PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN
No.89 2013年７月
THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY
http://peptide-soc.jp

日本発，ペプチド医薬にかけた50年 ーその現状と展望

中島喜一郎

理学部生時代にペプチド化学に出会ってから50年，ペプチドをめぐる研究開発・ビジネスに携わり続けるという望外の幸運に恵まれ，2013年春にサラリーマン生活を卒業しました。引き続き各方面からご相談を承る生活が続いていますが，この節目にペプチド医薬をめぐる50年間の概観と今後の展望をまとめるべきとのお話を受け，きわめて個人的な視点から振り返ってみることにしました。

人生を決めたペプチドとの出会い

ペプチドとの出会いは，関西学院大学理学部大川乾次先生の研究室でSer（OBzl）の合成を学んだ時に遡ります。そのまま研究室に所属して博士課程まで進みました。それからアメリカ・ジョージア工科大学（GaTech）やマサチューセッツ工科大学（MIT），スイス連邦工科大学（ETH）において博士研究員として勤務し，多くの出会いと学びがありました。帰国後はペプチド受託ビジネスを専門領域としながら，株式会社ペプチド研究所を定年退職後，神戸天然物化学株式会社に転じ，多くの研究者・企業とともにペプチドを活かした創薬に取り組んできました。それは「日本発のペプチド医薬」「Made in Japanのペプチド医薬」を夢見る仲間とともに知恵を絞る日々であり，ペプチド受託合成環境や原薬製造環境が激変した50年間でもありました。

ペプチド受託ビジネスの夜明け

液相合成が基本であったペプチド化学の世界に革命をもたらしたのは，R.B.Merrifield 先生が考案した固相合成法です。ちょうど大学１年次（1963年）にテトラペプチド合成報告があったのに始まり，翌1964年のブラジキニン合成報告，そして自動合成の考案やHPLCの実用化，完全自動合成機の発売などが続きました。アカデミックなペプチド化学の世界が興奮に包まれた時期に学生生活を過ごしたわけです。

一方で，少し長鎖のペプチドや高難度の配列を持ったペプチドは，固相合成だと高純度の生成物を得られないという課題が早くから指摘されていました。とりわけ，生理活性ペプチド合成の場合における不純物混入が，ペプチドの品質を大きく左右する点は今と変わりありません。

1980年代後半に帰国し，国内でのペプチド受託ビジネスを引き受ける立場になりました。当然ながら，ビジネスとして成立させるには高純度ペプチド提供の保証が不可欠ですが，当時は固相合成による高純度ペプチド合成技術への不安感を払拭できる技術レベルに到達していませんでした。常に「固相合成で造った商品は，高純度ペプチドとして間違いない品質であると保証できるか」と問われ続ける日々です。それは業界関係者が共有する問題意識であり，各自の立場から技術革新に挑むことで合成法や保護基の開発，分取精製法の高度化，分析法の高度化が進展してきました。現在では，固相合成で得られたペプチドの信頼性は飛躍的に向上しています。

受託ビジネスを取り巻く環境の変化

受託合成の相談を受けていると，ペプチド合成が自然科学各領域のイノベーションと様々な形で関わっていることが実感できます。

たとえばゲノム解析が急激に進展した時期には，「DNA 解析から決まったシークエンスを使って抗原ペプチドのデザインをし，その抗体を造ってタンパクを捉えたい」というニーズが生じました。そのニーズにペプチド受託合成が応えられるということで，抗原用ペプチドの需要が一挙に増加したことがあります。

また当初，研究開発用にカタログリストにある生理活性ペプチドから選んで発注するのが主流でしたが，受託合成が定着し独自配列のペプチドを利用する研究へと進展したことで，より高度なオーダーが増えるといった変化も生じています。そのような潮流の変化に対し敏感，かつ，迅速に対応していくことで，ビジネスの基盤となる信頼関係が醸成されてきたことは間違いありません。

しかし，信頼関係でだけで全てが解決するわけではありません。初期スクリーニング段階を中心にコスト重視で外国へ発注されるケースが増えていることを実感しています。その上，発注先の国・地域は猛烈な勢いで多様化しており，ペプチド受託ビジネスは経済のグローバル化に伴う国際的な競争激化と無縁ではいられないのが実情です。

こうした状況下での我々の出番は，初期スクリーニング段階でのお手伝いに留まらず，確度の高いデータ取得のため，信頼度が高く安定供給可能な国内のパートナーを選択する場面にこそあるのです。創薬を見据えてのターゲットであればそれをシームレスにつなげ

ていくべきですが，現実には臨床用サンプルは外国製という選択が常態化しているように思われます。

ペプチド医薬品への期待

医薬品の世界市場は2012年度で約100兆円規模に達しています。医薬品のうち109品目がいわゆるブロックバスターで，売上ベースで約28兆円を占めます。この109品目のうち1/3を生物製剤が占め，生物製剤のうち12品目が抗体医薬であるという関係になります。抗体医薬は自己免疫疾患，ガン領域の薬としてバイオ医薬品のトップランナーとして走り，全医療用医薬品のトップ10に７品目が名乗りを上げています。

数年後には，ペプチド医薬の世界市場は約１兆8000億円規模になり，原薬市場は約3500億円，その受託製造へのアウトソーシングは約1000億円になるとの想定も出されています。そのうちどれだけが日本国内で獲得できるでしょうか。ただ待つばかりでなく我々は積極的にアプローチしていく必要があるでしょう。

低分子医薬品の開発が頭打ちになる中でのバイオ医薬品の隆盛は目を見張るものがあります。その中で，抗体医薬に代わる分子標的薬の可能性を秘めた中分子と称されて注目されているペプチドは創薬候補の薬効が多岐にわたることは低分子に見られない特徴であり，大いに期待されるところです。

とくにペプチド創薬の牽引役を引き受けた形のペプチドがんワクチンの最初の１件目が承認されると，それをきっかけにペプチド医薬もブレイクするかもしれません。しかし最近のニュースを見ると生みの苦しみを感じます。間近に迫っていた日本発ペプチドの開発中止，ペプチドがんワクチンの最終段階での不調，PEG 化ペプチドの回収などの報道が相次ぎ，いささか厳しい状況にあります。もちろん，そのほかにも有望な候補ペプチドの話題が出ていますので，それらが１つでも多く，医薬品としての実用化につながることを心から願っています。

未解決の課題

今なお生産コストの問題は解決できていません。しかし，この点はブレイクスルーの気配が見えてきました。たとえばペプチド合成法の分野では，味の素や積水メディカル（JITSUBO）によって画期的な合成方法が出現し，従来型の液相法・固相法から脱却するきっかけとなりました。こうしたイノベーションが，より低価格でより簡便な大量生産の実現に結び付けば，地盤沈下している日本のペプチド生産環境の回復に繋がると思われます。

また，アカデミックな世界における日本のペプチド研究のレベルが世界トップクラスであることには変わりなく，大学発バイオベンチャー各社が切り開く地平が存在することを確信しています。具体的にはペプチドがんワクチンをはじめ，興味深い特殊ペプチド創薬シーズが生まれているからです。また，PEGに代わる糖誘導体の利用や膜透過性腫瘍特異的ペプチドについても期待をもって見ているところです。さらに，再生医療へと用途が広がる機能性ペプチドも現れ始めました。

間違いなく，ペプチド業界の知恵の泉は豊富に湧出しているのです。それらに対し，ペプチドに関わる日本の企業・組織がしっかりアンテナを張り，丁寧な評価や助言を行い，素早く投資や支援等の意思決定をしていく必要があります。もしも彼らが日本国内で支援を得られなければ，国外との協力に目を向けていくことになるのは必然です。

国際競争力向上へ―「日本ペプチド共同体」の提案

現在，医薬原体につながる臨床用サンプル製造を国内で手掛けているという話はなかなか聞こえてきません。安価な原料の安定入手，大量生産に叶う製造環境，人に供するためのGMP 基準による生産環境，そして世界を相手の価格競争に十分に耐えられるのかといった様々な課題が解決できて，ようやく生産受注に至れるのです。

また経済産業省の担当部局によれば，医薬品の貿易赤字は約２兆円に達し日本の国家戦略にとって由々しき問題となっている。こういった危機感を強く抱いている彼らからは，当然「医薬・薬学先進国としてのポジションを維持・向上させたい」，「日本発のシーズを真のMade in Japanにしたい」，「ペプチド製造環境の構築を急いでほしい」といった方向性が打ち出されています。

しかし残念ながら，ペプチド製造はスイス，スウェーデン，アメリカ，ベルギー，インド等の外国企業に席巻されています。GMP 環境を整えた新たな原体製造環境の構築となると，その投資額から考えても１つの企業や組織だけで踏み込めるものではありません。

個人的な意見ですが，１つの企業で全てを完結させようとすること，１つの組織で国内外の競合各社に対抗しようとすることに，限界がきているのではないでしょうか。製造業や情報通信業などでは企業連合体を組んでのB to Bビジネスが当たり前となっているはずです。ですから，国内での合成規模の拡大やその水準の向上を目標としつつ，国内各社・組織の総力を結集すべきでしょう。これは「日本ペプチド共同体」とでもいうべきオールジャパン型ネットワークを形成し，各々の得意分野・技術を補い合って国際競争に太刀打ちする体制の構築を意味します。さらに，そうした戦略的パートナーシップをコーディネートできる知見・能力を持った目利き人材の育成も不可避だと考えています。

現状は決して楽観できるものではありませんが，日本のペプチド合成やペプチド医薬品候補の研究開発の未来に心から期待しています。また末筆ながら，個人的な経験や意見を申し述べる機会を与えていただいた今野先生に感謝申し上げます。

なかじま　きいちろう
中島総合研究所［NRI］代表
nakajima-nri@i.softbank.jp

モデル蛋白質を用いたβシート構造の再設計と構造形成原理の研究

真壁　幸樹

はじめに

βシート構造は蛋白質を構成する二次構造の一つであり，蛋白質構造がどのように形成するかを理解する上でβシート形成機構の理解は欠かせない。また，蛋白質やペプチドは自己組織化してアミロイドと呼ばれるβシートに富んだ分岐のない線維状構造に構造転移する。このアミロイドはアルツハイマー病などの神経変性疾患との関連が指摘されており，病気の理解という点においてもβシート構造の理解は重要である。しかしながら，通常の球状蛋白質中のβシート構造では側鎖がパッキングのための相互作用に関与するために，純粋なβシートの物性を評価するのが難しい。そこで我々は単層のβシートモチーフを持つモデル蛋白質を用いて研究を行っている。本原稿ではこのモデル蛋白質を用いたβシート構造の研究について概説する。

1．モデル蛋白質 OspA

OspAはライム病の病原菌であるボレリア菌が感染の媒介者となるマダニの腸に感染するときに関与する蛋白質である。このためOspAの研究はライム病のワクチン開発などの標的として進められているものがほとんどであるが，シカゴ大学の小出らはこのOspAをライム病関連の標的蛋白質としてよりもむしろ，その独特な立体構造に着目して，βシートの改変を行うモデル蛋白質として用いる研究を行ってきた[1-4]。OspAは図1Aに示すようにN 末端とC 末端側にドメイン構造を持ち，この2つのドメインが単層βシート領域（Single Layer Beta-sheet; SLB）によって繋がった構造を持っている。最近，我々はOspAのフォールディングについて分子科学研究所の桑島邦博名誉教授と共同で研究を行った。分光学的な速度論解析から，OspAは巻き戻り過程においてN 末端ドメインのみが構造形成した中間体を形成する三状態の巻き戻り反応であることが分かり，これは以前の重水素交換法による結果と一致している[3]。

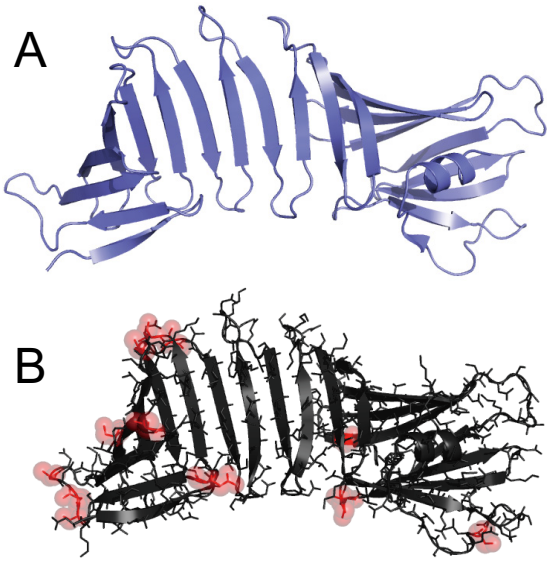


図1　（A）OspAの立体構造。図の左のN 末端ドメインと右のC 末端ドメインの間に単層βシート領域がある。（B）結晶化変異体の立体構造[6]。赤で示した残基がコンフォメーションエントロピーの低い残基に置き換えられた残基。

OspAのSLBはβシートの両面が溶媒に露出しており，他の残基とパッキングなどの相互作用を持たないため，純粋なβシートの性質を評価できる。モデルシステムとしてOspAを用いるためには様々なSLB 変異体の立体構造を高分解能で容易に決定する必要があり，結晶化はX 線結晶構造解析を行う上で必須のステップである。OspAはβシートの特性を調べる上でとても魅力的なモデル蛋白質であるが，単独では結晶化しないというのが大きな問題であった。そこで我々は野生型 OspAを改変することで容易に結晶化出来る変異体の構築を行った。方法はバージニア大学のDerewendaらが提案している表面エントロピー減少法を用いた[5]。コンフォメーション自由度の高いリジンやグルタミン酸のような残基は，結晶化する際にそのコンフォメーションが固定化されることによるエントロピー障壁があり，そのため結晶化が妨げられる。表面エントロピー減少法はこのような残基をコンフォメーション自由度の低いアラニンのような残基に置換させて結晶化を容易にする方法である。

我々はOspAの表面に存在するコンフォメーション自由度の高い13残基をアラニンとセリンへ変異させた（図1B）。結果として作製された変異体は多くの結晶化条件で直ちに結晶化した。結晶は1.1 Åの分解能で回折し詳細な分子構造を決定することが出来た[6]。変異導入部位はN 末端とC 末端ドメインのみであり，SLB 領域に自由に変異を導入できる。これによってモデルシステムの基盤が完成し，変異体の構築 - 構造の評価というサイクルで研究が行えるようになった。

2．βシート構造の形成機構

SLBは側鎖間のパッキングがないためにβシートの純粋な性質を評価できる。βシートはストランドの主鎖間の水素結合で形成する二次構造である。以前にKellyらはペプチドの主鎖のアミド基をエステルに変換させた分子を化学合成し，βシート構造における主鎖水素結合が安定性に大きく寄与していることを見いだした[7]。このように主鎖水素結合が安定性へ寄与していることは示されているが，βストランドのペアリングにどのような影響をもつのかについて知られていない。そこで我々はSLBに変異導入を行ってストランドのペアリングについて調査した。

方法はSLB 領域のβシート構造が歪んでしまう変異を導入し，構造がどのように変化するかを観察した（図2A）。歪みはストランド9と10の間のターンに主鎖水素結合のペアリングが合わなくなるようなターン変異を導入し，どのように構造を再構成するか観察した。この変異体の結晶構造を決定したところ，ストランド9，10だけではなくストランド8も含めて大きくストランド間の相対配置が変化していた[8]。

この新しいストランド間配置はどのようにして形成

したのかを調べるために，ストランド間の相対配置を１残基ずつシフトさせたモデルを考えた。そしてストランド間の残基のペアリング，ターンの形成傾向，主鎖水素結合の数を調べた。天然蛋白質のβストランド間のペアリングやターンの形成には傾向が観察されていたが，その傾向ではこのSLB変異体のβストランド間のペアリングを説明できなかった。しかし，主鎖水素結合の数が最大となっていることが分かった。つまり，ストランド間のペアリングにおいて主鎖水素結合の数が最大となるような組み合わせが選ばれることが示唆された[8]。

さらに，主鎖水素結合の数を最大にすればβシートが設計出来るのであれば，蛋白質のデザインに利用できる。このことを検証するために，野生型OspAのSLBからβストランドとターンを一つずつ欠失させた変異体を構築した。この欠失によってストランド間の側鎖の組み合わせは非天然の組み合わせになるが，主鎖の水素結合が最大となるように設計してあれば，設計通りに構造を形成するはずである[9]。また，ストランドを一つ欠失させると，N末端側とC末端側の相対的な配置が反転して180度回転することが予想される。実際に我々はこのストランド欠失変異体の結晶構造を決定し，設計通りに一つのストランド欠失によって180度βシートの面が回転し，さらにもう一つのストランドを欠失させるとさらに180度回転するために野生型と同じ相対配置に戻ることを示した（図２B）[9]。

アミロイドは非天然のストランドペアリングによって分子間βシートが伸長して形成するため，βシートのストランド間の相対配置の決定に主鎖水素結合が重要であるという結果は側鎖同士のペアリングによらずにβシート凝集体が形成する原因を示しているかもしれない。

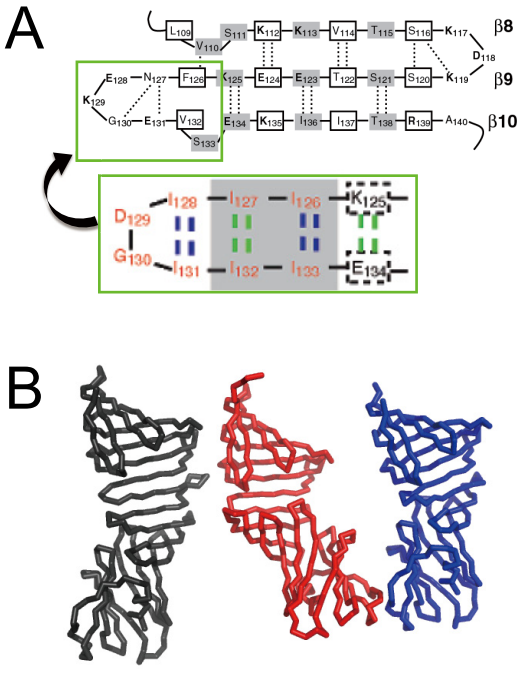


図２　（A）ストランド９，10の間に歪みを導入する変異[8]。変異によって青点線で示した水素結合が形成するが，OspA側では緑点線で示した水素結合を持つため，構造が歪むことが考えられる。（B）主鎖水素結合の数を最大にするように設計された，ストランド欠損変異体[9]。黒；野生型，赤；１ストランド欠損，青；２ストランド欠損

３．アミロイド形成配列の球状蛋白質への取り込み

SLB領域はβシート構造を維持しており，そこをアミロイドなどのβシート凝集体を形成するペプチド配列に置換すれば，それらペプチドのβシート中での構造を決定することが出来る。さらに，アミロイドを形成する配列には疎水的な残基が多く，水溶液として扱う上で難しさがあるが，そのような疎水的なペプチド配列もSLBの中に取り込めば，OspAの他の部位が親水性が高いために，全体としては可溶性の分子として取り扱うことが出来る。

この発想に基づいて，我々は疎水的な残基であるイソロイシンが５つならんだペプチドのSLB中への取り込みを検討した[10]。まず，このイソロイシンペプチドがβシートに富んだアミロイド様の構造を作ることを原子間力顕微鏡による観察と円偏光二色性測定で確認した。引き続き，イソロイシンの５つ並んだ配列をSLB中に遺伝子工学を用いて導入した。イソロイシンは疎水性が高くペプチドのままではほとんど水に溶けないが，OspA中に取り込むことで容易に可溶化することが出来た。結晶構造からイソロイシンペプチド部分は通常のβシート配座をとることが分かった（図３A）。この配座を繰り返して並べて作り出した，ペプチド自己集合体のモデルは原子同士の衝突もなく，この配座が会合体として問題のないことを示している。現在，より天然のアミロイドにみられる配列の一部へ置換させた変異体についても研究を行っている。

４．βシート伸長変異体とクロスβ模倣変異体

アミロイドは蛋白質やペプチドが自己組織化して会

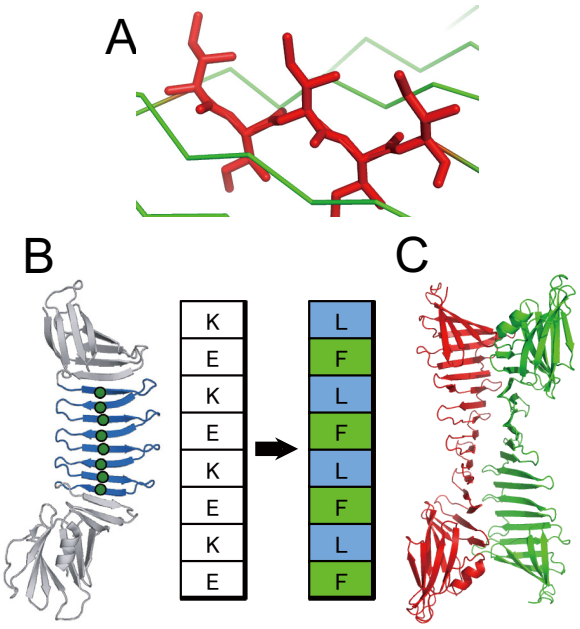


図３　（A）SLB中に導入したイソロイシンペプチド（赤）[10]。（B）βシート上に縦に並ぶラダー残基（緑丸）に疎水ラダーを導入[12]。野生型ではK（リジン）E（グルタミン酸）ラダーの所をL（ロイシン）F（フェニルアラニン）ラダーに変異。（C）疎水ラダー変異によって二量体化変異体の結晶構造。

合したβシートに富んだ線維である。X線繊維回折実験や近年の結晶構造解析からβシートが線維方向へ重合した構造を持つことがわかっている[11]。この構造をOspA蛋白質中へモデル化するために，小出らはSLB領域のストランド9，10からなるβヘアピンを繰り返してSLBに導入し，SLBのβシート領域を伸長させた変異体を構築した。X線溶液散乱法とNMR法によって，このβシート伸長変異体が設計通りの構造を持つことを明らかにした[2]。

さらに我々はこれらβシート伸長変異体の結晶構造を決定した。結晶構造から伸長したβシート領域は設計通りにβシート構造を形成していたが，βシート領域の平面さは変異体間で大きく異なっていた[6]。βストランド間の相対配置を繰り返して重ね合わせて巨視的なリボンモデルを作製したところ，わずかなストランド間の相対配置が異なるだけで巨視的なβリボンの形状は大きく異なることが分かった。実際のアミロイド線維にも形状の多様性が観察されており，このような構造の多様性はβストランド間のわずかなねじれに由来する可能性が示唆される結果となった。

しかしながら，この伸長したβシートモデルは単層のβシートからなる。実際のアミロイドではβシートは少なくとも2つ以上が積層した構造を持つことが示されている（クロスβスパイン構造）[11]。そこで我々はこのβシート伸長変異体に改変を加えて，クロスβスパイン構造の構築を目指した[12]。まず，伸長した単層βシートをより平らにするために，嵩高いチロシン残基をβシートの向きに並べて変異を導入した（βストランドラダー変異）。結晶構造からこの変異体が平らな構造を持つことを確認した。さらにβシート間の会合を誘導するために，アミロイドでよく見られる疎水残基のβストランドラダーをチロシンラダーの隣に導入した（図3B）。疎水残基はロイシンとフェニルアラニンを交互に導入した。ゲル濾過の結果からこの変異体は二量体となることが分かり，結晶構造からラダー変異させた疎水残基同士を向かい合わせるようにして二量体が形成していることが分かった（図3C）。このようにアミロイドの基本構造は驚くほどに単純な変異導入によって形成させることが可能であり，このことは様々な配列をもつ蛋白質やペプチドが一様なアミロイド構造へ変換してしまう，原因であると考えられる。

おわりに

SLBというとてもユニークな構造モチーフをもつOspAをモデルシステムとして着目することで，βシートに関する多様な研究が可能となる。本稿では，βストランドの相対配座決定因子，不溶性アミロイド形成ペプチドの取り込み，ペプチド自己組織化とβシートの重なりの模倣を行った研究について紹介した。これらの研究はβシートに関連した基礎物性の研究という側面が中心だったが，このOspAの実験系はβシート構造に基づいた蛋白質分子の設計が可能となるため，バイオ材料などへの応用も可能である。今後はそのような応用研究も進めていく計画である。

最後に本稿への助言を頂いたシカゴ大学・小出昌平先生に感謝いたします。また，寄稿の機会を与えて頂いた山形大学大学院理工学研究科・今野博行先生に感謝いたします。

1 Pham, T. N., Koide, A. & Koide, S. A stable single-layer beta-sheet without a hydrophobic core. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 115–119, (1998).
2 Koide, S. *et al*. Design of single-layer beta-sheets without a hydrophobic core. *Nature* **403**, 456–460, (2000).
3 Yan, S., Kennedy, S. D. & Koide, S. Thermodynamic and kinetic exploration of the energy landscape of Borrelia burgdorferi OspA by native-state hydrogen exchange. *J Mol Biol* **323**, 363–375, (2002).
4 Yan, S. *et al*. Hydrophobic surface burial is the major stability determinant of a flat, single-layer beta-sheet. *J Mol Biol* **368**, 230–243, (2007).
5 Derewenda, Z. S. Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure* **12**, 529–535, (2004).
6 Makabe, K., Tereshko, V., Gawlak, G., Yan, S. & Koide, S. Atomic-resolution crystal structure of Borrelia burgdorferi outer surface protein A via surface engineering. *Protein Sci* **15**, 1907–1914, (2006).
7 Deechongkit, S. *et al*. Context-dependent contributions of backbone hydrogen bonding to beta-sheet folding energetics. *Nature* **430**, 101–105 (2004).
8 Makabe, K., Yan, S., Tereshko, V., Gawlak, G. & Koide, S. Beta-strand flipping and slipping triggered by turn replacement reveal the opportunistic nature of beta-strand pairing. *J Am Chem Soc* **129**, 14661–14669, (2007).
9 Makabe, K. & Koide, S. The promiscuity of beta-strand pairing allows for rational design of beta-sheet face inversion. *J Am Chem Soc* **130**, 14370–14371, (2008).
10 Makabe, K. *et al*. High-resolution structure of a self-assembly-competent form of a hydrophobic peptide captured in a soluble beta-sheet scaffold. *J Mol Biol* **378**, 459–467, (2008).
11 Nelson, R. *et al*. Structure of the cross-[beta] spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773–778, (2005).
12 Biancalana, M., Makabe, K. & Koide, S. Minimalist design of water-soluble cross- architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 3469–3474, (2010).

まかべ　こうき
山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻
makabe@yz.yamagata-u.ac.jp

ペプチドミメティクスを用いたペプチド創薬研究

小林　数也

1．はじめに

生体内で多様な生理機能を発揮するタンパク質，ペプチド，核酸，糖類などは，これらを適正に利用することで副作用の少ない医薬品への展開が期待されることから，次世代の創薬資源として大きな関心が寄せられている。特に，タンパク質等の高分子に比べて比較的合成が容易であるペプチドをベースとした創薬研究は精力的に行われており，現在までに50種類を超えるペプチド性医薬品が市販されている。しかし，連続するアミド結合により構成されるペプチドは，生体内で容易に加水分解を受けることから，ペプチドそのものを医薬品へと応用するのは困難であることが多い。この問題を解決する手法の一つとして，ペプチドを非ペプチドへと変換するペプチドミメティクスが挙げられる。先の加水分解の問題を解決するために考案されたのが，アルケンジペプチドイソスター（ADI）である（図１）。ADIは，ペプチド結合の平面性に基づき，アミド結合を炭素－炭素二重結合で置換した構造的相同性の高いジペプチド等価体である。酵素分解に対する抵抗性の向上を目的として設計された本イソスターは，ペプチド結合に特徴的な*cis/trans*異性化を起こさないため，分光学的手法では困難な生理活性ペプチドの構造・機能解析を可能にするツールとしても有用である。一方，酵素によるペプチドの加水分解機構に基づいて設計されたペプチドミメティクスは，基質遷移状態アナログと呼ばれており，ヒドロキシメチルカルボニル型やヒドロキシエチレン型などが考案されている（図２）。これらは，酵素の活性中心と直接相互作用することから強力な酵素阻害剤としての利用が可能であり，実際，癌やエイズなどの難治性疾患に関与するプロテアーゼを標的とした創薬研究において重要な役割を果たしている。

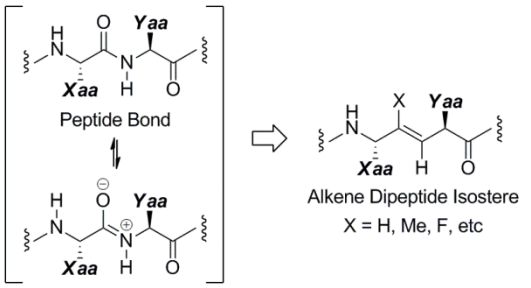


図１　アルケンジペプチドイソスターの構造

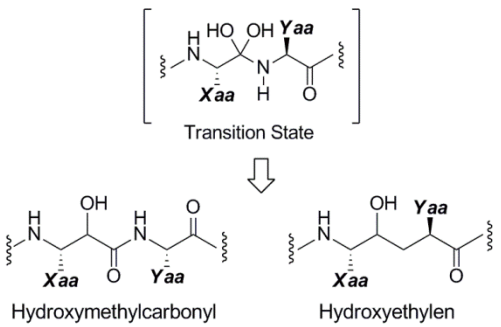


図２　基質遷移状態アナログの例

本稿では，著者がこれまでに携わってきたペプチドミメティクスを用いた研究の内，ADIを用いた構造活性相関研究と基質遷移状態アナログを用いたプロテアーゼ阻害剤開発研究の２つのテーマについて概説する。

2．ADIを用いたCXCR4アンタゴニストFC131の構造活性相関研究

ケモカイン受容体CXCR4はGタンパク質共役型受容体の一種であり，癌の増殖や転移，HIV感染などの病態への関与が知られていることから，これら難治性疾患の創薬標的として注目を集めている。藤井らは，カブトガニから発見された抗菌性ペプチドpolyphemusin IIの構造最適化研究により，強力なCXCR4アンタゴニスト活性を示す環状ペンタペプチドFC131［*cyclo*(-D-Tyr[1]-Arg[2]-Arg[3]-Nal[4]-Gly[5]-)］（図３a）を見出している[1]。FC131の更なる構造活性相関研究の結果，構成アミノ酸をD-アミノ酸及び*N*-メチルアミノ酸に置換することでそのアンタゴニスト活性が著しく変化し（図３b, c），特にArg[2]をD-Argに置換した場合にはD-Tyr[1]-Arg[2]間のペプチド結合の配向が反転することが示されているが，この活性と配向の変化の関係性についての詳細はいまだ明らかとなっていない[2]。この原因の一つとして，FC131のような数残基からなる環状ペプチド中では通常のペプチド結合に比べて*cis/trans*異性化が起こりやすく，正確な活性コンフォメーションの同定が困難であることが挙げられる。著者は，この問題を解決するためのツールとしてADIに着目した。先に述べたように，ADIはペプチド結合に対して高い構造的相同性を有しながら*cis/trans*異性化を起こさないため，FC131の構造・機能解析に最適なツールであると考えられる。そこで著者は，D-Tyr[1]-Arg[2]ジペプチド部位に各種ADIを導入したFC131誘導体の合成研究，及び各誘導体の構造活性相関研究に着手した。

3．FC131誘導体の活性評価

静電的相互作用の影響を排除し，構造的特徴のみから解析を行うため，双極子モーメントの小さい二置換アルケンジペプチドイソスターとカルボニル酸素部位にメチル基を導入した三置換アルケンジペプチドイソスター，並びに*N*-メチルペプチド結合を模倣した四置換アルケンジペプチドイソスターの３種類のADIを構造解析ツールとして選択した。著者は既存の合成法に基づき，D-チロシンを出発原料として４種類のFC131誘導体を合成し，各誘導体のCXCR４結合阻害活性を評価した。二置換アルケン又は三置換アルケンを導入した**1**と**2**では，IC_{50}はFC131に比べて若干低下したもののある程度の活性を維持した（図３d, e）。このことから，D-Tyr[1]-Arg[2]間のペプチド結合に由来する静電的な相互作用は活性への寄与が小さいと考えられる。一方，四置換アルケンを導入した**3**と**4**では，D-Tyr-Arg型の**3**でIC_{50}が1/30まで低下したのに対し

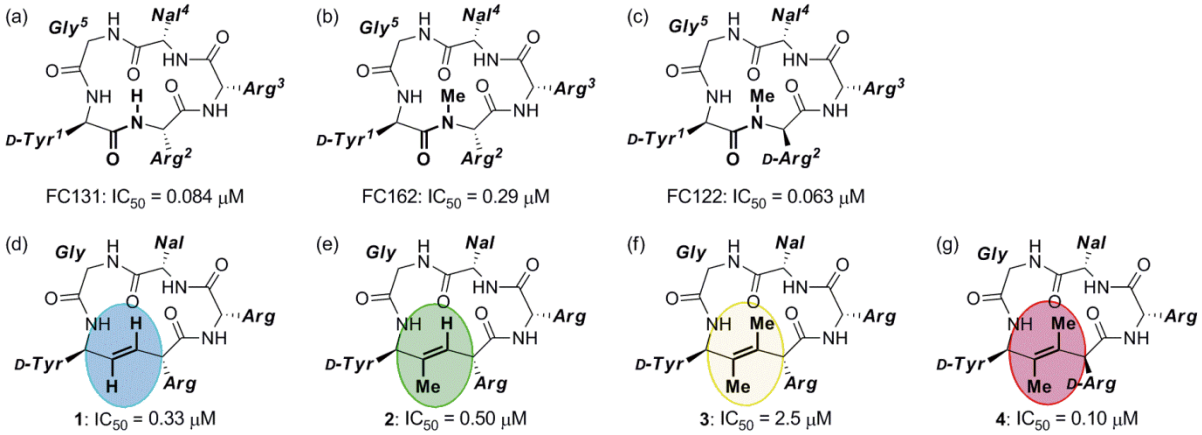


図３　FC131誘導体の構造とCXCR4結合阻害活性値

て，D-Tyr-D-Arg 型の **4** はFC131と同程度の活性を示し，対照的な結果が得られた（図３f, g）。この結果は，D-Tyr-L/D-Arg 間に*N*-メチルアミド結合を有するそれぞれの親化合物（**3**：FC162，**4**：FC122）におけるIC_{50}の変化（FC162: 0.29μM，FC122: 0.063μM）とよく一致しており，このことから四置換アルケン型イソスターが*N*-メチルペプチド結合を十分に模倣できていることが示唆された。また，*trans* 型のアルケンイソスターを導入した各誘導体が活性を示したことから，FC131のD-Tyr^1-Arg^{2}ペプチド結合の活性コンフォメーションは*trans* 型であることが示された。

４．CXCR4との結合様式の推定

次に，近年報告されたCXCR4とペプチド性拮抗剤CVX15の共結晶構造[3] を基にFC131のNMR 構造を用いたドッキングシミュレーションを行い，得られた結合構造（図４a）[4] に基づいて，合成した４種類のFC131誘導体のCXCR4との結合構造を算出した。図４b, cより **1** 及び **2** では，FC131と比べて化合物の結合構造に大きな変化は無いものの，D-Tyr^1-Arg^{2}ペプチド結合のアルケンへの置換により結晶水（w1）を介した水素結合は失われていた。この結果は，両化合物がFC131と比べて活性がわずかに低下していた事実と合致する。続く四置換アルケン型の **3** では，γ-メチル基により結晶水の入り込むスペースが失われていた（図４d）。結晶水の欠如によりD-Tyr^{1}の芳香環とのOH-π 相互作用が失われたため，**3** は **1** 及び **2** よりもさらに活性が低下したと考えられる。一方 **4** では，NMR 解析から溶液中において２つのコンフォーマーが約 1 : 1 の比率で存在することが示されたことから，それぞれの構造について結合様式の解析を行ったところ，一方の構造からより合理的な結合構造を得ることができた（図４e）。本結合構造において **4** は，FC131とは異なる結合様式を示しており，化合物全体が細胞外側（画面上側）に移動している。また，結晶水を許容できる空間が存在し，OH-π 相互作用が保存されているのも特徴となる。最後にこの結合構造を基に親化合物であるFC122の結合様式を解析したところ，**4** と同様の結合構造を得ることができた（図４f）。

このように著者は，構造・機能解析のツールとしてADIを利用することで，高活性誘導体であるFC122及び **4** が，FC131とは異なる結合様式でCXCR4と相互作用している可能性を示すことに成功した[5]。本知見は，更なる高活性誘導体を設計・合成する際の有用な足掛かりになることが期待される。

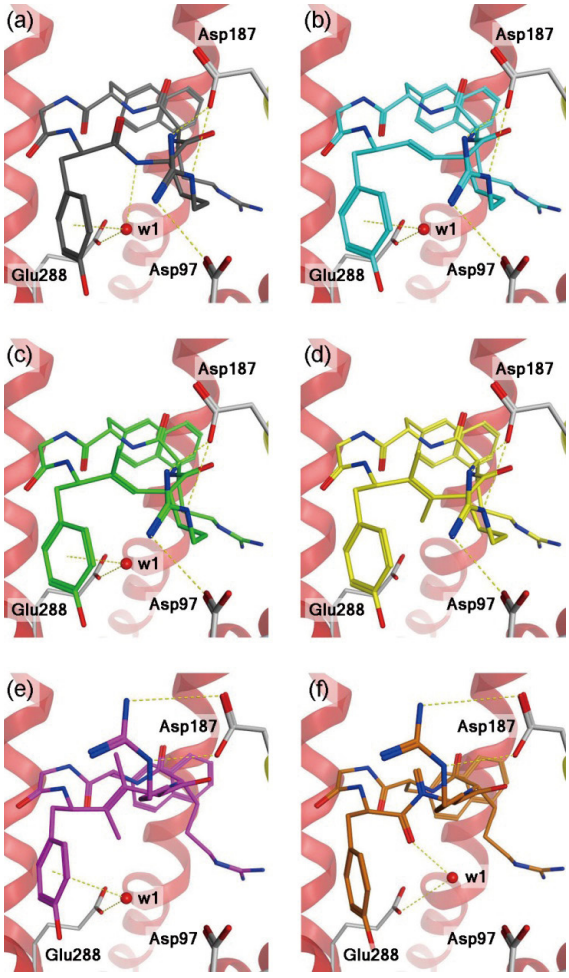


図４　FC131誘導体とCXCR4との推定結合様式：(a) FC131，(b) **1**，(c) **2**，(d) **3**，(e) **4**，(f) FC122

５．ヒドロキシエチルアミン型ペプチド性 BACE1阻害剤の開発研究

BACE1（β-site APP cleaving enzyme）は，アミロイドβ前駆体タンパク質（APP: amyloid precursor

protein）を切断する酵素であり，γセクレターゼとともにAPPを切断することで，アルツハイマー病の発症原因と考えられているAβを産生することが知られている。そのためBACE1は，アルツハイマー病治療薬開発における重要な創薬標的の一つとして精力的に研究がなされている。アスパラギン酸プロテアーゼであるBACE1の阻害剤設計では，その基質切断部位に遷移状態を模倣したイソスターを導入する手法が多く用いられており，これまでに多くの阻害剤が開発されている。このような背景のもと著者は，基質切断部位にヒドロキシエチルアミン（HEA）を導入した新規ペプチド性BACE1阻害剤の開発を計画した（図５a）。HEAは代表的な遷移状態アナログの一つであり，プロテアーゼ阻害剤の設計において広く用いられているモチーフである。近年，所属研究室では基質切断部位周辺の配列（P４ ～ P１’）を非天然アミノ酸に置換したドデカペプチドが，天然型や変異型のAPP配列を持つペプチドよりもBACE１による認識・切断を受けやすくなることを報告している（図５b）[6]。著者は，この基質認識を受けやすい配列とHEAモチーフを組み合わせることでより高活性なBACE1阻害剤の開発が可能になると考え，化合物 **5**，**6** をデザインした（図５c）。HEAユニットを有するプロテアーゼ阻害剤では，活性中心であるヒドロキシ基及びその周辺の立体配座が阻害活性に大きな影響を及ぼすことが知られているが，事前に適切な立体配座を予想することは困難であることから，著者らは水酸基の立体配置が異なる **5 a, b** 及び **6 a, b** をそれぞれ立体選択的に合成し，阻害活性の評価を行った。

６．(*S*)-HEA 型阻害剤５a，６aの合成

5 aの合成概略を以下に示す（図６）。Z-ロイシンを出発原料として２工程で得られたアミノアルデヒド **8** に対して，立体選択的ビニル化反応を行うことで，目的の立体を有するアリルアルコール **9 a**を得た。続いて，種々の官能基変換を経てメチルケトン**11a**へと誘導し，還元的アミノ化反応によりジペプチドユニット**12a**を合成した。本反応では，メチル基の立体化学

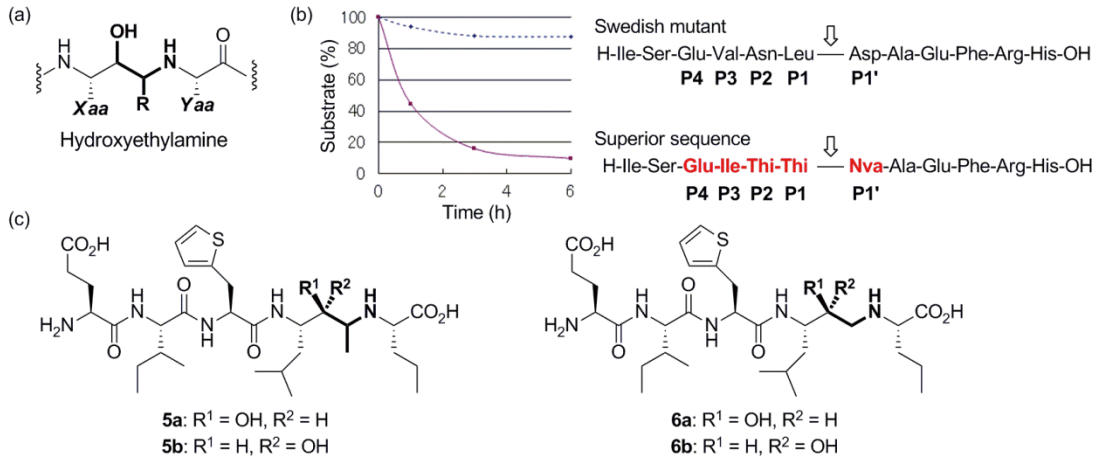


図５　（a）ヒドロキシエチルアミンイソスターの構造，（b）BACE1高認識基質配列の基質切断率，（c）高認識基質配列を組み込んだHEA 型阻害剤の構造

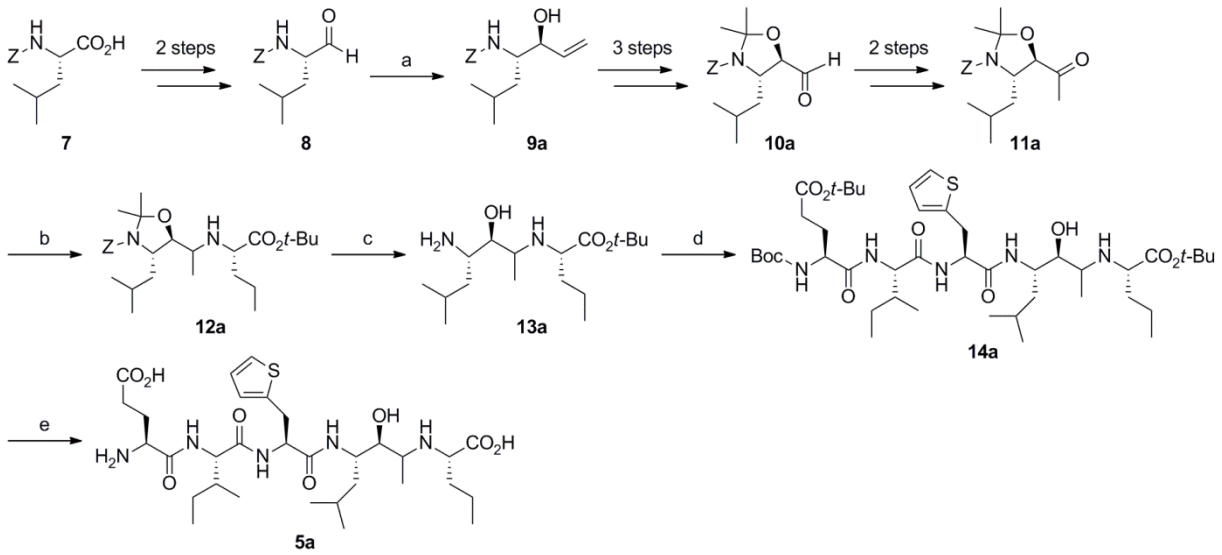


図６　置換型HEA阻害剤 **5 a**の合成：（a）$CH_3{}^+PPh_3Br^-$, $ICH_2Si(CH_3)_3$, *n*-BuLi, THF, then TBAF;（b）H-Nva-O*t*-Bu, Ti(O*i*-Pr)$_4$, then $NaBH_3CN$;（c）Pd-C, H_2, MeOH/AcOH (10:1);（d）Fmoc-Thi-OH, EDCI, HOBt, NMM, DMF; Et_2NH, MeCN; Fmoc-Ile-OH, EDCI, HOBt, NMM, DMF; Et_2NH, MeCN; Boc-Glu(O*t*-Bu)-OH, EDCI, HOBt, NMM, DMF;（e）TFA/H_2O/TIS (92.5:5.0:2.5).

が異なるジアステレオマーが3:1の比率で生成していることが確認されたが，ジアステレオマー分離が困難であったため混合物のまま以後の反応を行った。**12a**の脱保護後，HEAユニット**13a**に対してEDCI-HOBt法による縮合とジエチルアミンによるFmoc基の除去を繰り返し行うことで，Fmoc-Thi-OH，Fmoc-Ile-OH，Boc-Glu(O*t*-Bu)-OHを順次縮合し，保護ペプチド**14a**を得た。最後にTFA/H_2O/TISによって全ての保護基を脱保護し，目的化合物**5 a**を合成した。得られた**5 a**について，先の還元的アミノ化反応によって生じたメチル基の立体化学が異なる2つのジアステレオマーをHPLCにより分離精製し，それぞれ単一の立体配置をもつ化合物を得た。また同一の立体配置を有する**6 a**は，**10a**に対して還元的アミノ化を行いジペプチドユニットとした後，同様の方法で合成した。

7．(*R*)-HEA 型阻害剤 5 b，6 bの合成

一方**5 b**の合成では，4-メチル吉草酸**15**にEvans不斉補助基を導入した**16**に対して，Evans-aldol反応を行うことによって水酸基を立体選択的に構築した（図7）。続いて，不斉補助基の除去を行い，Curtius転移反応によりカルボン酸をアミノ基へと変換後，Z基を導入することでアリルアルコール**9 b**を得た。以降の反応では，**5 a**の合成と同様の方法を用いることで，目的とする**5 b**を合成した。本合成ルートでも，還元的アミノ化反応時に3：1のジアステレオ混合物としてジペプチドユニットが得られたが，これらジアステレオマーは**5 b**においても分離ができなかったため混合物のまま阻害活性試験を行った。また，先と同様に**6 b**も本合成ルートと同様の手順で合成した。

8．HEA 型阻害剤の活性評価

最後に，合成したHEA型阻害剤のBACE1阻害活性を評価した（表1）。置換型HEA化合物**5 a, b**では，いずれの立体においても阻害活性はほぼ認められなかったのに対して，無置換型HEA化合物では，水酸基の立体配置が*R*である**6 b**がIC_{50}＝72 μMの阻害活性を示した。以上の結果より，HEA骨格におけるメチル基の導入は阻害活性を低下させること，またHEAの水酸基の立体化学は活性に影響を与え，*R*の立体化学を有するものが強い阻害活性を示すことが明らかとなった。現在は，プライムサイトの構造を変換したHEA型阻害剤において，水酸基及びメチル基の立体がBACE1阻害活性に及ぼす影響について研究を進めている。

9．おわりに

著者はペプチドミメティクスに興味を持ち，それらを利用したペプチド医薬品の開発研究に携わってきた。これまでに興味深い特徴を有する多くのペプチド

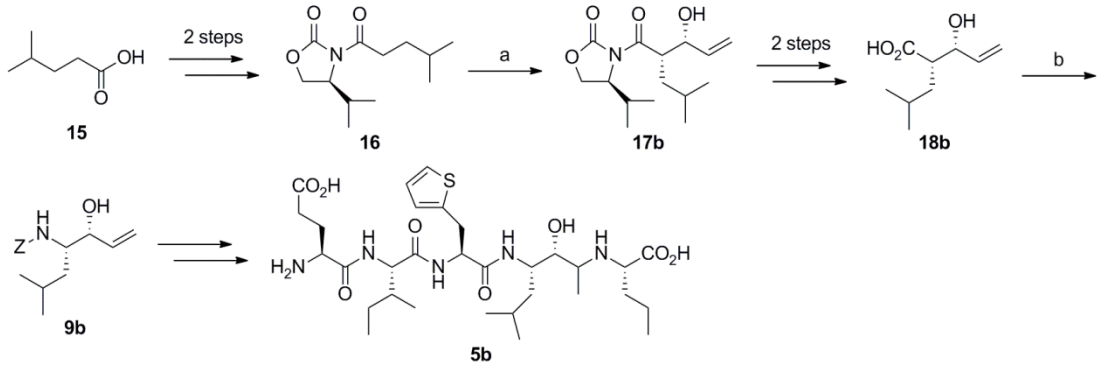
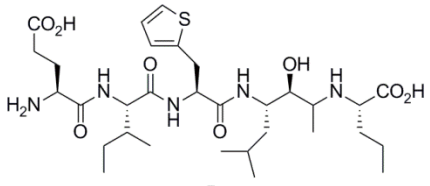
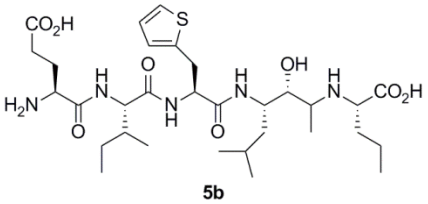
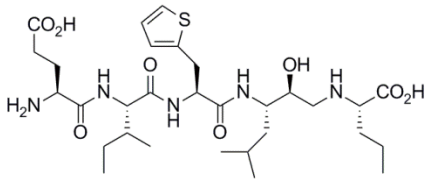
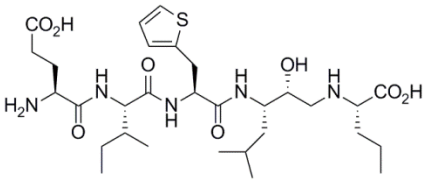


図7　置換型HEA阻害剤**5 b**の合成：(a) acrolein, *n*-Bu_2BOTf, DIPEA, CH_2Cl_2, -78℃；(b) DPPA, Et_3N, EtOH/H_2O (1:1), reflux, then Z-Cl, DIPEA, DMF.

表1　HEA化合物のBACE1阻害活性

compound	inhibition	compound	inhibition
 **5a**	24-35% inhibition (at 1 mM)	 **5b**	no inhibition
 **6a**	25% inhibition (at 1 mM)	 **6b**	IC_{50} = 72 μM

ミメティクスが考案されており，創薬研究への展開がなされているが，いまだ十分な成果が挙げられていないのが現状である。しかしながら，ペプチドをベースとした医薬品開発は，冒頭でも述べたように次世代創薬の中心となりうる重要分野の一つである。今後もペプチドミメティクスを用いた研究を通して，ペプチド創薬の発展に貢献できるよう努めていきたい。

本稿で紹介した研究は，京都大学大学院薬学研究科　藤井信孝教授，大石真也講師，京都薬科大学　赤路健一教授，（株）ファルマデザイン　古谷利夫博士，吉川寧さんを始めとする多くの方々のご指導とご協力を得て実施したものです。お世話になった皆様に，この場を借りて厚く感謝いたします。また，このような寄稿の機会を与えていただきました山形大学大学院理工学研究科の今野博行准教授に，心よりお礼申し上げます。

参考文献

1）Fujii, N.; Oishi, S.; Hiramatsu, K.; Araki, T.; Ueda, S.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Kusano, S.; Terakubo, S.; Nakashima, H.; Broach, J. A.; Trent, J. O.; Wang, Z.; Peiper, S. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3251–3253.

2）Ueda, S.; Oishi, S.; Wang, Z.; Araki, T.; Tamamura, H.; Cluzeau, J.; Ohno, H.; Kusano, S.; Nakashima, H.; Trent, J. O.; Peiper, S. C.; Fujii, N. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 192–198.

3）Wu, B.; Chien, E. Y. T.; Mol, C. D.; Fenalti, G.; Liu, W.; Katritch, V.; Abagyan, R.; Brooun, A.; Wells, P.; Bi, F. C.; Hamel, D. J.; Kuhn, P.; Handel, T. M.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. *Science* **2010**, *330*, 1066–1071.

4）Yoshikawa, Y.; Kobayashi, K.; Oishi, S.; Fujii, N.; Furuya, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2146–2150.

5）Kobayashi, K.; Oishi, S.; Hayashi, R.; Tomita, K.; Kubo, T.; Tanahara, N.; Ohno, H.; Yoshikawa, Y.; Furuya, T.; Hoshino, M.; Fujii, N. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2746–2757.

6）Kakizawa, T.; Sanjoh, A.; Kobayashi, A.; Hattori, Y.; Teruya, K.; Akaji, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2785–2789.

こばやし　かずや
京都薬科大学　薬品化学分野
kkoba@mb.kyoto-phu.ac.jp

留学体験記
～ E. James Petersson 研究室での研究～

田中　智博

1．はじめに

今回，PNJへの寄稿というチャンスを頂いたので，アメリカペンシルベニア州にあるペンシルベニア大学E. James Petersson研究室での2011年の５月から2012年の９月までの研究留学について報告させていただきます。そもそも，筆者がなぜ当時まだ立ち上がったばかりのPetersson研究室を留学先として選んだかと申しますと，きっかけは東京医科歯科大学（玉村研究室）の鳴海哲夫先生から「Jamesは絶対に今後のペンシルベニア大学化学科を代表する研究者になる。」と聞いていたからです。鳴海先生はペンシルベニア大学のBode研（現ETH）に研究留学されており，その鳴海先生がいうのだから間違いないだろうとなぜか当時の筆者は確信を持っていました。また，立ち上がったばかりのPetersson研究室の発展に自分がどれだけ貢献できるのか試してみたいという気持ちもあり，Petersson研究室への留学を決めました。これが，筆者の留学の第一歩となりました。

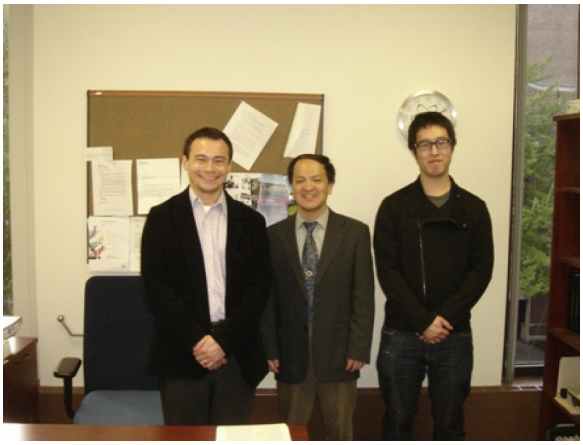


図１　左からPetersson先生，玉村先生（東京医科歯科大学），筆者

2．ペンシルベニア大学

ペンシルベニア大学はフィラデルフィア市に位置する私立大学です。同大学はアイビーリーグの一つであり，全米でも屈指の大学です。中でも，化学科は多数のノーベル賞化学者を排出していることで有名です。その中には白川英樹先生や根岸英一先生のような日本人研究者も含まれており，筆者も留学したての頃に素晴らしい先人たちと同じ校舎で研究できる事を誇らしく思った記憶があります。

図２　ペンシルベニア大学化学科校舎

3．Petersson labでの生活

Petersson研究室では，基本的にコアタイムが決められていません。その代わり，１日に12時間は研究に従事するという決まりが課されているので，朝早く来て夕方に帰る人もいれば，昼近くに来て深夜まで実験をする人もいます。当初，アメリカの院生は早く帰るという勝手なイメージを持っていたので，非常に新鮮に感じた記憶があります。また，休みも基本的には個人に一任されており，日曜日でも誰かしらラボにいるのが常でした。実験報告は毎週月曜日に行われ，２つのグループがそれぞれ週替わりで結果を発表する形でした。また，毎週水曜日にゼミがあり，研究報告を中心としたResearch，文献ゼミに相当するLiterature，ラボの研究に関連した最新の論文を報告するJournal clubの三つで構成されています。Researchは各々半年に一度位のペースで行います。Literatureは基本的には研究室の研究に関係あるようなテーマを決めてその事柄についてまとめ，報告するもので，筆者は「Recent advance in Japanese peptide/protein synthesis」というタイトルで発表しました。どのゼミも院生たちが積極的に質問し，活気のあるディスカッションを行っており，非常に有意義な時間でした。

4．Petersson labの研究

Petersson研究室の研究は主にタンパク質化学に重きを置いています。特に，タンパク質の動的な立体構造変化に焦点を当てて，研究を進めています。Petersson研究室ではタンパク質立体構造変化のプローブとして，様々な蛍光団をFörster Resonant Energy Transfer (FRET)やPhotoinduced Electron Transfer (PeT) 機構によりquenchingするアミド結合等価体thioamideを開発しています。このthioamideと蛍光団をタンパク質に導入し，目印を付けることで，タンパク質の動的な挙動をリアルタイムに解明する研究を行なっています。（図３）これらの研究はJACSやC&E Newsでもハイライトされるほど有名です[1,2]。また，その他にも後述するようなタンパク質半合成技術の開発やclick反応を用いてタンパク質の構造・機能を制御する研究などタンパク質化学に関連した研究を進めています。最近では神経疾患に関与するアミロイドタンパク質（α-Synucleinやamyloid βなど）の凝集過程の解析研究に力を入れています。

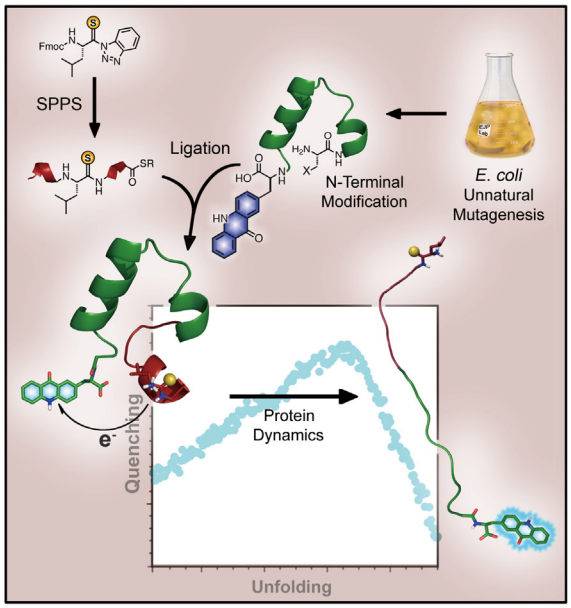


図３　thioamide probeによるタンパク質の動的挙動の検出

5．自身の研究について

筆者のPetersson研究室における研究を紹介させていただきます。タンパク質の構造や機能の解明を指向した研究を遂行する上で，タンパク質を化学合成することは非常に強力な手段となります。タンパク質の化学合成は主にN末端にCysを持つペプチドフラグメントとC末端にチオエステルを持つペプチドフラグメントを化学選択的にアミド結合でつなぐ，いわゆるネイティブケミカルライゲーション（NCL）法を用いて行われています。しかしながら，より巨大なタンパク質を合成する場合，各フラグメントを一般的な固相法で合成するのは困難であると考えられます。そこで，近年では大腸菌によって発現されたタンパク質に化学合成したペプチドをNCLにより導入する発現タンパク質ライゲーション（Expressed Protein Ligation: EPL）法も盛んに行われています。EPLには主に修飾したい部位に応じて二種類の方法があります。一つ目は，発現したタンパク質のN末端を酵素的に切断することで，N末端にCysを有するタンパク質を合成し，化学合成したペプチドチオエステルと反応させる方法，二つ目は発現したタンパク質のC末端にインテインを付加し，N, Sアシルシフトさせることで生じたチオエステルを化学合成したN末端Cysペプチドと反応させる方法があります。EPLを使えば，それぞれタンパク質のN末端側又はC末端側の配列に化学修飾が施されたタンパク質を簡単に合成することができます。ところが，このように非常に有用な手法であるNCL法やEPL法にも目的タンパク質のシークエンスにCysを含まなくてはいけないという制限があります。現在，そのような制限を排除するため，Raney Niまたはラジカル開始剤を用いた脱硫化反応やチオール含有補助基を用いた様々なアミノ酸サイト（Ala, Pro, Valなど）でのNCLが精力的に開発されています[3]。ところが，これらの方法の多くはN末端に化学的に合成したCys類縁体を導入する必要があるため，EPLに適用するのは難しいのが現状です。そこで，発現タンパク質のN末端にそのような非天然のCys類縁体を導入することができる手法を開発できれば，より自由なタンパク質の半合成法開発の礎になると考えられます。そのような手法として，筆者らはタンパク質N末端にアミノ酸を転移するアミノアシルtRNAトランスフェラーゼ（AaT）に注目しました。E.coli由来Leu/Phe AaTはアミノアシルtRNA（Zaa-A）をドナー基質として，N末端にLys/Argを有するタンパク質のN末端にLeu, PheやMetを導入する活性が報告されている酵素です。Petersson研究室では，以前にPheを模倣した非天然アミノ酸（4-azido-Pheなど）をアデノシンにチャージしたドナー基質（Zaa-A）を用いることで，タンパク質のN末端を修飾できることを報告しています[4]。そ

こで，筆者らは本反応を用いてホモシステイン（Hcy）をタンパク質に導入する手法の確立に取り組みました（図４）。まず，AaTの基質適用性を調べるために様々なアルキルチオールで側鎖を保護したHcy 誘導体を合成し，それぞれアデノシンに導入しました。それらの導入効率はジペプチドLys-Ala-Aminomethylcoumarinに対して酵素反応を行い，HPLCで定量することで評価しました。その結果，ペプチドN 末端へのHcyの導入効率はアルキル基の嵩高さに比例して低下し，メチルスルフィド体（Hcm）で21％と最も導入効率が高いことが示されました。この結果はタンパク質のN 末端にHcyを導入できる可能性を示唆するものでした。ところが，問題はこの導入効率ではタンパク質レベルでの実用が難しいという点でした。そんな折，コントロールであるMetの導入において，Met-Aを基質

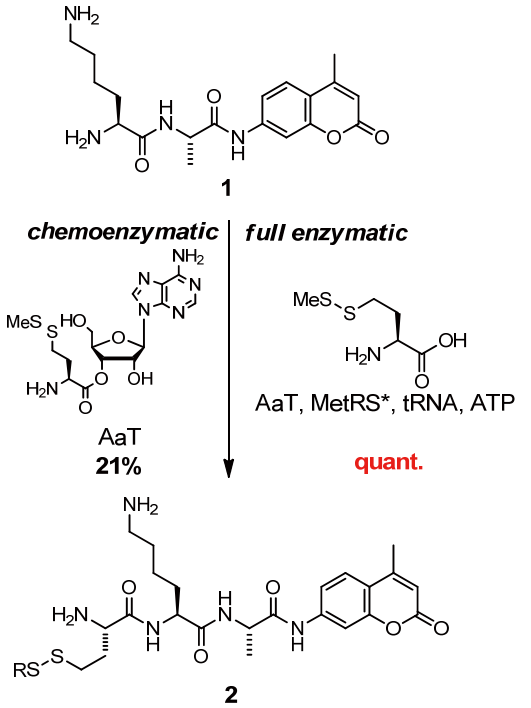


図４　AaTを用いたHcyの導入

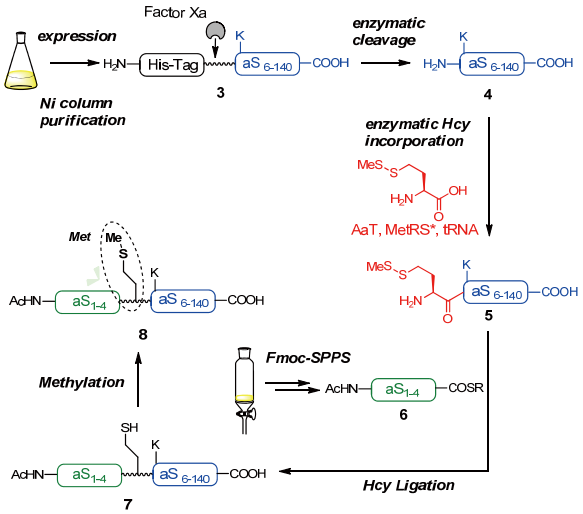


図５　Ac-aS$_{1–140}$の半合成スキーム

とした時よりもMet tRNA synthetase（MetRS）によりin situで生成したMet-tRNAを基質とした時の方がN末端への導入効率が高い事がわかりました。これは，Met-AではMetとAをつなぐエステル部分が系中で加水分解される一方，Met-tRNAではMetRSによりMetとtRNAから触媒的にドナー基質が再生されるためだと予想されました。そこで，ドナー基質をHcm-tRNAに変更し，MetRSを併用することでその導入効率を上げられるのではないかと考えました。ところが，天然のMetRSは基質選択性が高く，HcmをtRNAに導入することはできませんでした。そこで，Tirrelらによって報告されている変異 Met tRNA synthetase（L$_{13}$G, MetRS*）を用いたところ，反応は劇的に進行し，ほぼ100％の効率でHcmをペプチドに導入することができました。次に，ペプチドレベルでのHcyの導入が成功したので，タンパク質のMet siteでのEPLを試みました（図５）。本 EPLで必要となるシークエンスであるMet-LysをN 末端側に含んでいるαシヌクレイン（aS）を選択しました。aSはパーキンソン病の原因となると考えられている140残基のアミロイドタンパク質です。まず，大腸菌を用いてHis$_{Tag}$-aS$_{6-140}$（**3**）を発現しました。Niカラムによる精製後に，factor Xaを用いてLys-aS$_{6-140}$（**4**）を得ました。続いて，先ほどの手法を用いてHcmの導入を行いました。その結果，定量的にHcmが導入された**5**を合成することに成功しました。固相合成法により合成したAc-aS$_{1-4}$-SR（**6**）とのライゲーションを行ったところ，ほぼ定量的に**7**を得ることに成功しました。最後に，pH8.4の緩衝液中においてヨウ化メチルを用いてメチル化を行ったところ，HcyをMetに変換することで目的のN 末端がアセチル化されたaS（**8**）の半合成を達成しました。このようなMet siteにおけるN 末端側でのEPLは世界で初めての試みであり，今後のタンパク質半合成に新たなアプローチを提供する手法になると考えています[5]。現在，Petersson 研究室ではこの技術を発展させた様々なEPLについても研究が続けられており，さらなる発展が期待されます。

６．終わりに

最後になりましたが，留学中お世話になりましたE. James Petersson 先生とラボのメンバーに改めて感謝

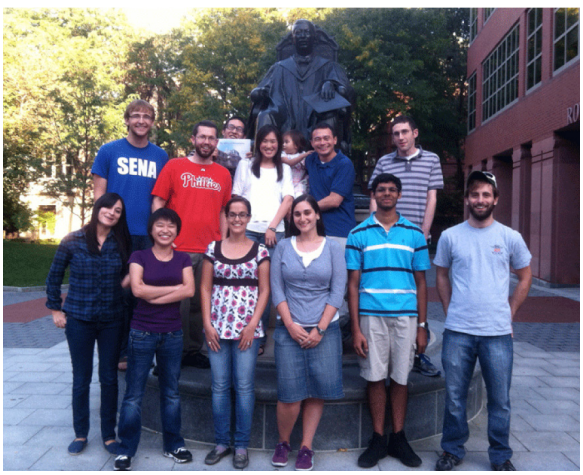


図６　Petersson 研究室メンバー

申し上げます。また，今回このような記事を執筆する機会を頂きました山形大学の今野博行先生および東京医科歯科大学の玉村啓和先生に深く感謝いたします。

参考文献

1）S. Batjargal, E. J. Petersson et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 9172–9182 (2012).
2）J. M. Goldberg, E. J. Petersson et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, **134,** 6088–6091 (2012).
3）C. Kan, S. J. Danishefsky et. al., *Tetrahedron*, **65**, 9047–9065 (2009).
4）A. M. Wagner, E. J. Petersson et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 15139–15147 (2011).
5）T. Tanaka, E. J. Petersson et. al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 6210–6213 (2013).

たなか　ともひろ
東京理科大学薬学部生命創薬科学科
生物有機化学分野
totana@rs.tus.ac.jp

米国での留学体験記

大橋　南美

研究留学後，2012年10月から東京医科歯科大学玉村啓和教授の研究室に博士研究員として復帰いたしました。私は，2011年７月から2012年９月までプリンストン大学のTom Muir研究室に所属していました。行っていたテーマは帰国に際し学生に引き継ぎ未発表なため，本稿では研究室での日常や生活面で体験したことを主に紹介させていただきます。

１．渡航に至った経緯

きっかけは，指導教員である玉村先生のご厚意により，日本学術振興会特別研究員制度を利用した海外渡航を勧めていただいたことです。Muir研には以前から興味を持っており，そこで修業したく思い志願のメールを送りました。１週間以上経っても反応はありませんでしたが，その後玉村先生からもメールをしていただきました。英語が堪能な後輩に同席してもらいながらの電話面接を経て，採用をいただくことができました。

２．プリンストン大学化学科

プリンストン大学は，ニュージャージー州プリンストン市にある私立大学で，スクールカラーであるオレンジと黒，そしてマスコットであるトラが構内のいたるところに置いてあるのがとても印象的です。構内に立ち並ぶ歴史的な雰囲気の石造りの建物とは対照的に，数年前に建て直された化学科の建物は，ガラス外壁，中央が吹き抜けとなっている内部，そして天井からつるされた雲状のオブジェなどがあり，明るく近代的でした。また建物内にあるカフェの名前「Ca Fe」に遊び心を感じました。一階にある学生実験用の部屋はガラス壁で外から丸見えとなっており，とても開放的です。

現在，化学科には，MacMillan触媒の開発者であるDavid W. C. MacMillan教授やマテリアルの分野において新物質探索で著名なRobert J. Cava教授などが在籍されています。

化学科建物の内部

３．プリンストンでの生活について

プリンストンがあるニュージャージー州は米国東部の大西洋沿岸に位置し，豊かな自然に恵まれています。特にビーチが有名で，プリンストンからも車で１時間半かからない程度で行ける距離にあります。プリンストンは大学中心のとても穏やかで治安も非常によい町です。住宅事情について，大学周辺の一人暮らし用アパートの家賃相場は高く，ハウス/ルームシェアまたは間借りが多かったように思います。私の場合，当初は部屋を間借りし，その後，同研究室のポスドクとルームシェアをしていました。

プリンストンの街並み

プリンストンの街並み

プリンストン大学内の建物

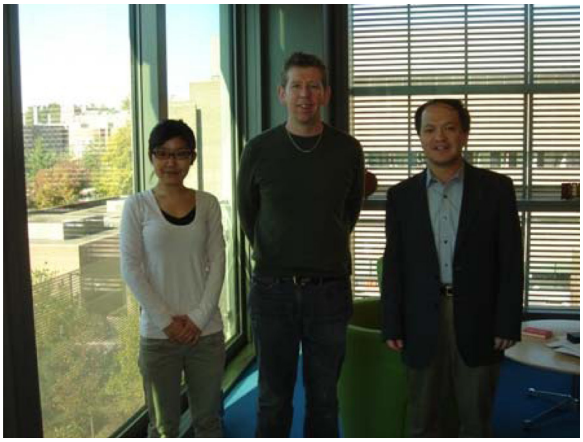
4．Muir 研での研究生活

留学先のTom Muir 研究室は2011年にロックフェラー大学からプリンストン大学へ移動したばかりでしたが，私が渡米した時には引っ越し作業は終わっていました。構成員は半分くらいが学生で，数人のスタッフそして10人前後のポスドクがいました。Muir 研はタンパク質スプライシングを応用したexpressed protein ligation（EPL）などペプチド・タンパク質化学的な技術を基盤としたケミカルバイオロジーを得意としており，インテインによるタンパク質スプライシングとその応用，さらに近年ではタンパク質翻訳後修飾に着目した論文を多く発表しています。研究室の雰囲気は，情報を共有し合うという意識が高く，疑問・問題についてよく議論が行われていました。週一回のグループミーティングではそれぞれ一人が実験報告または論文紹介を担当し，学生・ポスドク・スタッフ（事務系アシスタントとMuir 先生以外）の中で順番が組まれていました。空きが出来てしまった際には，Muir 先生が興味を持たれていることを皆に提案し，それについての議論が行われ，新しいテーマが動き出すこともありました。加えて，近い研究テーマの数人とMuir 先生とで行われるサブグループミーティングが隔週であり，そこでは全員が実験報告をします。Muir 先生が長期出張に行かれている時にはスカイプを介したミーティングなどもありました。また，月に一度，共同研究を行っているロックフェラー大学のC. David Allis 研究室との合同ミーティングがあり，他大学の研究者と交流するよい機会でした。

Muir 研の特徴として，全員ではありませんが皆でお昼を食べに行くという習慣が出来ていました。晴れた日には近くにある芝生広場で草に座りながらの昼食で，とてもよい気分転換になりました。また，Muir 先生からの提案で，“ソーシャルアワー”と称して皆で夕飯を食べに行くというイベントが毎週木曜に設けられていました。週中ということもあり，はじめは戸惑う人もいましたが，回を重ねるごとに日常の楽しみに一つとなりました。研究室全体のイベントとして，Muir 先生の家でのバーベキュー，中華レストランでの食事，またはビーチに行って海水浴などがありました。

5．留学中の研究について

エピジェネティクスに関わるクロマチン構造制御とヒストン翻訳後修飾についての研究活動を行っていました。エピジェネティックな生命現象はDNAにコードされている遺伝子情報だけでは明らかにされないことから，疾患の発症機構解明および治療法の開発研究において注目されています。真核細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現の制御因子の一つとして，DNA-タンパク質の凝集体であるクロマチン構造の研究が盛んに行われています。ヒストンはクロマチン構造形成において中心的な役割を果たすタンパク質であり，多くの翻訳後修飾を受けることでクロマチン構造の制御に関与しています[1)]。ヒストン翻訳後修飾間にはクロストークが存在し，私が標的としていたのは，H2BK120のユビキチン化とH3K79のメチル化で，H3K79の過度なメチル化は急性骨髄性白血病に関わっています。これまでに，H3K79を基質とするメチル化酵素，hDot1L，のメチル化活性にはH2BK120に修飾されたユビキチン表面の認識が重要であることが明らかとなっています[2)]。しかし，hDot1Lのどの部分がユビキチンと相互作用するのかは未知です。hDot1Lのユビキチン相互作用部位が明らかとなれば，重篤な疾患に関わるH3K79の過度なメチル化制御を基盤とした新規治療法の開発につながる知見が得られるのではと期待されます。



玉村先生のアメリカ訪問

6．おわりに

プリンストンでの研究生活はとても充実したもので，新規の知識や技術を得ることができ，さらに多くの人と知り合うこが出来ました。この経験をこれからの研究生活に活かしていきたいと思います。

今回，ペプチドニュースレターで報告の機会を与えていただきましたペプチド学会の皆様，編集委員の先生方に心より御礼申し上げます。報告しました留学研究の一部は日本学術振興会特別研究員制度によるものでもあり，この場をお借りして感謝いたします。

今後，学会活動にも積極的に参加させていただきたいと考えております。どうぞよろしくお願い申し上げます。

参考文献

1）Rea, S., Jenuwein, T., et al. *Nature* 2000, **406**, 593–599.

2）Chatterjee, C., Muir, T.W., et al., *Nat. Chem. Biol*. 2010, **6**, 267–269.

おおはし　なみ
東京医科歯科大学　生体材料工学研究所
メディシナルケミストリー分野
ohashi.mr@tmd.ac.jp

日本ペプチド学会第17回ペプチドフォーラム開催報告

「ケミカルバイオロジーを先導する明日のペプチド化学：新しい接点と可能性を探る」

日時：2013年６月18日（火）
　　13：00～17：30
場所：東京医科歯科大学生体材料工学研究所
　　第二会議室
主催：日本ペプチド学会
共催：日本薬学会，日本化学会
後援：日本ケミカルバイオロジー学会
オーガナイザ：玉村啓和（東京医歯大），林　良雄（東薬大薬）

高山健太郎

日本ペプチド学会により主催されるペプチドフォーラムは，広くペプチドに関連する科学やペプチド学会の活動について紹介を行うことを目的として企画されているものであります。第17回目でフォーカスされたケミカルバイオロジーは，化学と生物が融合した複合研究領域であり，近年急速に発展している分野です。有機化学的概念や手法，有機化学によって得られた化合物を活用して生命現象を新たな視点で解明・制御する研究がケミカルバイオロジーであり，生体機能分子の中でも重要なウエイトを占めるペプチド・タンパク質の科学と密接に関係しています。本フォーラムは，ペプチド科学を活用したケミカルバイオロジー研究を積極的に進めている先生方が話題を提供され，ペプチドを基盤とした生命志向型化学を先導する学術・方法論を考える契機となることを期待して開催されました。また，６月19日～21日にかけて同じく東京医科歯科大学にて日本ケミカルバイオロジー学会第８回年会が開催されたこともあり，当該学会にて招待講演をされたE. James Petersson博士（University of Pennsylvania）及びInes Neundorf博士（University of Cologne）にも貴重なご講演を賜ることができました。梅雨時にも関わらず当日は天候にも恵まれ，大学関係者（58名）のみならず，企業からの参加者５名を加え，計63名の規模で開催され，非常に盛況なフォーラムでありました。各発表におきましては活発な討論が行われ，懇親会も多くの方が引き続き参加されていました。フォーラム開催の目的の１つであります「関連分野の研究者同士の新たな交流」も生まれ，非常に有意義な会であったと感じております。最後になりましたが，本フォーラム開催にあたりご尽力くださいました，東京医科歯科大学の玉村啓和先生，東京薬科大学の林良雄先生には厚く御礼申し上げます。

講演者と講演タイトル（ご発表順）

1．野村　渉（東京医歯大）
「タグ－プローブシステムによる細胞内タンパク質の動態観察法の研究」

2．相馬洋平（東大院薬／科学技術振興機構・ERATO）
「アミロイドβペプチドを標的としたケミカルバイオロジー研究」

3．小出隆規（早稲田大先進理工）
「三重らせんペプチドのエンジニアリング」

4．E. James Petersson（University of Pennsylvania）
「Expressed protein ligation without cysteine: N-terminal protein functionalization with aminoacyl transferases」

5．Ines Neundorf（University of Cologne）
「From small molecules to particles - intracellular cargo delivery using cell-penetrating peptides」

6．林　良雄（東薬大薬）
「ペプチド化学は筋肉関連疾患の治療に貢献できるのか？」

たかやま　けんたろう
東京薬科大学　薬学部　薬品化学教室
ktaka@toyaku.ac.jp

第４回 Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Applications Symposium/ 第18回ペプチドフォーラム（SPPS 2013）

参加登録・発表申込を受付中です！

Modern Solid Phase Peptide Synthesis & its Applications Symposium（SPPS）は，過去３回ともオーストラリア国内において，オーストラリアペプチドカンファレンスの公式サテライトミーティングとして開催されてきました。今回，第４回 Asia-Pacific International Peptide Symposium/ 第50回ペプチド討論会（APIPS 2013，大阪）へのオーストラリア研究者の参加を促すと共に，日豪ペプチド学会の交流・連携を更に活性化することを目指し，第４回 SPPS（SPPS 2013）を日豪ペプチド学会が共同ホストとなり神戸で開催することになりました。また，内外からペプチド科学者が神戸に集まる機会に，第18回ペプチドフォーラム（日本ペプチド学会主催）をSPPS 2013と併催し，ペプチド合成化学ならびにペプチドを援用する広範な研究分野に関して討論の場を提供します。なお，SPPS2013は，APIPS 2013の公式サテライトミーティングです。

会　期
平成25年11月２日（土）～４日（月）

会　場
舞子ビラ神戸（神戸市垂水区東舞子町18-11）

ウェブサイト
http://www.solidphase.org/

主　催
日本ペプチド学会，オーストラリアペプチド協会
¦第18回ペプチドフォーラム「固相ペプチド合成の最先端と，その応用研究」（日本ペプチド学会主催）を併催します¦

協　賛
日本化学会，日本薬学会，日本農芸化学会，日本蛋白質科学会

発表申込・アブストラクト受付期間
６月１日～８月30日（金）
（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15日頃にE-mailで通知します。

討論主題
ペプチド科学分野における基礎から応用まで，幅広い研究発表を対象とします。

発表形式
招待講演，一般口頭発表およびポスター発表。優れた学生・若手研究者発表を対象とした表彰制度があります。
招待講演：Fernando Albericio（バルセロナ大学），Paramjit Arora（ニューヨーク大学），David Craik（クイーンズランド大学），Stephen Kent（シカゴ大学），Yoon-sik Lee（ソウル大学），Xuechen Li（香港大学），Lei Liu（清華大学），Dennis Löwik（ナイメーヘン大学），重永　章（徳島大学），Marius Skwarczynski（クイーンズランド大学），高橋大輔（味の素（株）），James Tam（南洋工科大学），Don Wellings（SpheriTech）

発表申込方法
上記ウェブサイトで登録情報を入力後，発表申込の手続きおよびアブストラクトを投稿して下さい。詳細は本会ウェブサイトをご参照下さい。

参加登録費
事前登録（８月30日まで）：一般 AUD$（オーストラリアドル）395・学生 AUD$275．当日（８月31日以降）：一般 AUD$495・学生 AUD$350．日本から参加される方は，円貨での銀行振り込みもご利用できます（参加登録時にお申し出下さい）。
下記の懇親会（11月２・３・４日），昼食（11月３・４日）費用も参加登録費に含まれています。

参加登録予約方法
上記ウェブサイトよりご登録下さい。

懇親会
11月２日（土）ウエルカムBBQ，11月３日（日）学会バンケット，11月４日（月）フェアウェルバンケット。何れの費用も参加登録費に含まれています。

SPPS 2013世話人
John Wade（メルボルン大学），西内祐二［（株）ペプチド研究所］

問い合わせ
〒567-0085　大阪府茨木市彩都あさぎ７丁目2-9
（株）ペプチド研究所内
SPPS2013事務局　西内祐二
Tel:（072）643-4411　FAX:（072）643-4422
E-mail: SPPS2013@peptide.co.jp
http://www.solidphase.org/

第４回アジア太平洋国際ペプチドシンポジウム/ 第50回ペプチド討論会（APIPS 2013）

参加登録・発表申込を受付中です！

Asia-Pacific International Peptide Symposium（APIPS）は，アジア太平洋地域のペプチド/タンパク質科学者を集め最新の研究成果・情報を交換するのみならず，相互の研究ネットワーク活性化に資する目的で，福岡において第１回大会（2004年）が開催されました。APIPSは，ケアンズ（オーストラリア，2007年），済州島（韓国，2009年）を経て，再び日本で開催することになりました。また，ペプチド討論会は本年度に，第50回記念大会を迎えます。この節目に，本討論会の発祥の地である大阪において，第４回 APIPS と第50回ペプチド討論会を併催する運びになりました。APIPS 2013の開催は，日本ペプチド学会がペプチド科学の更なる振興に貢献するためにも，本研究分野における日本の主導的立場を強化・維持するためにも重要な意味を持っています。

会　期
平成25年11月６日（水）～８日（金）

会　場
ホテル阪急エキスポパーク（大阪府吹田市千里万博公園1-5）

ウェブサイト
http://www.aeplan.co.jp/APIPS2013/
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，日本蛋白質科学会
発表申込・アブストラクト受付期間
６月１日～ ８月31日（土）
（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20日頃にE-mailで通知します。
要旨集発行日
10月10日
（要旨集の発行と同時に，本会ウェブサイトに掲載します）
討論主題
アミノ酸およびペプチドの化学，生理活性ペプチドの単離・構造決定および合成，ペプチド合成の新規な戦略と方法論，ペプチドの構造 - 機能相関，ペプチドの医学・薬学的研究，ペプチドインフォマティクス，ペプチドに関連したケミカルバイオロジー，ペプチドの構造解析，ペプチドのバイオマテリアルへの応用，その他広くペプチド科学に関する研究
発表形式
招待講演，一般口頭発表およびポスター発表。優れた学生・若手研究者発表を対象とした表彰制度があります。今回のペプチド討論会は，APIPSとの併催ですので，全て英語での発表になります。
発表申込方法
上記ウェブサイトで参加登録を済ませた後，“Abstract Submission”に進み，発表申込とアブストラクト（Wordファイル）をアップロードして下さい。詳細は本会ウェブサイトをご参照下さい。
参加登録費
事前登録（８月31日まで）：会員・共催学会会員（一般10,000円・学生5,000円），非会員（一般14,000円・学生7,000円）。当日（９月１日以降）：会員・共催学会会員（一般12,000円・学生6,000円），非会員（一般16,000円・学生8,000円）
参加登録予約方法
上記ウェブサイトよりご登録下さい。
懇親会
11月７日（木）ホテル阪急エキスポパークにて。会費：一般8,000円，学生4,000円
託児室
会場内に専門の保育士等をおいた託児室を設ける予定です（３ヶ月～未就学児対象）。ご利用には事前予約が必要となります。ご希望の方は，下記APIPS2013事務局へ10月１日（火）までにお問い合わせ下さい。
市民フォーラム
日時：平成25年11月９日（土）　午後
会場：千里ライフサイエンスセンター（大阪府豊中市新千里東町1-4-2）
APIPS2013世話人
西内祐二，豊島正［(株）ペプチド研究所］

問い合わせ
〒567-0085　大阪府茨木市彩都あさぎ７丁目2-9
（株）ペプチド研究所内
APIPS2013事務局
Tel:（072）643-4411
FAX:（072）643-4422
E-mail: APIPS2013@peptide.co.jp
http://www.aeplan.co.jp/APIPS2013/

生命分子機能研究会2013学術集会
「生命分子・ペプチド創薬の医療へのインパクト」

日時：2013年９月19日（木）13：30 ～ 18：30,
　　情報交換会　19：00 ～ 21：00
　　2013年９月20日（金）９：20 ～ 17：00
会場：長浜バイオ大学　命江館３階　中講義室１，２
主催：生命分子機能研究会
共催：長浜バイオ大学，長浜バイオ大学産官学共同研究・事業開発センター，長浜バイオ大学ペプチド科学研究室
協賛：日本ペプチド学会，日本薬学会，日本化学会，日本農芸化学会，日本生化学会，日本薬理学会，日本内分泌学会，日本病態プロテアーゼ学会
後援：日本ケミカルバイオロジー学会，ペプチド機能研究会，武田科学振興財団

招待講演者：
寒川　賢治（国立循環器病研究センター研究所・所長）
「循環調節ペプチドの新たな機能とその臨床応用」
横山　　巌（武田科学振興財団・理事長）
「Pharmaceutical Industry: Things in Japan and Worldwide Trend」
土屋　裕弘（田辺三菱製薬（株）・代表取締役社長）
「夢のある新薬　夢のある企業」
南竹　義春（アスビオファーマ（株）・取締役）
「生理活性ペプチドの創薬研究」
赤路　健一（京都薬科大学・教授）
「疾患関連蛋白質を標的とする機能性分子の設計」
上杉　志成（京都大学・教授）
「細胞治療を助ける合成化合物」
菅　　裕明（東京大学・教授）
「非古典・特殊ペプチド創薬のススメ」
杉山　治夫（大阪大学・教授）
「WT１ペプチドがんワクチン」
玉村　啓和（東京医科歯科大学・教授）
「ターゲットタンパク質を特異的に認識するプローブの創製」
津田　裕子（神戸学院大学・教授）
「活性中心志向型プラスミン阻害剤の探索」
二木　史朗（京都大学・教授）
「ペプチドによるバイオ高分子の細胞内送達」

長谷川　慎（長浜バイオ大学・准教授）
「細菌毒素に対する人工抗体様ペプチドの開発」
林　　良雄（東京薬科大学・教授）
「筋疾患を標的とするペプチド創薬」
北條　裕信（東海大学・教授）
「化学合成を利用した糖タンパク質の機能解明」
木曽　良明（長浜バイオ大学・客員教授）（世話人）
「生命分子・ペプチドを基盤とする創薬科学」
向井　秀仁（長浜バイオ大学・准教授）（世話人）
「クリプタイドと創薬」

若手招待講演者：
大石　真也（京都大学・講師）
「ウイルス変異に基づく抗 HIV 活性ペプチドのデザイン」
重永　　章（徳島大学・助教）
「刺激応答型アミノ酸の開発と生命科学分野への応用」
相馬　洋平（東京大学・ERATOグループリーダー）
「アミロイドβペプチドの凝集を標的とした創薬化学研究」

参 加 費：一般　3,000円，学生　無料
情報交換会会費：一般　7,000円，学生　3,000円
（当日お支払い下さい。）
演題募集：口頭発表（数件）およびポスター発表（要旨をA４用紙 1 枚以内で作成し参加申込とともに2013年８月10日までにメールで送付して下さい。）
参加申込：必要，参加登録・情報交換会申込締切
2013年８月31日（メールにてご登録下さい。）
宿　　泊：長浜ロイヤルホテル
１泊朝食付7,500円～，電話：0749-64-2000，
メール：daigoro-ito@daiwaresort.co.jp
（担当：伊藤，佐藤，「生命分子機能研究会2013学術集会参加」とお伝え下さい。）
事務局連絡先：
〒526-0829　滋賀県長浜市田村町1266番地
長浜バイオ大学ペプチド科学研究室内
生命分子機能研究会2013学術集会
事務局　担当：向井秀仁
メール：biomol@nagahama-i-bio.ac.jp
電　話：0749-64-8113　Fax：0749-64-8140
Web: http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/news/event/2013/06/_919.html

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN
編集・発行：日本ペプチド学会
〒 562-8686　箕面市稲 4-1-2
㈱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
日高　雄二（近畿大学理工学部）
TEL 06-6721-2332，FAX 06-6723-2721
e-mail: yuji@life.kindai.ac.jp
今野　博行（山形大学大学院理工学研究科）
TEL 0238-26-3131，FAX 0238-26-3131
e-mail: konno@yz.yamagata-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
小野　慎（富山大学大学院理工学研究部（工学））
TEL 076-445-6845，FAX 076-445-6845
e-mail: shinono@eng.u-toyama.ac.jp

（本号編集担当：今野博行）