monomer も合成しました (図 2 b)。C34 ペプチドを 3 本束ねることができるよう新たな C₃ 対称性テンプレートを設計しました。水溶性を向上させるために 3 本の等価なリンカーの骨格には PEG を用い、C34 monomer-thioester との反応点としてリンカーの末端に Cys を縮合させました。次に、C34 monomer-thioester を C₃ 対称性テンプレートと native chemical ligation によって縮合し、C34 trimer mimic を合成しました (図 2 c)。

C34 trimer および C34 monomer をマウスに皮下投与して得られた血清を用い、まずは ELISA 法により抗体が産生されたかどうかを調べました。その結果、C34 trimer および monomer のどちらにおいても抗体産生を確認することができました。次に、C34 trimer の立体構造を認識する抗体が誘導されているかを ELISA 法により調べました。その結果、抗 C34 trimer 抗体は、抗 C34 monomer 抗体と比べて C34 trimer に対して 23 倍高い結合活性を有していました。さらに、産生された抗体が HIV-1 の侵入を阻害するかどうかを評価するために、血清を用いて NLA-3 株に対する侵入阻害活性を p24 ELISA により測定した結果、C34 trimer および C34 monomer を免疫して得られた血清は、いずれも同等に顕著な侵入阻害活性を有することが明らかとなりました³⁾。よって、C34 trimer は N36 trimer と同様に抗原の立体構造を特異的に認識する中和抗体の誘導に成功しました。

エイズワクチンからは話が変わりますが、2003 年に米国 FDA が Enfuvirtide/T20 (Trimeris, Roche) の使用を承認したことにより、HIV-1 感染者およびエイズ患者に対する治療薬として膜融合阻害剤が注目されています。Enfuvirtide は CHR 由来ペプチドであり、NHR と CHR の会合による 6HB 形成を阻害します⁴⁾。CHR 由来ペプチドである C34 は NHR 由来ペプチド N36 と結合することが X 線結晶構造解析からも示されていることから⁵⁾、合成した C34 trimer は N36 に結合することで膜融合阻害剤としても働く可能性があると考えました。そこで、C34 trimer および C34 monomer の抗 HIV-1 活性を評価したところ、C34 trimer は C34 monomer と比較して 100 倍高い顕著な抗 HIV-1 活性を示しました (IC₅₀ = 1.3 nM)⁶⁾。活性が 100 倍も向上した原因については現在精査を行っておりますが、

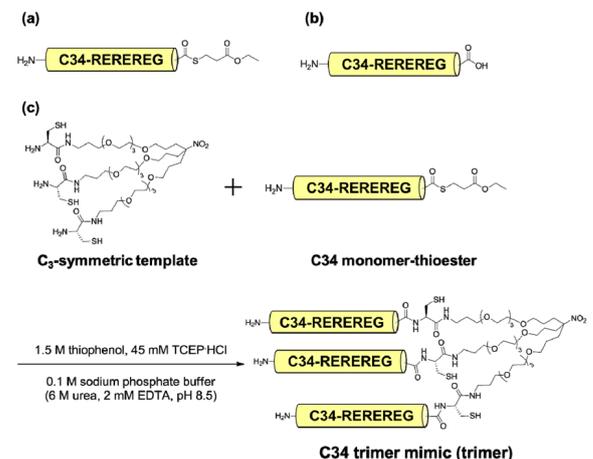


図 2 C34 ペプチド類縁体の構造および C34 trimer の合成

HIV-1外被タンパク質 gp41の立体構造を模倣した分子設計はgp41を標的とした抗原分子および膜融合阻害剤の開発において有効であることが示唆されました。

最後になりましたが、本研究は東京医科歯科大学・生体材料工学研究所の玉村啓和教授のご指導による研究であり、心より感謝申し上げます。また、抗 HIV 活性を評価していただきました国立感染症研究所の村上努博士、駒野淳博士（現大阪府立公衆衛生研究所感染症部ウイルス課）および研究員の皆様、ご指導下さった教員の皆様・先輩の皆様、日頃より支えていただいている在学生の皆様にご礼申し上げます。

“stone= 原石”は磨かなければ輝きません。玉村先生の恩師矢島治明先生も“stone= 原石”を大切にされ、ひかり輝くstoneを常に探されていたと聞いています。今は「研究者としてやっていけるのだろうか」と悩んでしまいがちな私ですが、ひかり輝ける日が来るまで立ち止まらず、がむしゃらに転がり続けようと思います。まずは、ポスドクとして海外や国内で研鑽を積み、一日でも早くひかり輝くstoneとして皆様に見出していただけるように頑張りますので、今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願ひ申し上げます。

参考文献

- 1) Hashimoto, C., Tanaka, T., Narumi, T., Nomura, W., and Tamamura, H., “The successes and failures of HIV drug discovery.” *Expert Opin. Drug Discov.*, **2011**, 6, 1067-1090.
- 2) Nakahara, T., Nomura, W., Ohba, K., Ohya, A., Tanaka, T., Hashimoto, C., Narumi, T., Murakami, T., Yamamoto, N. and Tamamura, H., “Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins Leads to Synthetic Antigen Molecules Inducing Neutralizing Antibodies.” *Bioconjugate Chem.*, **2010**, 21, 709-714.
- 3) Hashimoto, C., Nomura, W., Ohya, A., Urano, E., Miyuchi, K., Narumi, T., Aikawa, H., Komano, J. A., Yamamoto, N. and Tamamura, H., “Evaluation of a Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 as AIDS Vaccines.” *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 3287-3291.
- 4) Liu, S., Jing, W., Cheng, B., Lu, H., Sun, J., Yan, X., Niu, J., Farmar, J., Wu, S., Jiang, S., “HIV gp41 C-terminal heptad repeat contains multifunctional domains: relation to mechanism of action of anti-HIV peptides.” *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 9612-9620.
- 5) Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S., “Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein.” *Cell*, **1997**, 89, 263-273.
- 6) Nomura, W., Hashimoto, C., Ohya, A., Miyuchi, K., Urano, E., Tanaka, T., Narumi, T., Nakahara, T., Komano, J. A., Yamamoto, N. and Tamamura, H., “Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency.” *ChemMedChem*, **2012**, 7, 205-208.

はしもと ちえ
東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部
生体材料工学研究所メディシナルケミストリー分野
c.hashimoto.bio@tmd.ac.jp

32nd European Peptide Symposiumに参加して

32nd European Peptide Symposium (32nd EPS) が2012年9月2日から7日の6日間、ギリシャ・アテネのThe Megaron Athens International Conference Centreで開催されました。私にとって初めての海外旅行であり、期待と不安の入り交じる中での参加となりました。



菊池 真理

アテネはパルテノン神殿などの古代遺跡が多数残る、歴史的文化にあふれる都市です。経済危機のニュースが話題となっている時期の開催となったため、現地での生活がどのようになるか不安を抱えていましたが、到着してみると人々は皆明るく、活気にあふれる楽しい雰囲気の良い街でした。開催中は晴天が続き日中は暑さに水が手放せませんでした。夜は比較的涼しく、過ごしやすい気候でした。



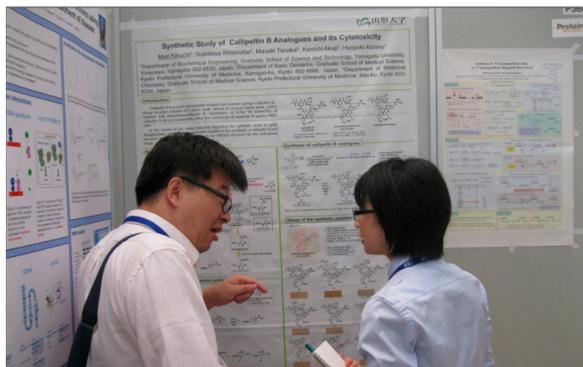
パルテノン神殿

会場となったThe Megaron Athens International Conference Centreは市街地からは少し離れたところにありましたが、交通の便が非常に良く、迷うことなくたどり着くことができました。初日にはKnud J. Jensen 先生が「From microwave heating to control of nano-scale self-assembly in peptide science」という演題で Leonidas Zervas Award 受賞講演ならびに、David J. Craik 先生が「Discovery and applications of cyclotides」という演題でJosef Rudinger 記念講演を行いました。その日の夜には会場の中庭で Welcome Receptionが行われましたが、堅苦しい雰囲気はなくすんわりとなじむことができました。そこで初めて食べたギリシャ料理は特徴的な味付けだったものの、それほど抵抗なくいただくことができました。

また、日本からは木曾良明先生をはじめ向井秀仁先生、玉村啓和先生、林良雄先生、北条恵子先生、日高興士先生など数十名の先生、企業の方がこの学会に参加されていました。2日目以降始まった講演はすべて英語のため、単語を聞き取るだけで精一杯でしたが、諸外国の先生方の講演はとても勉強になりました。Tao Ye 先生の「Total synthesis of marine cyclopeptide Scytonemin A」(O12) という講演は私の研究内容にも関連する環状ペプチドの合成についての内容であり、特に印象に残っています。また、「A total new

game for the synthesis of disulfide-containing peptides」(O01) という演題で講演された Fernando Albericio 先生とわずかな時間で話してお話しできたことはとてもうれしい出来事でした。

Poster Sessionは2, 3日目に行われ、私は3日目の夜に「Synthetic Study of Callipeltin B Analogues and its Cytotoxicity」(P368) という題目で発表させていただきました。前日には今野博行先生が「Synthesis of cyclic lipo octapeptide derivatives of burkholdines and its antifungal activity」(O44) という題目で口頭発表、当研究室の博士前期課程2年高沼大樹が「Synthesis and Evaluation of SARS 3 CL Protease Inhibitors Using the Serine Template」(P251) という題目でポスター発表しており、その様子を見て、私は英語でやり取りできるのだろうかという緊張感が増す一方でした。その日のPoster Sessionでは張り出されたポスターを見て回り、拙い英語ながら質問し、交流することができました。自身のポスター発表では私と同じく環状ペプチドの合成に取り組むドイツの方や、講演された先生方に来ていただき、しどろもどろではありましたがディスカッションすることができました。アドバイスしていただいたことを、今後の研究につなげていきたいと思えます。海外でネイティブの英語に触れられたことは貴重な経験になりました。



ポスター発表にて

4日目の午後はエクスカージョンの時間があったため、世界遺産のアクロポリスを観光してきました。近くからはもちろん、少し離れた丘から見えるパルテノン神殿の風景は感動的なものでした。近くの美術館等も散策し、普段見ることのできない古代彫刻に触れられたことはよい刺激になりました。

5日目には「Defying difficult diseases: design and synthesis of aspartic protease inhibitors and click peptides based on the O-acyl isopeptide method」という演題で木曾良明先生の特別講演(PL4)が行われました。日本でも聴く機会がなかった木曾先生の講演をこの学会で聴けたことは、これまでの研究について知ることができる貴重な時間となりました。その日の夜には学会会場からバスで約1時間の、市街地からはだいぶ離れたところにあるVorges MuseumでGala Dinnerが開かれました。美術館になっており、入ると独創的な芸術品が多く展示されていました。ピュウフェ形式のディナーでは、伝統的なギリシャの料理が並んでいました。ギリシャ特有(?)の固いパンが印

象的です。陽気な音楽が流れると著名な先生方をはじめ参加者の多くが輪になってダンスを楽しんでおり、私自身も楽しむことができました。

最終日、Gala Dinnerで一緒に写真を撮らせていただいたAlex N. Eberle先生の「Tumor targeting with peptides in four decades: from initial concepts to an array of highly sophisticated methods」(PL5)という講演では、腫瘍細胞を標的としたこれまでの研究内容を話されており、今後の研究生活への大きな刺激を受け、とても有意義な時間となりました。



Gala Dinnerにて

初めての海外での学会参加は思った以上に早く過ぎ、時差に慣れた頃に帰国というあっという間の一週間でした。今回32nd EPSに参加して、国内の学会とはまた違った雰囲気を感じることができ、とても貴重な経験になりました。また、英語でもっと諸外国の研究者らと交流できるようになりたいと感じ、今後の研究活動に対してだけではなく国際交流に関する意識にも大きな刺激になりました。

最後になりましたが、今回の32nd EPSへの参加において日本ペプチド学会 Travel Awardとしてご支援いただきました。この場をお借りして、学会役員ならびに選考委員の先生方に心より感謝申し上げます。

きくち まり
山形大学大学院理工学研究科
バイオ工学専攻生物有機化学分野
tks55022@st.yamagata-u.ac.jp

The 16th Korean Peptide and Protein Symposiumの参加報告

The 16th Korean Peptide and Protein Symposiumは、2012年11月30日に、韓国の北西部にある水原市（Suwon）の成均館大 学校（Sungkyunkwan University）にて開催されました（写真1）。本シンポジウムに参加するに当たって、日本ペプチド学会よりTravel Awardをいただきました。また、この度はこのニュースレターにて、参加報告の機会をいただきました。併せてお礼申し上げます。私は、松島綾美先生の招待講演に同行する形で、後輩の西尾華奈子さん、松尾文香さんと一緒に本シンポジウムに参加しました。学会前日の29日より韓国入りし、学会翌日の12月1日に福岡に帰るという二泊三日の旅でした。私自身は2009年の3rd APIPS 以来の韓国での学会参加となり、この3rd APIPSがリゾート地として知られる済州島で開催されたこともあり、温暖な気候のなかで参加したことを覚えています。今回の開催地である水原は、福岡や済州島よりもはるかに北、ソウル市の隣に位置しており、11月であっても夜は道が凍るほどの寒さでした。済州島のことを思い出しながら韓国に出発したこともあり、その寒さに衝撃を受けました。しかし、外が寒いのに室内はオンドルによって床が暖かく、快適でした。これに加えて、旅の疲れと夕飯の焼肉の食べ過ぎもあり、一日目はぐっすり眠れました（写真2）。

今回の研究発表で私は、「Pharmacological Chaperone for Fine Protein Expression of ORL1 Nociceptin Receptor in the Cell Membrane」の講演題目でポスター発表のみの予定でした。ところが、日本を出る二日前に5分間の口頭発表をとの学会側からの指示・依頼があり、スライドを急いで準備することになり、バタバタでの出発になりました。こういう経緯もあって、シンポジウム当日はととても緊張していました。ところで、会場の成均館大 学校までは、ソウル大学のByung Woo Han 先生に送っていただきました。車内では、Han 先生がととても気さくに韓国の研究費



西村 裕一

の話や、映画や音楽の話をしてくださり、気付けば私や後輩達の緊張はほぐれ、去ってしまいました。会場に着いてみると、日本人は私たちとペプチド研究所の西内先生の5名しかおらず、アウェーな雰囲気を感じました。しかし、それは私の勘違いだったようで、向こうの学生達が頑張れよと励ましてくれました。こちらのたどたどしい英語に対して流暢な英語での励ましであり、嬉しく思ったことでした。口頭発表の後は、日本に来たことのある学生から話しかけられたり、最近YouTubeで話題の「Gannam style」の話をして、韓国の皆さんと打ち解けた時間を持つことができました。

ポスターセッションでは、同世代の学生の話聞きに行きました。皆、英語がととても堪能でした。自分の英語力を意識して、思わず、「これは、」と感嘆するほどでした。逆に、自分のポスターの番になったとき、研究内容を相手に伝えることに一所懸命に努めました。口頭発表とは違い、ポスターセッションではポイントをその場面、その場面で押さえつつ、詳細に説明しなければなりません。皆にはあまりなじみの無い研究内容であるとの意識があったこともあり、一所懸命に説明しました。一人に説明するだけでずいぶん大変だ、との感じもありました。しかしながら、研究成果を理解してもらい、「とても面白いアイデアだ」と、先生方からはお褒めの言葉をいただき、大層嬉しく思いました。研究者として、自分の研究を情報として発信することは非常に重要だと私は考えています。今回、急なことではありましたが、海外の学会に参加できたことをととても喜ばしく思います。今年、2013年11月に大阪に於いて開催される第4回 APIPSで、今回知り合った韓国の先生や学生と再会できることをととても楽しみにしています。

ところで昨年のノーベル生理学賞・医学賞の受賞で、京都大学の山中先生とiPS細胞が注目されていますが、Gタンパク質共役受容体の研究をしている私はRobert Lefkowitz 先生とBrian Kobilka 先生のノーベル化学賞の受賞にととても興奮していました。そうしたなかで、Kobilka 先生の研究室で研究をされていたHee-Jung Choi 先生の発表を聞いたことは、ととても刺激的でした。残念ながら、直接お話をすることはできませんでしたが、旬な話題を提供していただき、日本ではなかなか聞けないGPCRの結晶構造解析についてのお話を聞くことができました。研究に対するモチベー



写真1 会場の成均館大 学校



写真2 学会前日の決起集会



写真3 受賞後ポスター前にて

ションが上がる良い機会になりました。

懇親会の最後には、授賞式がありました。私は2012 Young Scientist Awardを受賞することができました(写真3)。研究の内容に加えて発表が評価されということでしたが、これもひとえに日本のペプチド討論会での発表、質疑、ディスカッションで鍛えられた成果であると考えています。この受賞を機に、これからも日本ペプチド学会の一員として、ペプチド科学の発展に資するように尽力したいと強く感じています。

今回のThe 16th Korean Peptide and Protein Symposiumを通して、海外の最新の研究成果を知り、さらに同世代の韓国学生と知り合ったことで、自分の今後の課題を見つけることができました。非常に意義深い参加であったと思います。末筆ではありますが、本シンポジウムの参加に当たり、ご支援していただきました日本ペプチド学会の学会役員および、選考委員会の先生方に、この場を借りて、心よりお礼申し上げます。ありがとうございました。

にしむら ひろかず
九州大学大学院理学府化学専攻
構造機能生化学研究室
九州大学リスクサイエンス研究センター

2013年度日本ペプチド学会賞, 日本ペプチド学会奨励賞, および JPS Travel Awardの公募のお知らせ

日本ペプチド学会では、2013年度の日本ペプチド学会賞, 日本ペプチド学会奨励賞, および第22回アメリカンペプチドシンポジウム(2013年6月22日~27日, Hilton Waikoloa Village on the Big Island of Hawaii), 第10回オーストラリアンペプチドシンポジウムカンファレンス(2013年9月8日~13日, Penang, Malaysia)への若手研究者の参加支援(JPS Travel Award)の公募を行います。詳細は日本ペプチド学会ホームページ <http://www.peptide-soc.jp/top.html>をご覧ください。

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: 松島 綾美)