PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.90　　2013年10月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

http://peptide-soc.jp

第４回アジアー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（APIPS2013）の開催にむけて

西内　祐二

豊島　　正

本年は11月６日（水）から８日（金）までの３日間，第50回ペプチド討論会（50th JPS）をホテル阪急エキスポパーク（吹田市）に於いて開催します。本討論会が50回目の節目を迎える好機に，この記念大会を第４回アジア-太平洋国際ペプチドシンポジウム（4th APIPS）とジョイントし，APIPS2013（http://aeplan.co.jp/APIPS2013/）として開催することになりました。豊島 正・西内祐二（株式会社ペプチド研究所）がco-chairとしてお世話させて頂きます。

APIPSは，オーストラリア・中国・インド・韓国・シンガポール・日本ペプチド学会 / 協会の共同で組織されています。その目的は，アジア-太平洋地域からペプチド・タンパク質研究者を招集し，ペプチド関連分野の最新の成果，アイデア，発見の共有，さらには討論の場を提供することにあり，福岡で第１回大会の産声を挙げました（2004年）。第２回 APIPSはケアンズ（オーストラリア，2007年），続いて第３回大会はチェジュ島（韓国，2009年）へとバトンが手渡されてきました。今回が，日本での２回目の開催になります。一方，JPSは大阪での第１回ペプチド討論会（大阪大学蛋白質研究所セミナーとして開催，1962年）以来，諸先生方のご尽力により日本各地で毎年開催され，今年の第50回大会へと歩みを重ねてきました。そして今回，APIPSを組織する各国ペプチド学会 / 協会のご理解・ご協力の下，APIPSとJPSがジョイントしたAPIPS2013を，JPSの生誕地である大阪で開催し，その50歳の誕生日をお祝い出来ることをお慶び申し上げます。また同時に，APIPS2013が，世界中の特にアジア-太平洋地域におけるペプチド/タンパク質科学の横断的ならびに革新的な発展に寄与する事を確信しております。

APIPS2013へは，日本を含め18ヶ国から252演題のお申し込みを頂き，口頭発表が62題，ポスター発表が190題を数えます。世界中から沢山の発表申し込みに対し，特に若い研究者に口頭発表の機会を可能な限り提供するために，窮屈なプログラム編成になっております。ご参加の皆様にはご不便をおかけ致しますが，ご協力をお願い申し上げます。APIPSを組織する各国ペプチド学会 / 協会を代表する諸先生，ならびにヨーロッパ・アメリカペプチド学会の先生方を特別講演者として計17名お迎えします。また，日本ペプチド学会賞（藤井信孝先生，京都大学），日本ペプチド学会奨励賞（野村 渉先生，東京医科歯科大学；堤 浩先生，東京工業大学）の受賞講演を３日目に予定しています。第50回 JPSを記念して，２日目には歴代日本ペプチド学会会長によるパネルディスカッションを企画しております。JPS 運営のご苦労や想い出深いお話をご披露下さると存じますので，奮ってご参加下さい。

APIPS2013のサテライトミーティングとして，市民フォーラムを千里ライフサイエンスセンター（11月９日，豊中市）で，第４回 Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Applications Symposium（SPPS2013）をホテル舞子ビラ神戸（11月２日～４日，神戸市）で開催します。市民フォーラム（http://aeplan.co.jp/APIPS2013/forum2013.html）では，産学でご活躍の先生が，私達の生命・生活を支えるアミノ酸・ペプ

チドについて判り易く解説して下さいます。一方，SPPS2013（http://www.solidphase.org/）は，ペプチド合成化学のみならずペプチドの医学・生物物理学・生化学等への応用研究に特化した研究成果を発表するシンポジウムです。過去３回はオーストラリアで，オーストラリアペプチドカンファレンスのサテライトミーティングとして開催（ポートダグラス2007年，ゴールドコースト2009年，デイドリーム島20011年）されました。今回，APIPS2013へのオーストラリア研究者の参加を促すと共に，日豪研究者の交流・連携を更に活性化することを目指し，日豪ペプチド学会 / 協会が共同でホストとなり日本で開催することになりました。John Wade 先生（メルボルン大学）と西内祐二が，お世話させて頂きます。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「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SPPS2013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。SPPS2013の共同開催は，日豪に留まらず世界規模での研究交流に資するのみならず，ペプチド科学のアクティビティーを世界にアピールする絶好の機会と考えます。

最後に，APIPS2013を開催するに当たり，多くの企業，団体から協賛金，広告，企業展示やランチョンセミナー等でご支援・ご協力を賜りました。この場をお借りして篤く御礼申し上げます。また，準備と運営さらにはプログラム編成にご高配頂きました組織委員の皆様，実働メンバーとしてご尽力頂いた響野 元さん，吉矢 拓さん，望月雅允さん，谷村恭子さん，熊谷久美子さん，津田修吾さんと，日本ペプチド学会事務局の柄崎令子さんに心よりお礼申し上げます。

APIPS2013が，参加する皆様に最新の科学情報を交換する場を提供するのは元より，お互いの友情を深め新たな連携を培う一助にならんことを願ってやみません。

学会名	日時	会場
SPPS2013	11 月 2-4 日	ホテル舞子ビラ神戸
APIPS2013	11 月 6-8 日	ホテル阪急エキスポパーク
市民フォーラム	11 月 9 日	千里ライフサイエンスセンター

にしうち　ゆうじ
（株）ペプチド研究所 /
大阪大学大学院理学研究科
yuji@peptide.co.jp

てしま　ただし
（株）ペプチド研究所 /
大阪大学大学院理学研究科
teshima@peptide.co.jp

平成25年度日本ペプチド学会賞を受賞して

藤井　信孝

はじめに

この度，「ペプチド・蛋白質化学を基盤とする創薬研究」という研究課題で日本ペプチド学会賞を受賞することになり，伝統のある本賞を受けるにあたり大変光栄に思うとともに，今後も日本ペプチド学会の発展と若手研究者の育成に専心すべく大きな責任を感じています。また今回の受賞は筆者の研究を支えていただいた京都大学薬学研究科薬品有機製造学・ケモゲノミクス研究室の恩師の先生方，先輩，同僚，および卒業生の方々のご協力とご支援の賜物であり，この場を借りて厚く御礼申し上げます。

筆者は窪田実博士（京大薬学サッカー部の先輩）に導かれて学部４回生として京都大学薬学部薬品製造学教室に配属し，当時助教授をしておられた矢島治明名誉教授の研究室で直接研究指導を受ける機会に恵まれ，ペプチド化学のイロハから研究者魂の真髄まで懇切丁寧なご指導を賜ることができました。当初は，１）有機スルホン酸脱保護法の開発[1]，２）ribonuclease A（RNase A）のC- 末端７残基ペプチドの大量合成，という二つのテーマを与えられ，アミノ酸誘導体の合成からペプチド合成のノウハウについて同室であった北川幸己教授（新潟薬科大学），木曽良明先生（長浜バイオ大学客員教授）からまさに手取り足取りのご指導をいただき，漸くペプチド化学研究者としてのスタートを切ることができました。以来二つの研究テーマに取り組みましたが，１）有機スルホン酸脱保護法に関してはMet 残基の顕著な副反応の克服およびArgの保護基の開発という課題において，当時助教授をしておられた入江寛先生（長崎大学名誉

教授）および当時武田薬品の故藤野政彦先生，西村紀先生（神戸大学）のご協力を得て解決することができました。Metの副反応はアルキルカチオンスカベンジャーとして添加したanisoleのメチルエーテルが*S*-methylsulfonium塩としてMetをアルキル化していること，および，anisoleに変えてthioanisole/*m*-cresolをスカベンジャーとして用いることにより副反応を回避できることを明らかにしました[2]。またArgの保護基に関してはHF法で多用されていたTos基に変えてMts（mesitylenesulfonyl）基を用いることにより合成の最終段階において有機スルホン酸で容易に脱保護できることを明らかにしました[3]。このような経緯を踏まえて種々条件検討し，trifuloromethanesulfonic acid(TFMSA)-thioanisole(1M)/*m*-cresol/TFA系を副反応の少ない最終脱保護法として開発し[4]，従来のHF法と同様広く用いられるようになりました。2）RNase Aの全合成に関しては，矢島先生のライフワークの一つとして，challengingなテーマに主体的に取り組む機会を与えていただき光栄に思っています。合成ストラテジーとして124残基からなるRNase Aを30個のフラグメントに分けてC-末端からAzide法を用いるフラグメント縮合法により順次延長する方法を採用しましたが，ペプチド鎖の延長に伴う保護ペプチドの溶解性と精製には大変苦労しました。難溶性の長鎖保護ペプチドの反応溶媒としてDMSO-HMPA-DMFの混合溶媒を適用し，通常はDMSO(DMF)-MeOHによる再沈殿を繰り返すことにより精製を行いましたが，精製が不十分な場合はSephacryl-S200を担体として含水DMSOを溶出液とするゲル濾過を行うことにより保護基のついたRNase Aを得ることができました。最終脱保護はTFMSA-thioanisole(1M)/*m*-cresol/TFA系を用い，glutathione酸化法により4つのジスルフィド結合を形成した後uridine誘導体をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー等の精製過程を経てRNase Aのfull活性を有するタンパク質を結晶体として捕捉することができました[5]。筆者自身RNase Aの合成に着手して7年の歳月を経て完成に至りましたが，大変苦労したにも拘わらず研究者としての青春の一里塚として未だによい思い出となっています。液相法による100残基を超えるタンパク質の合成はその後，榊原俊平先生，木村皓俊先生を初めペプチド研究所のグループによりHF最終脱保護法を用いてmidkine（121残基，5ジスルフィド）[6]，pleiotrophin（136残基，5ジスルフィド）[7]の華麗な全合成が達成されています。最近ではProf. S.B.H. Kent & Prof. P.E. Dawson[8]や相本三郎先生（大阪大学理事・副学長）ら[9]のイニシアチブにより開発されたNative Chemical Ligation（NCL）を用いる方法が主流となっており，効率的かつ画期的な手法として高く評価されています。固相合成等により得られた基本的に無保護のペプチドフラグメントのチオエステルをcysteine ligation法等で縮合させる本手法は組み換えDNA生合成法とも組み合わせることが可能で，今後タンパク質合成の第一選択肢となることは明らかです。特に，相本先生，川上先生らにより報告されたCPE（cysteinyl prolyl ester）法[10]や大高章教授（徳島大学）らにより報告されたSEAlide（*N*-sulphanylethylanilide）法[11]は信頼性の高いチオエステル調製法として適用拡大が期待されます。非天然型タンパク質も含めて機能性タンパク質の構造機能相関研究に今後極めて大きな役割を果たすと思われます。

以下今回の受賞の対象になった筆者の研究について概説いたします。

創薬研究において，受容体・酵素という2つの重要な標的分子に対する医薬品開発が著しく進展したことは，ペプチド・タンパク質といった生体分子の合成技術の進歩によるところも大きいと認識しています。このうち，ペプチドは，受容体リガンドや酵素基質として創薬の基礎研究に利用されるとともに医薬品開発のリード化合物を提供することから，高品質な化学合成品を簡便に調製する技術開発が求められます。筆者は，ペプチド・タンパク質の化学合成に関する基礎研究を推進するとともに，これらを基盤としたペプチド等価体の合成技術の開発と応用，抗ウイルス剤，抗癌剤の開発を目指した分子プローブ・医薬品候補化合物の創製と応用に関する研究を展開してきました。

[1] ペプチド・タンパク質の化学合成のための有機合成的手法の開発

生理活性ペプチド・タンパク質の化学合成プロセスは，ペプチド鎖の伸長反応と各種側鎖官能基に付与された保護基の脱保護反応（最終脱保護反応）から構成されます。前者は，Merrifieldの固相合成法の開発により簡便なペプチド鎖構築が容易となり，合成の自動化とともに，ラセミ化を制御した効率的な縮合剤の開発，各種官能基の保護基の開発等を通じて，50残基程度のペプチドは比較的高純度で合成できるようになってきました。一方，最終脱保護反応とこれに密接に関連するアミノ酸側鎖保護基の選択は，1980年代においてもペプチド合成における未解決の課題を残していました。

筆者は，各種アミノ酸側鎖に対応する保護基に対する脱保護反応を精査し，前述のようにTFMSA-thioanisole(1M)/*m*-cresol/TFA系により，Boc法で広く用いられるベンジルアルコール系保護基，アルギニン側鎖のMts基を短時間で定量的に除去し，目的のペプチドを収率よく回収する技術を確立しました[4]。その後本法を改良して，TFMSAの代わりにtrimethylsilyl triflate（TMSOTf）またはtrimethylsilyl bromide（TMSBr）を用いるハード酸脱保護法を開発しました[12]。前者は，Boc法による液相合成・固相合成においてAsp-Xaaのサクシニミド形成等の副反応を抑制しTFMSAを用いるよりも純度の高い目的物を与えます。後者もベンジルアルコール系の保護基の脱保護にも有効ですが脱保護能はTMSOTfよりも劣り，TFA溶媒を用いる反応ではHBrガスを複製する点に少し難点があります。一般に，C-末端アミド型のペプチドのFmoc型固相合成の際に，樹脂からのペプチドの切り出し収率が悪いことがありますが，その際にはTFAにTMSBr-thioanisoleを添加して最終脱保護反応を行うと収率よく目的物を回収できます。またTMSBr-thioanisole/TFA系では合成途上に副生するmethionine sulfoxide（Met(O)）をMetに還元できることが利点の一つとして挙げられます[13]。

筆者は上述の最終脱保護法の活用によりGRF（growth hormone releasing factor）やCRF（corticotropin releasing factor）等の視床下部ホルモンをはじめとする多数のペプチドホルモンの化学合成を達成することができました（図1）[14]。以上の研究成果は矢島先生のご指導の下，北川教授，小山要博士，故舩越奨博士（京都大学），武山正治博士（大分大学名誉教授），赤路健一教授（京都薬科大学），野水基義教授（東京薬科大学），二木史朗教授（京都大学），林良雄教授（東京薬科大学），大高教授，玉村啓和教授（東京医科歯科大学），渡辺俊博博士，片倉晋一博士，桜井満也博士を初め当時の多くの同僚のご協力の賜物です。これらのペプチドは現在ではFmoc型固相合成法により簡便に合成できると思われますが，液相法により合成した各分子の合成にはそれぞれに思い出深いものがあります。

一方，筆者はTFAを溶媒とするジスルフィド結合形成反応，*S*-保護基の除去反応にも検討を加え，*S*-保護cysteine sulfoxideを用いるジスルフィド架橋反応[15]，$Tl(TFA)_3$を用いるジスルフィド形成反応[16]，silver triflate（AgOTf）を用いる*S*-Acm脱保護反応[17]を開発し，その応用を検討してきました。一例として，AgOTfの反応性を活用して2つのジスルフィド結合を有するケモカインstromal cell-derived factor-1［SDF-1：67残基］の目的の異性体のみを選択的に収率よく合成する方法を確立しました[18]。ジスルフィド結合形成反応の開発では大高教授，玉村教授，小出隆規教授（早稲田大学）と昼夜を問わず議論を重ねながらそれなりの研究成果を挙げることができましたが，筆者自身が目的としていたTFA溶媒中での3つの位置選択的ジスルフィド結合形成を達成することはできませんでした。TFA溶媒にこだわった理由は，保護ペプチドも含めてほぼすべてのペプチド，タンパク質を溶解することのできる優れた溶媒だからですが，水系溶媒とTFAではペプチドのコンフォメーションは大きく異なることを考慮すると無謀な計画であったと思います。ペプチド合成化学を甘く見てはいけないとつくづく感じました。後に赤路先生，木曽先生によってインシュリンの三つの位置選択的ジスルフィド結合形成による全合成が報告された際には深い感銘を受けました。

化学合成により得られた各種のペプチドホルモン，ケモカイン類は，国内外の共同研究者による生化学研究，生理学研究に用いられ，内分泌学・免疫学の研究領域の発展にも貢献することができました。特にSDF-1は組換えDNA法では調製が困難らしく，信頼性の高い合成品としてこの領域の研究者から多くの供与依頼を受けました。

[2] ペプチダーゼ耐性型ペプチドミメティクスの化学合成法の開発と応用

ペプチド結合は，生体機能をつかさどるタンパク質やペプチドの主鎖骨格を形成する最も普遍的な共通構造であり，連続するアミノ酸間の結合としてだけでなく，その水素結合能により二次構造や高次構造の形成に関与しています。一般にタンパク質やペプチドの特徴的な機能を提供する部分構造として多様な官能基を有するアミノ酸側鎖の役割が注目されていますが，実際には特定のペプチド結合が分子認識に直接関与し，重要な役割を果たしているケースも多く存在します。筆者は，このペプチド結合の重要性に着目した各種ペプチドミメティクスの化学合成法の開発とその特性を活用した生理活性ペプチドの構造活性相関研究に検討を加えました。

ペプチドミメティクスの代表的な例として，ペプチド結合の平面性に基づいてペプチド結合の炭素-窒素

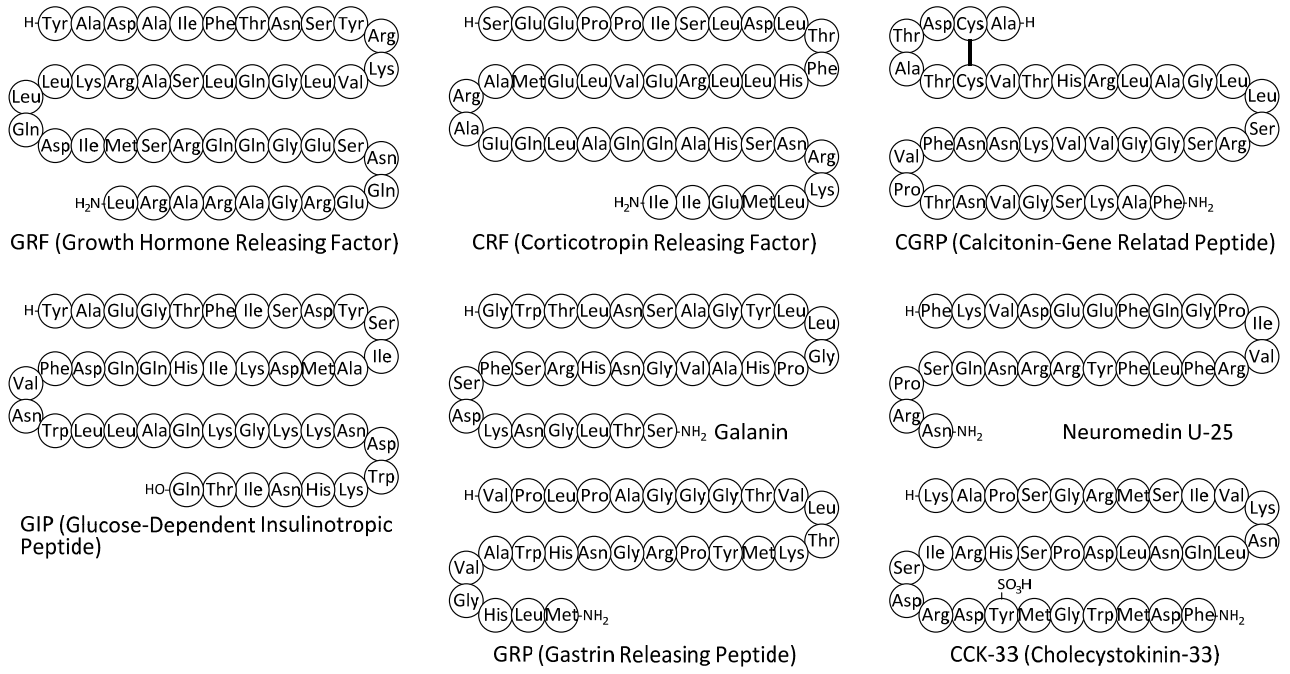


図1　化学合成法を確立した代表的なペプチドホルモン

結合を炭素－炭素二重結合に置換したアルケン型ジペプチドイソスターが挙げられます。本イソスターはペプチド結合におけるトランス配座とシス配座間の相互変換を制限し，置換されたペプチド結合の水素結合を介する分子認識への関与を評価するプローブとしても用いることができます。筆者は，多様なアミノ酸側鎖に対応可能なさまざまなアルケン型ジペプチドイソスターについて，各種遷移金属を利用した立体選択的合成法の開発に取り組みました[19]。アミノ酸をキラルプールとするL-L，L-D 型の*trans* 型ペプチド結合等価体としての（*E*)-アルケン型ジペプチドイソスター（EADI）の立体選択的合成法を図２に示します[20]。

Mts-L-アミノ酸を原料として通常の反応経路でβ-aziridinyl-α,β-enoate（diastereo mixture）を合成し，これをPd(0）で異性化することにより熱力学的に安定な*cis*-（*E*）型のβ-aziridinyl-α,β-enoateに収束させることができます（収率80−90％）[21]。これを鍵中間体として有機銅試薬による*anti*-S_N2'反応に付すことによりL-L 型のEADIが得られます。同じ鍵中間体を$MeSO_3H$でS_N2開環し，有機銅試薬による*anti*-S_N2'反応に付すことによりL-D 型のEADIが得られます。Mts-D-アミノ酸を出発原料にすれば同様にD-D 型およびD-L 型のEADIを取得することができます。二置換アルケン型イソスターは基本的にこの方法で問題なく合成することができますが，多置換アルケン型[22] やフルオロアルケン型[23]，トリフルオロメチルアルケン型[24] のイソスターの合成には他の反応経路を選択する必要があります。また*cis* 型ペプチド結合に対応する（*Z*)-アルケン型イソスターあるいは（*E*)-フルオロアルケン型イソスターの合成にはα,β-unsaturated-δ-lactam 誘導体を原料として有機銅試薬による還元反応を用いてジケトピペラジンミメティクスを合成し，これを加水分解することにより得ることができます。図３にはPhe-Glyアルケンイソスターの合成法を示しますが，有機銅試薬等による還元的アルキル化を利用してα 位に側鎖を導入することも可能です[25]。

合成研究により得られた各種ペプチドミメティクスは，HIVプロテアーゼ阻害剤[26]，インテグリン阻害剤[27]，CXCR4拮抗剤[28]，GPR54作動剤[29] をはじめとする多くのペプチドに組み込み，ペプチダーゼに対する抵抗性を付与した新規分子の創製，および，酵素や受容体との分子認識の解明のための機能分子として利用しました（表１）。

一例としてペプチドミメティクスを導入したGPR54

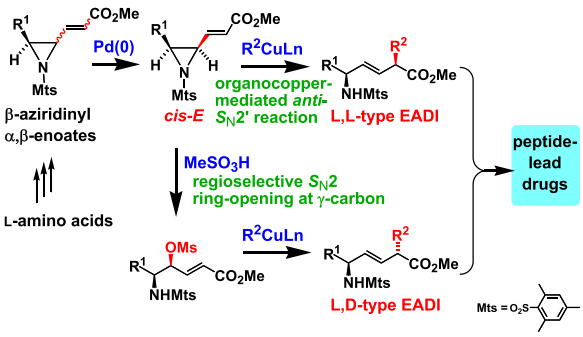


図２　アミノ酸をキラルプールとする（*E*)-アルケンジペプチドイソスター（EADI）の立体選択的合成

選択的アゴニスト創出の例を図４に示します[29]。Gly-Leu 部分にEADIあるいはその誘導体を導入したFTM145およびFTM150bはKisspeptin-10と同程度のアゴニスト活性を示し，血清に対する安定性を大幅に向上することができました。一方ではPhe-Gly 部分にEADIあるいは（*Z*)-フルオロアルケンジペプチドイソスターを導入すると顕著な活性の低下を認めました。これらの結果は，Phe-Gly 間のペプチド結合は活性発現に重要な役割を果たしていること，およびGly-Leu 間のペプチド結合は活性発現に必須ではなくEADIの導入によりマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP8)等によるこの部位での加水分解を顕著に抑制できたことを示唆しています。本研究によってアルケン型ジペプチドイソスターが非水解性ペプチド等価体として有効に活用できることを立証することができましたが，導入部位の精査が必要であることも同時に明らかになりました。

上記の研究は，故井深俊郎先生（京都大学名誉教授）の有機銅試薬による*anti*-S_N2'型反応の詳細な検討をもとにペプチドミメティクスへの応用研究としてスタートしました。また本研究の成果は大高教授，玉村教授，大野浩章准教授（京都大学），大石真也講師（京都大学）はじめ，多くの大学院生（巾下広博士，中井一夫博士，新居田歩博士，片桐文彦博士，佐々木義一博士，鳴海哲夫博士，富田健嗣博士，井貫恵利子博士，小林数也博士，等）のご尽力の賜物です。

[3] 抗ウイルス活性ペプチドの分子設計と生体機能解明研究への応用

(3-1) 抗菌活性ペプチドの構造活性相関研究を端緒とするケモカイン受容体拮抗薬の創製と応用

筆者は，カブトガニの血球成分より単離された抗菌性ペプチドの抗 HIV 活性に着目して構造活性相関研究を展開し，polyphemusin II（18残基）の３つのアミノ酸残基を置換した誘導体 T22が，強力な抗 HIV 活性および優れた選択係数（CC_{50}/EC_{50}）を示すことを明らかにしました[30]。またT22は，マクロファージ指向性 HIV-1の感染には全く効果無く，T 細胞指向性 HIV-1の感染のみを阻害し，SDF-1によって誘起される細胞内 Ca^{2+}濃度を減少させることから，CXCR4受容体拮抗作用により抗 HIV 活性を示すことを明らかにしました[31]。一方，筆者は京大病院の土井隆一郎博士らとの共同研究により，T22が膵臓癌の転移を顕著

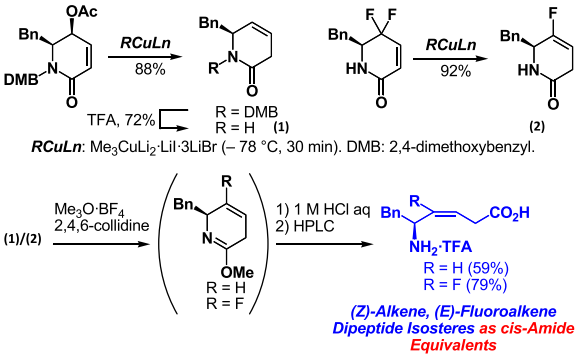


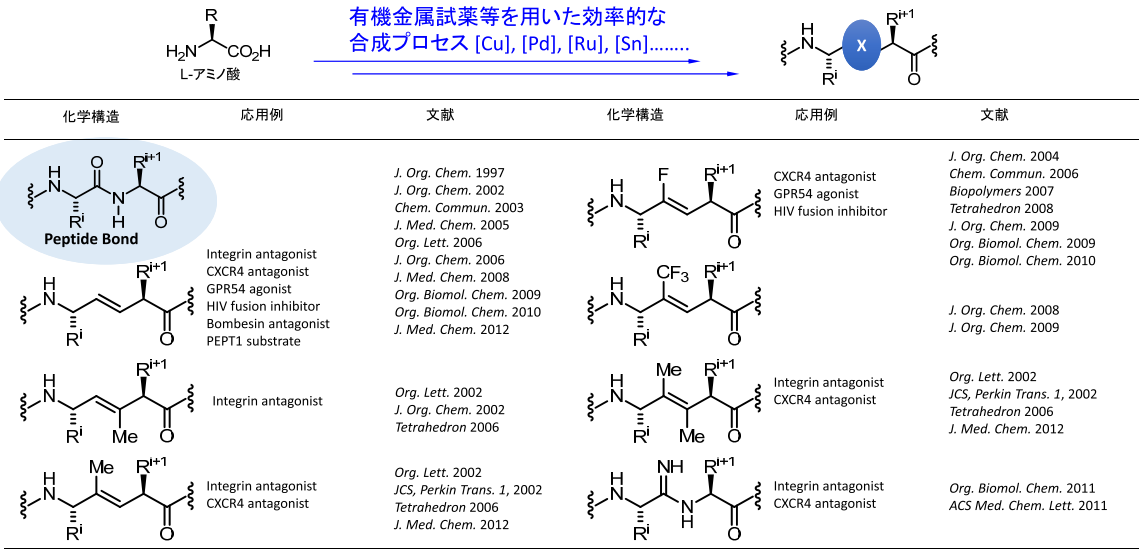
図３　有機銅試薬還元反応を用いるPhe-Gly 型（*Z*)-アルケン，（*E*)-フルオロアルケンジペプチドイソスターの合成例

に抑制すること，および膵臓癌の患者さん由来の組織にCXCR4およびその内因性作動剤であるSDF-1が過剰発現していることを見出しました[32]。この研究は当時あまり注目されませんでしたが，後に乳癌細胞の臓器特異的転移にSDF-1とCXCR4が関与していることが発表され，さらに血液癌，固形癌を問わず多くの癌細胞の転移，増殖にも主要な役割を果たしていることが明らかにされるに至り，CXCR4拮抗剤は新たな創薬標的として注目を集めるようになりました[33]。続いて，筆者は，T22の分子サイズの低減化，アミノ酸残基の最適化，生体内安定性の向上のための構造修飾を行い，T140（14残基）をはじめとする各種誘導体を開発しました（図５）[34]。

特にBKT140は，FDAより希少病治療薬の指定を受け，急性骨髄性白血病（Acute Myeloid Leukemia; AML）治療薬としての臨床試験が現在進められています。

さらに，筆者は，T140の抗HIV活性に重要な役割を果たしているアミノ酸残基（Arg x 2, Tyr, Nal＝2-naphthylalanine）を同定し，この知見をもとにさらなる分子サイズの低減化を図りました。筆者の独自のアイデアにより設計した環状ペンタペプチドライブラリーの効率的な運用により，T140とほぼ同等の生物活性を示すFC131およびFC122を同定しました（図６）[35]。さらに，各種多置換アルケンイソスターを導入したFC131誘導体の活性評価とCXCR4結晶構造との相互作用解析から，FC131およびFC122の活性発現機構の解析に置換アルケンイソスターを有効に活用できることを明らかにしました[28]。また，FC131のスキャフォールドを基に塩基性を示すアミジン型ペプチドイ

表１　各種ペプチド結合ミメティクスの効率的化学合成法の確立と応用例



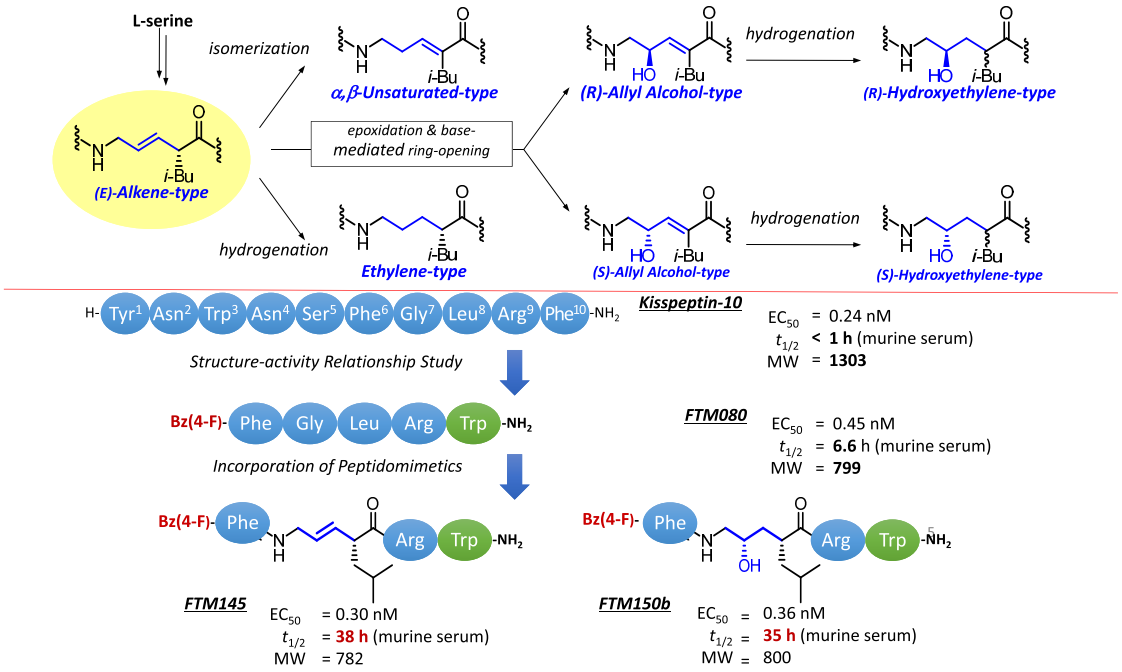


図４　ペプチドミメティクスの多様性指向型合成とGPR54受容体アゴニストの創製

ソスターを導入した各種誘導体を合成しFC131よりも優れたCXCR4アンタゴニスト活性，抗 HIV 活性，水溶性を示すFCA004等の数種の誘導体を見出すことに成功しました[36]。

筆者はT140やSDF-1を母核とする蛍光プローブや放射性分子プローブの開発にも取り組み，各種プローブをCXCR4拮抗剤の生物有機化学的アプローチによる作用機序解析に活用し，T140等のCXCR4拮抗剤が受容体の内在化を伴って生物活性を発現していることを明らかにしました（図７）[37]。

筆者が創製したCXCR4拮抗剤は，抗 HIV 活性ペプチドとしてだけでなく，多くの共同研究機関においてCXCL12-CXCR4系の生理的役割や腫瘍転移・増殖との関連を解明するさまざまな研究に利用され，多数の成果をあげることができました。

これらの研究成果は玉村教授，大石講師のイニシアチブのもとに展開されましたが，新居田博士，上田聡

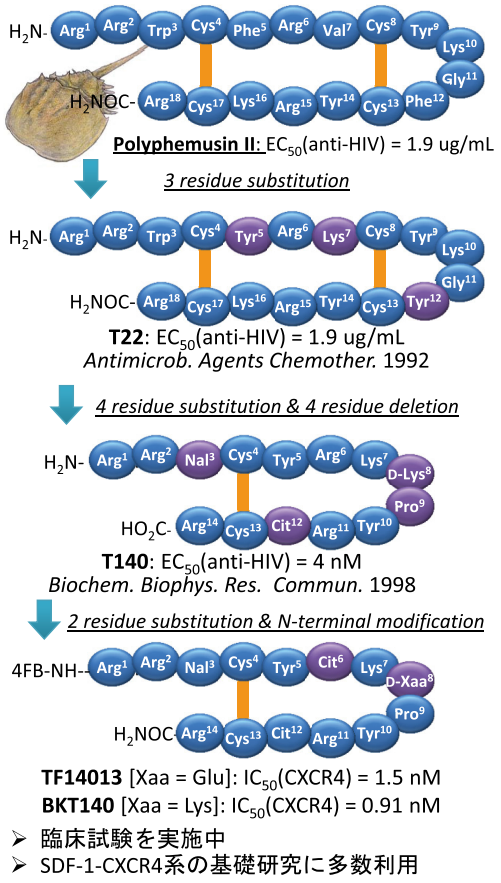


図５　兜蟹ペプチドからのCXCR4受容体拮抗剤の創製

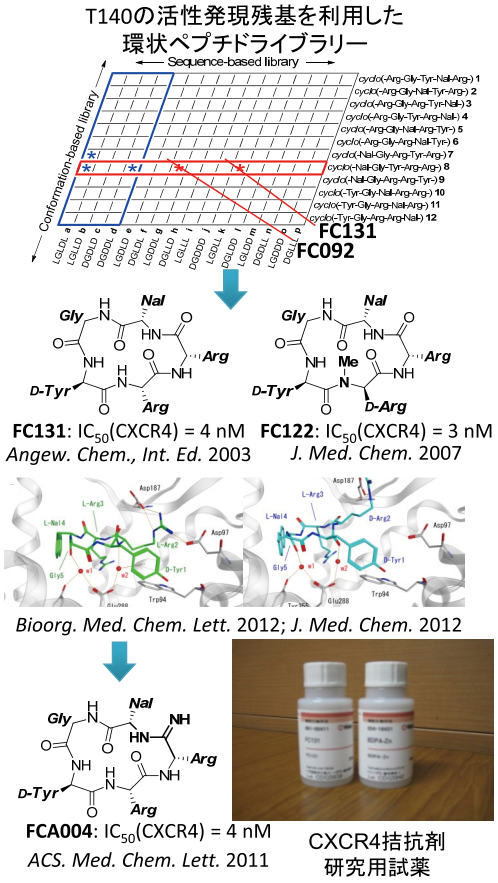
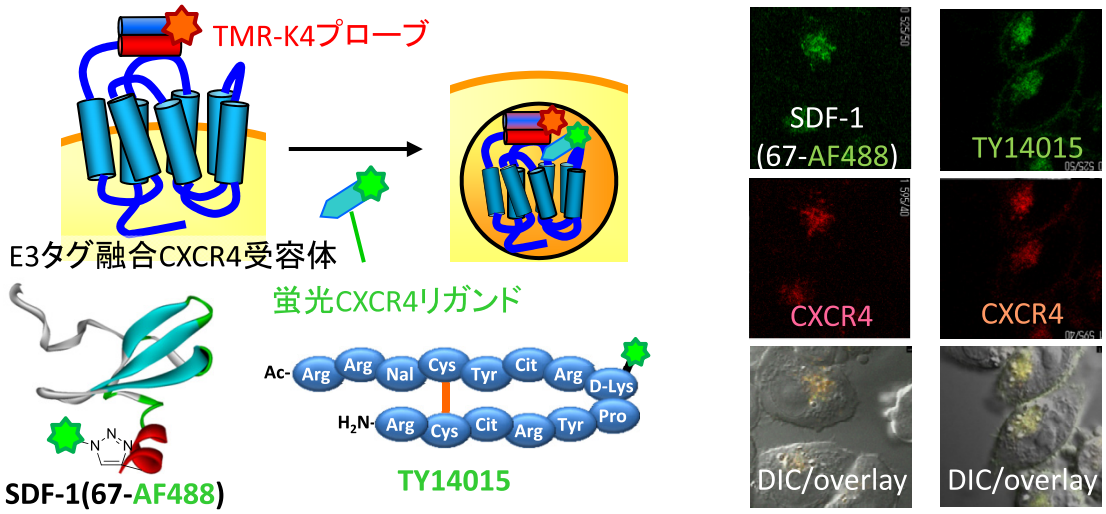
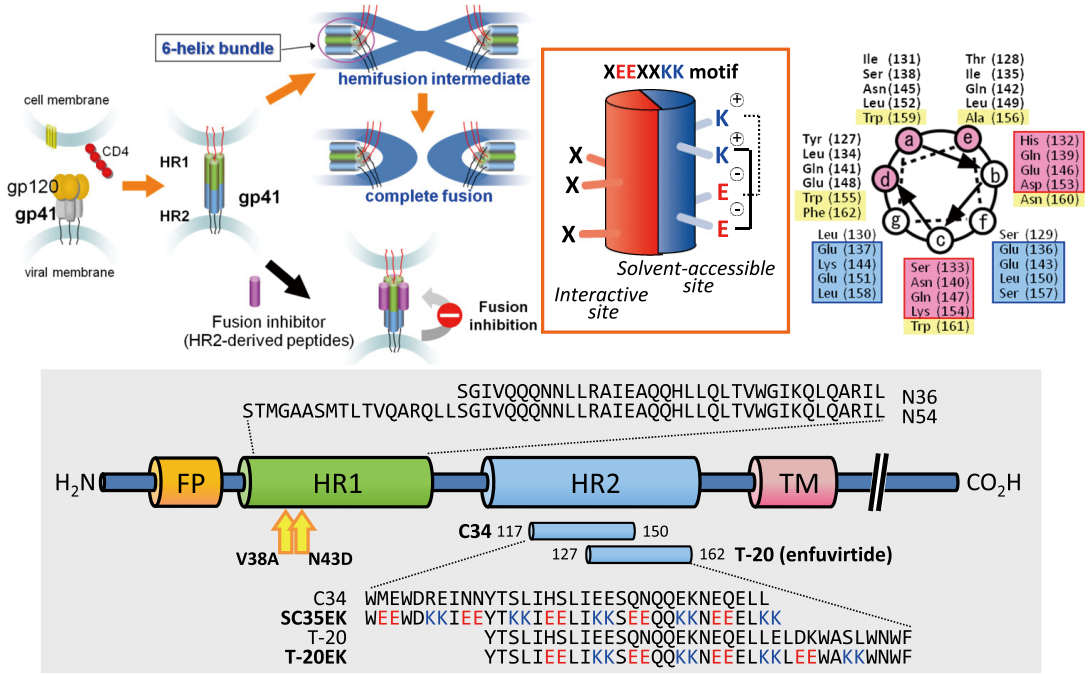


図６　新概念によるCXCR4拮抗剤の低分子化



Chembiochem, 2008; *Future Med. Chem.* 2012; *Bioconjug. Chem.* 2012

図７　CXCR4受容体蛍光プローブの開発とT140蛍光プローブによる受容体内在化の同定



Angew. Chem. Int. Ed. 2002; *J. Med. Chem.* 2008

図８　活性と水溶性の向上を目指した抗 HIV 活性膜融合阻害剤の分子設計

博士，鳴海博士，増田亮博士，井貫博士，小林博士はじめ多くの大学院生のご協力のもとに成果を挙げることができました。T22からT140への低分子化では当時生化学工業（株）に勤務しておられた脇道典博士（九州大学）のご協力を得ることができました。T140-CXCR4複合体の内在化に関する研究においては松崎勝巳教授（京都大学），矢野義明助教（京都大学）のご指導を賜りました。CXCR4拮抗剤の抗ウイルス活性評価に関しましては山本直樹教授（シンガポール大学），中島秀喜教授（聖マリアンナ医科大学）に大変お世話になりました。

（3-2）新しい分子設計概念に基づく抗ウイルス活性ペプチドの創製と応用

近年，重症急性呼吸器症候群（SARS）や新型インフルエンザのような短期間で急速な感染の広がりを見せる感染症に対する創薬研究のあり方が注目されています。このような感染症に対する治療薬には，高い治療効果や安全性だけでなく迅速な開発・供給が必要とされます。筆者は，エンベロープタンパク質を持つウイルスの塩基配列解析から容易に入手可能なアミノ酸配列情報を利用することで，ウイルス膜―宿主細胞膜の融合プロセスを阻害する膜融合阻害剤の新しい分子設計技術を開発しました（図８）。I 型膜融合機構を利用するHIV-1と宿主細胞の膜融合においてはHIVの表面蛋白 gp120と宿主細胞のCD4およびCXCR4が相互作用することによりtriple helix 構造を有するgp41のN- 末端の先端部分が宿主細胞膜に挿入されます。その後 gp41のN- 末端側ペプチド（HR1領域）をC- 末端側ペプチド（HR2領域）が取り囲むようにsix helical bundle 構造が形成され，それが原動力となってHIVと宿主細胞の膜融合が惹起され，感染が成立します。従来 HR2領域に対応するC34やT20（fuzeon, enfuvirtide）がこの膜融合過程を阻害し抗 HIV 活性を発現することが知られていました。

筆者らは，HIV-1のエンベロープタンパク質 gp41のコイルドコイル複合体構造に基づいて，膜融合阻害剤のαヘリックス構造の安定性を高めることで，強力な抗 HIV 活性を示す修飾ペプチドSC34EK，SC35EKおよびT-20EKを見出しました[38]。これらは，膜融合阻害剤として報告されているC34およびT-20のウイルスgp41との相互作用面のアミノ酸残基 Xを保存する一方で，それ以外の残基をGlu（E）もしくはLys（K）に置換したXEEXXKKモチーフの繰り返し配列を有するペプチドで，水性溶液への極めて高い溶解性を示すとともに高いα-ヘリックス形成能を示します。また，これらのペプチドは，gp41 HR1配列中に薬剤耐性変異を有するウイルス株に対しても強力な抗 HIV 活性を示しました。さらに，C34やT-20等のHIV 膜融合阻害剤の薬剤耐性株の塩基配列情報解析とX 線結晶解析をもとに相互作用部位のアミノ酸を最適化した誘導体（C34/S138A，T-20/S138A）は，野生株に対する高活性化が認められるとともにHIV 膜融合阻害剤の耐性株に対しても強い抗ウイルス活性を示すことを明らかにしました（図９）[39]。この過程においてHis tag-HRIペプチドを担持できるNi-ビーズアフィニティークロマトグラフィーを活用することにより特定の部位（gp41/138位）に19種類のアミノ酸を導入したペプチドライブラリー（SC35EK/S138X）の中からSC35EK/S138A 等の高活性 HIV 膜融合阻害剤を効率的に探索できる手法を開発しました（図10）[40]。この手法はHIV 膜融合阻害剤耐性株が新たに発現した際にそれを克服できる新しい方法論を提案するだけでなく，I 型膜融合機構を介する各種のウイルスに対して効率的に膜融合阻害剤を探索する手法として活用できると思われます。

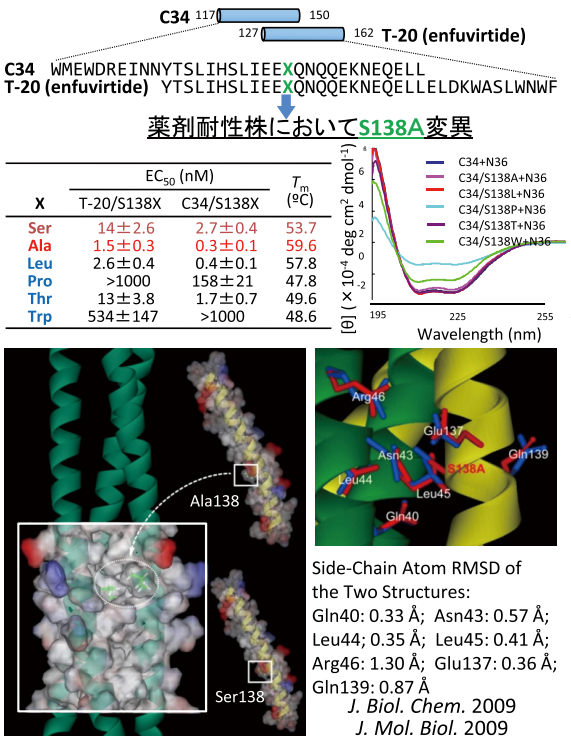


図９　ウイルスゲノム情報に基づく薬剤耐性株に有効な抗HIV剤の設計

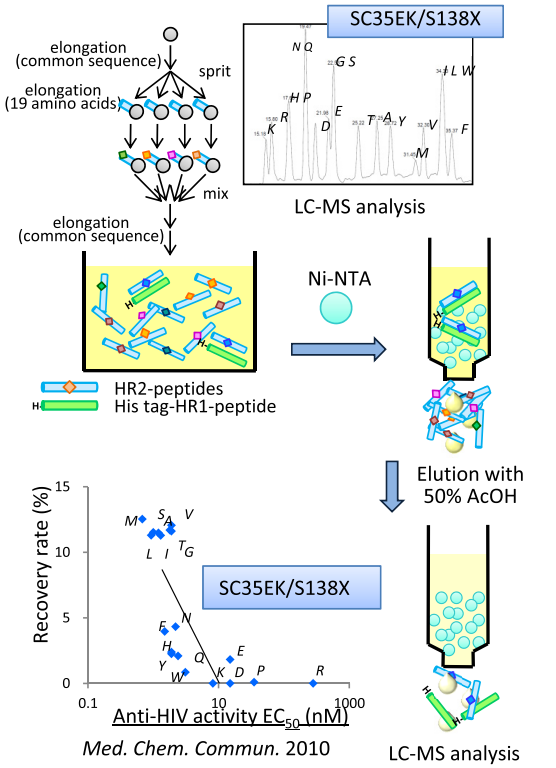


図10　ペプチドライブラリーからの抗HIV剤の効率的探索手法の開発

筆者は上記のウイルス膜融合阻害剤の分子設計概念が，HIV以外にも，SARSコロナウイルス，ネコ免疫不全ウイルス（FIV: feline immunodeficiency virus）等にも応用可能であることも明らかにしました。SARSコロナウイルスに関しては宿主細胞膜に対して直接膜融合し感染する経路（直接経路）とエンドサイトーシスを経由する感染経路（エンドサイトーシス経路）が知られていますが，SARSコロナウイルスに対してX線解析構造を基に分子設計した膜融合阻害ペプチドは直接経路のみを阻害し，エンドサイトーシス経路は阻害しないことが明らかになりました[41]。エボラ出血熱ウイルスの感染においても同様に二つの感染経路が示唆されており，エンドサイトーシス経路を効果的に遮断する手法の開発が今後の課題です。

FIVは，日本において野生のネコの1/3が感染しているという統計結果が出ており，飼いネコにも感染が広がっていると言われています。また，ツシマヤマネコはFIVで絶滅の危機に瀕しているとも言われています。FIVはCXCR4を受容体としてHIVと似た機構で感染しますが，現時点ではネコからヒトの感染は報告例がありません。しかしながら，変異により人に感染するFIVが将来出現する可能性は否定できません。XEEXXKKモチーフを用いる筆者らのFIV膜融合阻害剤は細胞レベルで顕著な感染抑制効果を示しました[42]。

ウイルスのゲノム情報（塩基配列・変異情報）と構造データベースを化合物の分子設計に有効活用する本手法は，今後その幅広い応用が期待されます。

ウイルス膜融合阻害剤の研究は，当初大高教授のイニシアチブで開始され，その後大石講師に引き継がれて大きく展開されました。抗ウイルス活性評価に関しては松岡雅雄教授（京都大学）の研究グループ，X線結晶解析に関しては小林裕次教授（大阪薬科大学），加藤博章教授（京都大学）の研究グループに大変お世話になりました。また本研究は西川裕輝博士，渡部毅博士，梶原一美博士，鳴海博士を初め多くの大学院生のご協力の賜物です。

おわりに

ペプチドの合成研究から始まって，ペプチド・タンパク質化学を基盤とする創薬研究について概説しましたが，筆者はいずれの研究においても様々な研究領域を専門とされている研究者との協働研究を長く継続することが重要だと思っています。優秀な研究者や同僚との出会いはもっと大切です。筆者にとってはカブトガニとの出会いもCXCR4拮抗剤を世界に先駆けて見出す端緒となりました。Visiting associateとして米国NIH/FDA留学中はマラリアに対するペプチドワクチンの研究とカブトガニの血液凝固を阻害するタンパク質成分のクローニング研究をテーマとしていました。研究はさておき，１週間に１回６，７匹のカブトガニに餌をやる仕事は大変苦痛でした。“生きた化石”と言われるカブトガニは餌（主としてホタテガイの貝柱）を常識では考えられない極めてゆっくりしたスピードで半日がかりで食べます。餌をやりながら「私はいったい何をしに米国に来たのだろうか？」と考えさせられる日もありました。帰国直後，驚いたことに科研費の班会議で隣の席に座られた岩永貞明先生（九州大学名誉教授）がカブトガニの血液凝固阻害ペプチド，tachyplesin，polyphemusinの単

離構造決定について発表されました。同時にこれらのペプチドの抗菌活性が高いことも報告されましたが，丹羽允先生（大阪市立大大学名誉教授）からの情報として弱いながら抗HIV活性を有することも教えていただきました。カブトガニに餌をやりながら考えていた“カブトガニは哺乳類のような高度な免疫システムを持たず先天的免疫不全動物であるので，後天的免疫不全ウイルス（HIV）に有効な物質を持っているに違いない”という極めて非科学的な考えが現実的なものとなり，polyphemusin誘導体の抗HIV活性に対する構造活性相関研究に取り組むきっかけになりました。幸いなことにpolyphemusin IIの３つのアミノ酸置換でnMオーダーの強力な抗HIV活性を持つT22を見出すことができました。しかしながら作用機序が全く分からず，長年苦労しました。ターゲットが明確でない化合物の構造活性相関研究はサイエンスとして意味がないのではないかとも考えました。そうこうしているうちに，1996年の暮れ，当時NIH/NCIにおられた満屋裕明教授（熊本大学）から国際電話で朗報が入りました。HIV-1の第二受容体が同定され，NCIで抗HIV活性化合物ライブラリーをスクリーニングしたところT22が最初にヒットしたという内容でした。漸くT22のターゲットがHIV第二受容体の一つ，CXCR4ケモカイン受容体，であることが長澤丘司教授（京都大学）らのご協力を得て明確になり，研究に拍車がかかりました。その当時CXCR4の内因性アゴニストがSDF-1であることは長澤先生らの研究ですでに明らかになっていました。偶々寝転がりながら科学雑誌をめくっていると，癌細胞の浸潤転移に間質細胞（stromal cell）からの誘因物質（後にSDF-1: stromal cell-derived factor-1であることが判明）らしきものが関与しているという記事に出くわしました。“エイズに効く物質は癌にも必ず効く”という極めて非科学的な妄想が再び脳裏をよぎりました。早速，当時京大病院の第一外科におられた細谷亮博士に連絡をとり，土井隆一郎博士に膵臓癌の実験株でT22の効果を評価してもらうことになりました。これが上述のように世界に先駆けてSDF/CXCR4が癌の転移に関与することを見出すきっかけになりました。

“袖振り合うも他生の縁”と申しますが，これまでの研究生活を振り返って，人と人の出会いはつくづく大切なものだと思います。大学の研究は０から１を作るもの，企業の研究は１を10にし100にするものと言われることがあります。非科学的なひらめきも大切にしてください。筆者が大発見をしたとは言いませんが，後から科学的な説明がついてきて，大きな発見に繋がることもしばしばあります。研究の成果がなかなか出ない時も，いつか必ず日の目を見ると信じて日々努力してください。

筆者の拙文が日本ペプチド学会の若手の研究者の皆様のご研究に少しでも参考になれば幸いです。

References

1）Yajima, H., *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 107-108 (1974).

2）Irie, H., *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 922-923 (1976); Irie, H., *et al. Chem. Pharm. Bull.* **25**, 2929-2934 (1977).

3）Yajima, H., *et al. Int. J. Peptide Protein Res.* **14**, 169-176 (1979).

4）Yajima, H. & Fujii, N. *The Peptides, Analysis, Synthesis, Giology,* ed. by Gross, E.; Meienhofer, J. Acaemic Press, New York, **5**, 66-109 (1983).

5）Yajima, H. & Fujii, N., *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5867-5871 (1981).

6）Inui, T., *et al. J. Pept. Sci.* **2**, 28-39 (1996).

7）Inui, T., *et al. J. Peptide Res.* **55**, 384-397 (2000).

8）Dawson, P.E. & Kent, S.B.H., *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 923-960 (2000).

9）相本三郎，*Peptide Newsletter Japan* No.67，2-5（2008）.

10）Kawakami, T. & Aimoto, S., *Tetrahedron* **65**, 3871-3877 (2009).

11）Sato, K., *et al. Angew. Chem. Int Ed.* **52**, 7855-7859 (2003).

12）Fujii, N., *et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 274-275 (1987); Yajima, H., *et al. Tetrahedron* **44**, 805-819 (1988); 大高　章，藤井信孝，有機合成化学協会誌 **48**，1044-1045（1990）.

13）Fujii, N., *et al. Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3880-3883 (1987).

14）Yajima, H., *et al. Chem. Pharm. Bull.* **31**, 1800-1802 (1983); Akaji, K., *et al. Chem. Pharm. Bull,* **35**, 3859-3865 (1987); Fujii, N., *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 602-603 (1985); Fujii, N., *et al. Chem. Pharm. Bull.* **34**, 2397-2410 (1986); Yajima, H., *et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 877-878 (1985); Fujii, N., *et al. Chem. Pharm. Bull.* **35**, 1076-1084 (1987); Akaji, K., *et al. Int. J. Pep. Protein Res.* **18**, 180-194 (1981); Fujii, N., *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 324-325 (1988).

15）Fujii, N., *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1676-1678 (1987).

16）Fujii, N., *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 163-164 (1987); 大高　章，藤井信孝，有機合成化学協会誌 **48**，658-671（1990）.

17）Fujii, N., *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 283-284 (1989).

18）Tamamura, H., *et al. J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 151-152 (1998).

19）大石真也，鳴海哲夫，大野浩章，大高　章，藤井信孝，有機合成化学協会誌 **66**，846-857（2008）.

20）Tamamura, H., *et al. Chem. Commun.* 2327-2328 (1997); Tamamura, H., *et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans I.* 2983-2996 (1999).

21）Ibuka, T., *et al. Tetrahedron Lett.* **37**, 2849-2852 (1996); Ibuka, T., *et al. J. Org. Chem.* **62**, 2982-2991 (1997).

22）Oishi, S., *et al. Org. Lett.* **4**, 1051-1054 (2002); Oishi, S., *et al. J. Chem. Soc. Perkin Trans 1.* 1786-1793 (2002); Otaka, A., *et al. J. Org. Chem.* **67**, 6152-6161 (2002); Sasaki, Y., *et al. Tetrahedron Lett.* **48**, 3221-3224 (2007); Sasaki, Y., *et al. J. Org. Chem.* **71**, 4969-4979 (2006).

23）Otaka, A., *et al. Tetrahedron Lett.* **42**. 285-287 (2001); Otaka, A., *et al. Tetrahedron Lett.* **42**, 5443-5446 (2001); Otaka, A., *et al. J. Org. Chem.* **69**, 1634-1645 (2004); Narumi, T., *et al. Chem. Commun.* 4720-4722 (2006); Narumi, T., *et al. Org. Lett.* **9**, 3465-3468 (2007); Narumi, T., *et al. Tetrahedron* **64**, 4332-4346 (2008).

24）Kobayashi, K., *et al. J. Org. Chem.* **74**, 4626-4629 (2009); Inokuchi, E., *et al. J. Org. Chem.* **73**, 3942-3945 (2008).
25）Niida, A., *et al. Org. Lett.* **8**, 613-616 (2006); Niida, A., *et al. J. Org. Chem.* **71**, 4118-4129 (2006); Niida, A., *et al. J. Org. Chem.* **71**, 3942-3951 (2006); Sasaki, Y., *et al. J. Org. Chem.* **71**, 4969-4979 (2006).
26）Tamamura, H., *et al. J. Med. Chem.* **46**, 1764-1768 (2003).
27）Oishi, S., *et al. J. Org. Chem.* **67**, 6162-6173 (2002); Oishi, S., *et al. Tetrahedron* **62**, 1416-1424 (2006).
28）小林数也，*Peptide Newsletter Japan* No.89，6-10 (2013): Kobayashi, K., *et al. J. Med. Chem.* **55**, 2746-2757 (2012).
29）Tomita, K., *et al. J. Med. Chem.* **51**, 7645-7649 (2008).
30）Tamamura, H., *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 1729-1735 (1994).
31）Murakami, T., *et al. J. Exp. Med.* **186**, 1389-1393 (1997); Murakami, T., *et al. J. Virol.* **73**, 7489-7496 (1999).
32）Koshiba,T., *et al. Clin. Cancer Res.* **6**, 3530-3535 (2000); Mori, T., *et al. Mol. Cancer Ther.* **3**, 29-37 (2004).
33）Oishi, S. & Fujii, N., *Org. Biomol. Chem.* **10**, 5720-5731 (2012).
34）Tamamura, H., *et al. Org. Biomol. Chem.* **1**, 3656-3662 (2003).
35）Fujii, N., *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 3251-3253 (2003); Ueda, S., *et al. J. Med. Chem.* **50**, 192-198 (2007).
36）Inokuchi, E., *et al. ACS Med. Chem. Lett.* **2**, 477-480 (2011).
37）Oishi, S., *et al. ChemBioChem* **9**, 1154-1158 (2008); Masuda, R., *et al. Bioorg. Med. Chem.* **19**, 3216-3220 (2011); Masuda, R., *et al. Future Med. Chem.* **4**, 837-844 (2012); Masuda, R., *et al. Bioconjug. Chem.* **23**, 1259-1265 (2012).
38）Otaka, A., *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**, 2937-2940 (2002); Oishi, S., *et al. J. Med. Chem.* **51**, 388-391 (2008).
39）Izumi, K., *et al. J. Biol. Chem.* **284**, 4914-4920 (2009); Shimura, K., *et al. J. Biol. Chem.* **285**, 39471-39480 (2010); Watabe, T., *et al. J. Mol. Biol.* **392**, 657-665 (2009).
40）Oishi, S., *et al. Med. Chem. Comm.* **1**, 276-281 (2010).
41）Ujike, M., *et al. J. Virol.* **82**, 588-592 (2008).
42）Oishi, S., *et al. Bioorg. Med. Chem.* **17**, 4916-4920 (2009); Mizukoshi, F., *et al. J. Vet. Med. Sci.* **71**, 121-124 (2009).

ふじい　のぶたか
京都大学大学院薬学研究科医薬創成情報科学専攻
薬品有機製造学 /ケモゲノミクス分野
nfujii@pharm.kyoto-u.ac.jp

平成25年度日本ペプチド学会奨励賞を受賞して

堤　　浩

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，非常に嬉しく思っております。会長の下東先生をはじめ，理事，監事，評議員，選考委員の諸先生方に本稿の紙面をお借りして心より感謝申し上げます。私は東京工業大学大学院生命理工学研究科で学位を取得後，京都大学の浜地格教授の研究室で博士研究員，東京医科歯科大学の玉村啓和教授の研究室で助教としてさまざまな研究に従事することができ，現在は東京工業大学の三原久和教授の研究室で助教として新たな研究に着手する機会をいただいております。本稿では受賞の対象となりました「化学修飾法を駆使した機能性ペプチド・タンパク質分子の創製」について紹介させていただきます。

1．はじめに

タンパク質やペプチドは非常に優れた機能分子ですが，蛍光色素などの人工の機能単位を修飾することにより，蛍光性バイオセンサーやプローブ分子としてさらなる高機能化が期待できます。そのためには，タンパク質やペプチドが本来有する機能を損なうことがない部位に対して特異的かつ温和な条件で機能単位を修飾する手法が必要とされています。ここで重要なのは，修飾反応はタンパク質やペプチドがその機能を発揮する水中で適用可能なものでなければならない，ということです。これまでに古典的なチオール選択的修飾反応に加えていくつかの有用な修飾反応[1]が見出されていますが，私が部位特異的化学修飾によるタンパク質の機能化の研究に携わった当初は，水中で適用可能な修飾反応がまだ限られていました。そこで，水中かつ温和な条件下でタンパク質に適用可能な修飾反応を開発し，それを用いてタンパク質の人工機能化を行うことにしました。

2．タンパク質表面の部位特異的修飾法の開発と機能性タンパク質の創製

Click反応に代表されるBioorthogonal反応は，タンパク質修飾反応のみならずケミカルバイオロジー研究において幅広く利用されていますが，利用できる反応は限られていました。そこで，私は新たなBioorthogonal反応として鈴木カップリング反応をタンパク質修飾に適用すべく研究を行いました[2]。リン酸化ペプチドを認識するタンパク質ドメインであるWWドメインをモデルタンパク質として，鈴木カップリングの基質となる4-iodophenylalanineを導入したWWドメインを調製し，塩化パラジウム存在下で種々のボロン酸誘導体を反応させる条件を検討しました（図１）。その結果，温和な条件下，高収率でリン酸化ペプチドへの結合活性を損なうことなく修飾WWドメインを得ることができ，鈴木カップリング反応がタンパク質修飾反応に適応可能であることを明らかにしました。また，蛍光色素を導入したWWドメインはリ

ン酸化ペプチドに対する蛍光性バイオセンサーとして機能し，鈴木カップリング反応を用いた化学修飾によりタンパク質ドメインを機能化できることを示しました。

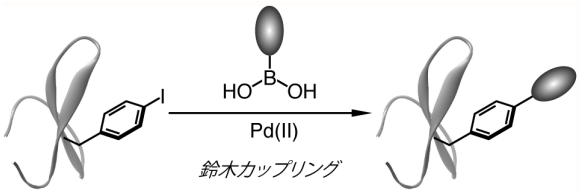


図１　鈴木カップリング反応によるタンパク質の化学修飾

鈴木カップリング反応とは異なるアプローチとして，アフィニティラベル化後修飾法（post-affinity labeling modification: P-ALM 法）を用いて，天然に存在するタンパク質を蛍光性バイオセンサーへ人工機能化する研究にも携わりました[3]。P-ALM 法では，標的タンパク質に対するリガンドに反応部位を組み込んだラベル化剤を用い，タンパク質－リガンド相互作用を利用して活性中心近傍の反応性アミノ酸側鎖とラベル化剤の反応部位を近接させることにより部位特異的に共有結合を形成させます（図２，step 1）。その後，ヒドラゾン/オキシム交換反応によりラベル化剤の除去と蛍光色素などの機能分子の導入を同時に行って蛍光修飾タンパク質を獲得します（step 2）。ヒトの炭酸脱水和酵素（human carbonic anhydrase II: hCAII）をモデルタンパク質として研究を行った結果，hCAII が本来有している触媒活性を保持したまま活性中心近傍のHis3/His4に高選択的に蛍光色素を導入した蛍光性 hCAIIを得ることができました。この蛍光性 hCAII は，hCAIIに対する阻害剤の結合を蛍光強度・波長の変化として読み出すことが可能な蛍光性バイオセンサーとして機能することがわかりました。

３．タンパク質イメージングのための新規ペプチドタグ－プローブペアの開発

細胞内外で起こるさまざまなイベントを解析する上で，タンパク質の発現動態や機能をリアルタイムに観測することは重要です。化学修飾により機能化した設計ペプチドは，タンパク質のリアルタイム蛍光イメージングを行う上で非常に有用な分子ツールとなる可能性を秘めています。そこで私は，標的タンパク質を特異的に標識するためのタグペプチドと，タグペプチド特異的に結合する蛍光プローブペプチドの開発を行いました。ロイシンジッパーと呼ばれる複数のペプチドの相互作用により形成される特異な高次構造に着目し，プローブペプチドとタグペプチドが特異的に結合するようにタグ－プローブペアを設計しました（ZIPタグ－プローブ）（図3a）。ここで，プローブペプチドに親水 / 疎水の環境に応答して蛍光特性が大きく変化する蛍光色素を導入し，プローブペプチドがタグと結合する時にロイシンジッパー構造の内部疎水領域に蛍光色素が配置されるように設計することにより，タグ－プローブ複合体のみをリアルタイムに蛍光検出できるようになります。例えば，環境応答性色素の一つである4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole（NBD）を導入したプローブペプチドは，黄色から緑色への蛍光色の変化と20倍程度の蛍光強度

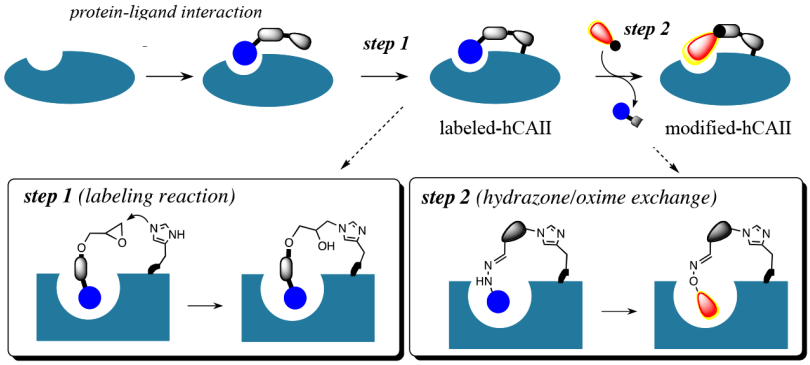


図２　P-ALM 法を用いたタンパク質の蛍光機能化

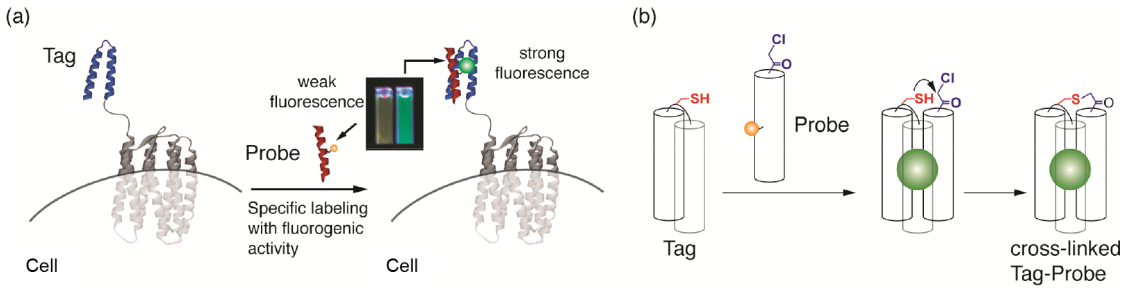


図３　(a) ZIPタグ－プローブを用いた細胞膜タンパク質の蛍光イメージング．(b) 近接効果を利用したZIPタグ－プローブの選択的共有結合形成

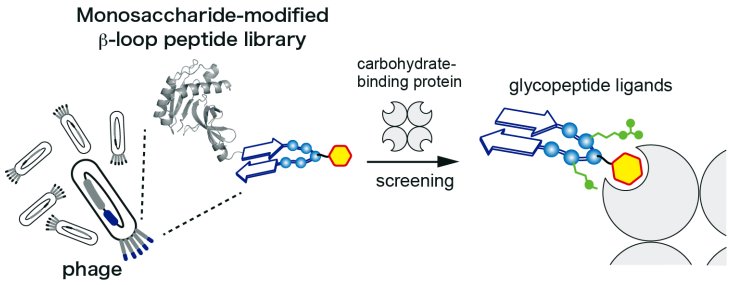


図４　単糖修飾ペプチドを提示したファージライブラリを用いた糖結合タンパク質に対するリガンドの探索

の増大を伴い，タグペプチドと非常に強く結合する（K_d ＝17.5 nM）ことがわかりました。このNBD 導入プローブペプチドを用いて生細胞の表層に発現させたタグペプチド融合タンパク質の選択的蛍光イメージングに成功しました（図3a）[4]。また，蛍光色素として7-diethylaminocoumarin-3-carboxyamideを用い，タグペプチドの構造を最適化することにより50倍以上の蛍光増大を示す青色蛍光のZIPタグ－プローブペアを得ることもできました[5]。さらにプローブペプチドにチオール基と選択的に反応するクロロアセチル基を導入し，システインを有するタグペプチドと相互作用させることで，近接効果を利用してタグ－プローブ複合体の架橋形成反応を誘起することに成功し（図3b），共有結合を介してタグ融合タンパク質を標識可能なプローブの開発へと研究を発展させることができました[6]。

4．化学修飾ファージライブラリを利用した高機能性ペプチドリガンドの探索

ファージディスプレイ法はランダムな配列をもったペプチドライブラリから標的に特異的なリガンドを獲得することのできる有用な手法です。しかしながら，ライブラリを構成する要素として天然のアミノ酸しか利用できないという制限がありました。化学修飾によりファージライブラリに任意の機能単位を選択的に導入できれば，ライブラリの多様性を拡張し，高機能なペプチドリガンドの探索が可能になります。これまでに，私はウイルス感染などにおいて重要な役割を担っている糖結合タンパク質を標的とすべく，糖修飾ペプチドを提示したファージライブラリを構築し，糖結合タンパク質に特異的なペプチドリガンドを獲得することに成功しています（図４）[7]。また，蛍光修飾ファージライブラリからの蛍光ペプチドリガンドの探索も進めています。

5．おわりに

本稿では私が携わってきた化学修飾法を利用したタンパク質・ペプチドの機能化研究について概説しました。本稿で述べた修飾反応以外にも有用な水中有機反応が見出されており，タンパク質やペプチドを機能化するための反応のレパートリーが拡充されています。私は今後，新たな化学修飾反応を模索しつつ，これまでに見出した修飾反応を積極的に利用して高機能性のペプチド・タンパク質分子の創製を行っていきたいと考えています。

最後になりましたが，当該研究は，京都大学大学院工学研究科の浜地格先生，東京医科歯科大学生体材料工学研究所の玉村啓和先生，東京工業大学大学院生命理工学研究科の三原久和先生の御指導と御協力のお陰で遂行することができました。本紙面をお借りして，深く感謝申し上げます。

1）Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 4088–4106.
2）A. Ojida, H. Tsutsumi, N. Kasagi, I. Hamachi, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 3301–3305.
3）Y. Takaoka, H. Tsutsumi, N. Kasagi, E. Nakata, I. Hamachi, **2006**, *128*, 3273–3280.
4）H. Tsutsumi, W. Nomura, S. Abe, T. Mino, A. Masuda, N. Ohashi, T. Tanaka, K. Ohba, N. Yamamoto, K. Akiyoshi, H. Tamamura, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 9164–9166.
5）H. Tsutsumi, S. Abe, T. Mino, W. Nomura, H. Tamamura, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 691–694.
6）W. Nomura, T. Mino, T. Narumi, N. Ohashi, A. Masuda, C. Hashimoto, H. Tsutsumi, H. Tamamura, *Biopolymers*, **2010**, *94*, 843–852.
7）K. Arai, H. Tsutsumi, H. Mihara, Bioorg. *Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 4940–4943.

つつみ　ひろし
東京工業大学大学院生命理工学研究科
生物プロセス専攻生物有機工学分野
htsutsum@bio.titech.ac.jp

平成25年度ペプチド学会奨励賞を受賞して

野村　　渉

この度は，日本ペプチド学会奨励賞という名誉ある賞をいただき，大変光栄に存じます。学会長の下東康幸先生をはじめ，選考委員ならびに関連の諸先生に心より御礼申し上げます。本稿では受賞研究である「ペプチド性化合物の分子間相互作用を基盤としたプローブおよび阻害

剤の創製」について概説させていただきます。

はじめに

タンパク質を中心とする生体分子は細胞の働きを主とする生命活動の維持に大きく貢献しています。近年，タンパク質の機能解析を中心として基礎的な分子生物学研究から創薬への応用を志向した研究に至るまで，随所でペプチドや低分子化合物を利用する方法論，化学的思考，化学合成技術が積極的に取り入れられ始めています。生命の営みの根源は分子間の相互作用であり，また医薬品の主な作用機構も低分子化合物～ペプチド／タンパク質と標的となる生体高分子の相互作用です。著者は，生体分子，あるいは生体分子と相互作用するペプチド，あるいは化合物を基盤として，生命現象の解明や創薬標的分子の開拓につながる生体機能性分子の開発を行ってきました。標的とする分子としてヒト免疫不全ウイルス（HIV）の感染に深く関与する宿主細胞側の受容体 CXCR4，ウイルス側のタンパク質 gp41に関する研究を以下に紹介します。

7回膜貫通型Gタンパク質共役受容体（G protein-coupled receptor: GPCR）CXCR4のイメージング手法および機能解析を志向したペプチド性リガンドの創製研究

X線結晶構造解析やNMR法などタンパク質構造解析技術の急速な進歩により，得られた相互作用モデルを基に多くの創薬候補化合物が見出されています。しかし，膜タンパク質などの難溶性タンパク質は正確な構造情報を得ることが困難であるため，化合物スクリーニングや計算情報に基づくデザインなどが必要です。著者の所属研究室では細胞膜に発現しているGPCRのひとつであるCXCR4に着目した研究を展開しています。CXCR4はがん転移におけるケモタキシスやHIVの感染時における受容体として重要であり，GPCRの二量体構造の形成はインターナリゼーションやシグナル伝達に重要であるとされています。京都大学大学院薬学研究科　藤井信孝先生，玉村啓和先生（現 東京医科歯科大学）らが開発してきたカブトガニの防御タンパク質であるポリフェムシンから導出されたT140を基に，ファーマコフォアを抽出して低分子化した環状ペプチドであるFC131は高いCXCR4結合親和性を有します[1, 2]。CXCR4に対する特異的リガンドを用いて蛍光基を用いたプローブを創出することは新規なCXCR4リガンドの創出への展開や，CXCR4の生物学的意義の解明につながると考えられます。著者はT140誘導体のAc-TZ14011に蛍光基のTAMRAを導入した蛍光性リガンドを用いた結合活性評価／新規化合物スクリーニング系の構築に取り組みました。TZ14011は14アミノ酸から構成されるペプチドであり，２つのシステインがジスルフィド結合を形成しています。８番目のD-リジンに対しては様々な官能基の導入が可能であることが知られているため，この位置にTAMRAもしくはfluoresceinを導入しました（図１）。これを用いた結合活性評価では，これまでに用いられていた放射性同位体でラベル化されたCXCR4の内因性リガンドであるSDF-1αを用いた系と比較して絶対値では10倍程度低い値が出るものの，相対的な結合親和性評

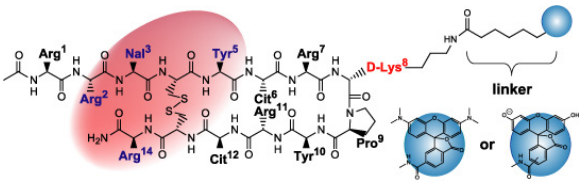


図１　蛍光性アセチル化 TZ14011の構造について

価においてはSDF-1αを用いた系と同等の精度で行えることが明らかとなりました。また，蛍光顕微鏡を用いた観察により，細胞表面に発現されているCXCR4に対する特異的な結合を検出することに成功しました。[3]

次に，さらに高い結合活性を有するリガンド／プローブを創出するために，２価型リガンドのデザインに取り組みました。受容体に対する特異的リガンドの２量化は結合活性が相乗的に増大することが知られています。リガンド間を繋ぐリンカーとしてはポリエチレングリコールやアルキル鎖が一般的に用いられており，最適な長さを決定するには様々な長さのリンカーを作成して結合活性を評価することが必要とされていました。そこで著者らはリンカー構造にポリプロリンを用いることにしました。ポリプロリンはヘリックス構造を形成し，長さが一定に保たれることが知られています。これをリンカーとすることでリガンド間の距離を一定に保った２価型リガンドを作製することができます。このようなリガンドを用いることの利点として，２量体を形成している受容体において，それぞれのリガンド結合ポケット間の距離に相当する長さのリンカーで結合活性が最大となることが予想されるため，二量体でのアッセンブリー様式が未知の受容体についてもその様式を予測することが可能であるという点があります。すなわち２価型リガンドを分子メジャーとして用いることが可能になります。リガンドユニットとしてFC131のグリシンをD-システインに置換したcFC131を用いて，様々な長さのポリプロリンを持つ２価型リガンドを作製しました（図２）。それぞれの結合活性を測定した結果，プロリン数が20のリ

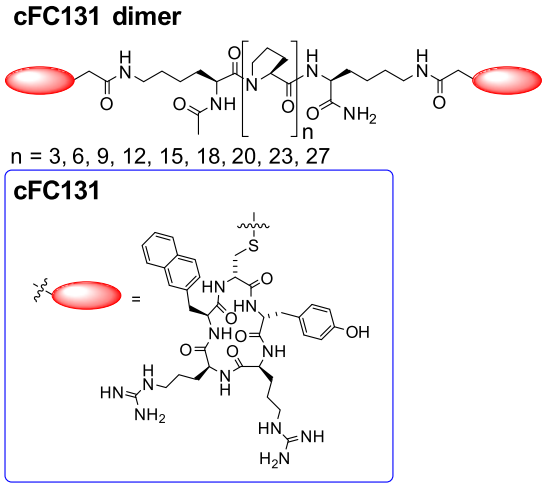


図２　二価結合型リガンドの構造について　CXCR4リガンドのFC131のグリシンをD-システインに置換したcFC131を用いた。

ンカー長が最適であり，結合親和性は単量体のリガンドに比べて17倍になることが示されました。さらにリンカーの末端に蛍光基を付加したリガンドでは，がん細胞に多く見られるCXCR4発現が亢進した細胞株を選択的に認識することを見出しました[4]（図３）。このようなアイデアによる多価型リガンドの報告はこれまでになく，今後 CXCR4発現量を指標としたがん細胞の検出などの医療的応用や新たな概念に基づく汎用的なリンカーとして他のGPCRリガンドへの応用などが期待されます。

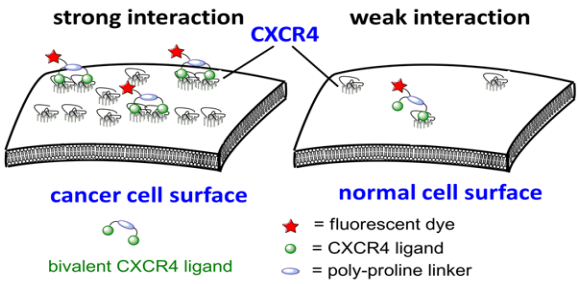


図３　二価結合型 CXCR4リガンドの細胞表面 CXCR4発現量の識別機構について　CXCR4発現量の多いがん細胞では二量体を形成する確率が高くなっているため，より強く認識される。

HIV 感染阻害剤およびワクチンの創製研究

HIV 感染による後天性免疫不全症候群（AIDS）は複数の薬剤を併用する多剤併用療法によって多大な治療効果が得られています。しかし，レトロウイルスは変異しやすく，薬剤に対する耐性獲得が問題となっており，それを克服するために新たな作用点をもつ薬剤の開発が望まれています。また，HIV 感染を予防・治療するためのワクチンは長く研究が進められてきた背景を持ちますが，いまだに実現に至っていません。著者の所属研究室ではHIVが宿主細胞に感染する際の膜融合過程に着目した研究を展開しています。膜融合時にはウイルスタンパク質（gp41）が表面に露出され，特徴的な３量体ヘリックス構造が宿主細胞膜を貫通し，３量体ヘリックスのN 末端領域とC 末端領域がそれぞれ会合することで６量体を形成し，膜融合が進行します。感染時にのみウイルス粒子表面に露出されるgp41は，変異が生じにくい部位であることが知られており，特異的抗体の主な標的部位となっています。この点に着目し，ペプチド化学によって３量体ヘリックス構造を精密に再構築し，この３量体ミミックの抗原分子，もしくは膜融合阻害剤としての可能性について検討しました。まず，N 末端領域の３量体ヘリックス構造について新規に合成したテンプレート分子にN 末端領域のヘリックス（N36）をコンジュゲートすることで３量体ミミックを得ることに成功しました（図４）[5]。この３量体ヘリックスとコントロールの単量体ヘリックスをマウスに免疫したところ，３量体ヘリックスで得られた血清には３量体構造を特異的に認識する抗体が含まれていることを示唆する結果が得られました（図５）。また，三量体の免疫によって得られた血清は単量体の免疫によって得られた血清と比較して約４倍の抗 HIV 活性を有していました。N 末端３量体ヘリックスのHIV 感染阻害活性は単量体の３倍であることが明らかになり，阻害活性においては化学量論的作用であることも分かりました。次にC 末端領域に関して３量体ヘリックスのミミックを作製しました。この場合はN 末端３量体ヘリックスとは異なり，C 末端側でテンプレート分子とコンジュゲートさせるため，これに関しても新規なテンプレート分子を合成しました（図６）。C 末端領域の配列については，単量体が治療薬（Enfuvirtide）として認可されているペプチド配列（T20）に近い領域のC34ヘリックスを用いました。この３量体ミミックについてマウスに免疫したところ，N36三量体と同様に立体構造特異性を示す抗体は産生されていましたが，抗 HIV 活性については単量体の免疫によって得られた血清と同程度でした[6]。HIV 感染阻害活性を測定したところ，単量体と比較して約100倍の活性を有することを見出しました[7]。この非常に興味深い現象の活性メカニズム解明

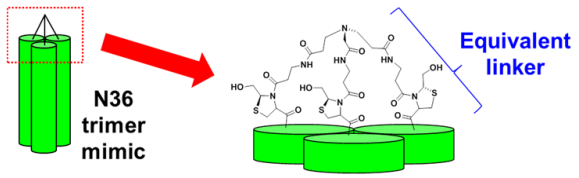


図４　N36三量体ミミックでのヘリックスを等価に束ねるテンプレート構造について

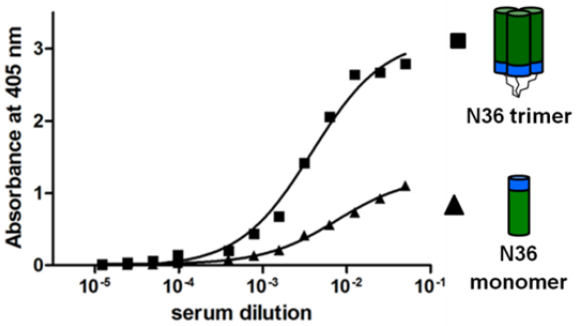


図５　N36三量体ミミックのマウスへの免疫によって得られた血清を用いたELISA 法の結果について　N36三量体を選択的に認識する抗体が得られていることが示唆された。

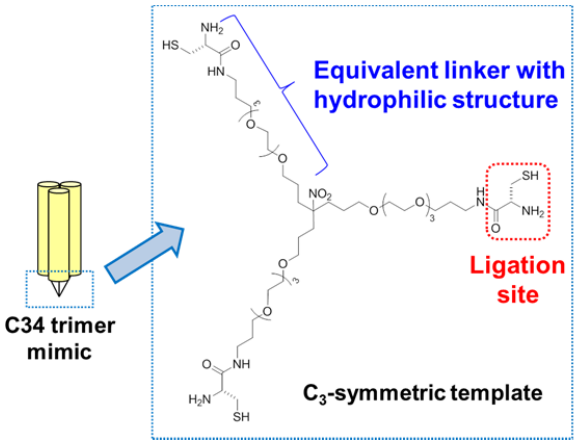


図６　C34三量体に用いたテンプレートの構造について

に向けて，２量体構造を作製し，またC末端領域から得られている活性ペプチドであるT20とSC34EK[8]についても同様に単量体，２量体，３量体を作製し，それぞれの活性の違いについて検討しました。（図７）。結果として，C34は２量体においても３量体と同様の高い活性を有することが明らかになりました[9]。また，T20，SC34EKについては多量体化による顕著な活性の向上は得られないこともわかりました。C34配列は比較的ランダムな構造を有することが結晶構造から明らかにされています。それと比較してT20は，C末端側の疎水性領域が宿主膜と相互作用することが示唆されている点，SC34EKはグルタミン酸－リジンによる塩橋を形成させることでヘリックス構造が誘起されている点が大きく異なります。C34の多量体化による活性の顕著な向上に関してはまだまだ研究を進める必要がありますが，新規な作用に基づく膜融合阻害活性をもつ分子として有用であると考えられます。これらの成果では複数の特許を出願しており，新たな抗HIV戦略を示すものとして注目されています。また，所属研究室で進行しているプロジェクトではHIV由来タンパク質群のペプチドライブラリーから感染阻害活性を有するペプチドを見出すことにも成功しており，その推進に注力しています[10-13]。

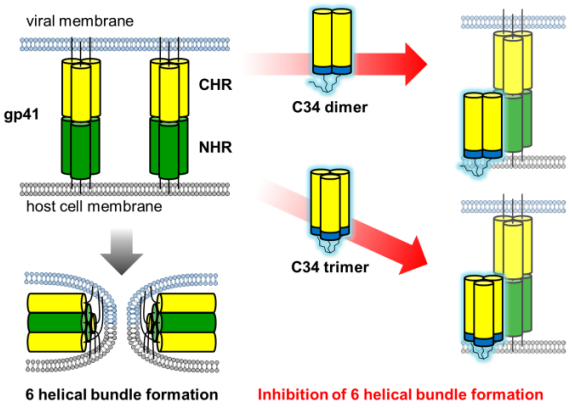


図７　HIV膜融合過程で生じるヘリックスバンドルを模倣したペプチドによる６ヘリカルバンドル形成の阻害機構について　C34三量体が単量体と比較して100倍強い阻害活性を示すことを明らかにし、最近の研究では二量体構造が活性の発現に重要であることも見出した。

おわりに

著者は，これら以外にも，DNA結合タンパク質であるジンクフィンガードメインを利用した新規人工酵素の開発研究[14, 15]やプロテインキナーゼのリガンド結合部位に環境応答性蛍光基を導入したセンサー機能を持つペプチドの開発研究[16-18]，ZIPタグ－プローブペア[19]の細胞内タンパク質ダイナミクスの可視化への応用に関する研究[20]など，生体分子間の相互作用に着目するという点に基づき，ペプチドを利用することで新たな研究領域の開拓を試みています。

最後になりますが，ここで紹介した研究は東京医科歯科大学生体材料工学研究所　玉村啓和教授のご指導の下で行ったものであり，玉村教授に心より感謝申し上げます。また，研究を遂行するにあたってご協力いただいた多くの学生諸氏，共同研究者の先生方に改めて御礼申し上げます。ペプチド化学はさまざまなアプローチが可能であり，非常に魅力的な学問です。これからも更なる研究の発展に取り組み，研鑽を積み上げていく所存です。今後ともご指導，ご鞭撻のほど，よろしくお願い申し上げます。

1）Tamamura, H. *et al.* ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*** 253; 877-882, 1998.
2）Fujii, N., *et al.* ***Angew. Chem., Int. Ed.*** 42; 3251-3253, 2003.
3）Nomura, W., *et al.* ***Bioconjugate Chem.*** 19; 1917-1920, 2008.
4）Tanaka, T., *et al.* ***J. Am. Chem. Soc.*** 132; 15899-15901, 2010.
5）Nakahara, T., *et al.* ***Bioconjugate Chem.*** 21; 709-714, 2010.
6）Hashimoto, C., *et al.* ***Bioorg. Med. Chem.*** 20; 3287-3291, 2012.
7）Nomura, W., *et al.* ***ChemMedChem*** 7; 205-208, 2012.
8）Otaka, A. *et al.* ***Angew. Chem., Int. Ed.*** 41; 2937-2940, 2002.
9）Nomura, W., *et al.* ***Bioorg. Med. Chem.*** 21; 4452-4458, 2013.
10）Narumi, T., *et al.* ***Bioorg. Med. Chem.*** 20; 1468-1474, 2012.
11）Suzuki, S., *et al.* ***J. Med. Chem.*** 53; 5356-5360, 2010.
12）Suzuki, S., *et al.* ***Bioorg. Med. Chem.*** 18; 6771-6775, 2010.
13）Nomura, W., *et al.* ***ACS Chem. Biol.*** *in press.*
14）Nomura, W., Barbas CF, III. ***J. Am. Chem. Soc.*** 129; 8676-8677, 2007.
15）Nomura, W., *et al.* ***Biochemistry*** 51; 1510-1517, 2012.
16）Nomura, W., *et al.* ***Bioconjugate Chem.*** 22; 923-930, 2011.
17）Nomura, W., *et al.* ***ChemBioChem*** 12; 535-539, 2011.
18）Ohashi, N., *et al.* ***Bioconjugate Chem.*** 22; 82-87, 2011.
19）Tsutsumi, H., *et al.* ***Angew. Chem., Int. Ed.*** 48; 9164-9166, 2009.
20）Nomura, W., *et al.* ***Biopolymers (Pept. Sci.)*** 94; 843-852, 2010.

のむら　わたる
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
nomura.mr@tmd.ac.jp

ペプチド複合型
バイオアクティブバイオマテリアル
ーポリ乳酸スキャホールドへのペプチド
修飾法の開発と末梢神経再生への展開ー

柿木佐知朗

はじめに

バイオマテリアルは，血液成分，血球，細胞，組織や臓器などの生体成分に接触する材料のことであり，様々な医療用デバイスの構成素材として広く利用されている。2012年の日本人（女性）の平均寿命は86歳で，筆者の生まれた1978年の78歳か

ら８年も長くなった。生活習慣病の発症数が増加しているにも関わらず平均寿命が大幅に延長したのは，医療技術の飛躍的な進歩による。医薬品や医療検査機器の煌々たる発展に並んで，人工臓器などの医療用デバイスも着実に進歩を遂げてきた。さらに近年は，再生医療や組織工学が注目されており，バイオマテリアルは一層大きな役割を担いつつある。

生体組織の構造や機能は，主に細胞外マトリクス（ECM）タンパク質によって維持されている。バイオマテリアルの大きな目的は生体組織の代替えであることから，生体組織の模倣，すなわち人工的なECMの創製が基本的な開発戦略となる。人工材料と生体組織との大きな隔たりを橋渡しするために様々な生理活性ペプチドが利用されている。本稿では，バイオマテリアル，組織工学およびバイオアクティブバイオマテリアルの概説と，筆者らの研究の一例としてポリ乳酸スキャホールドへのペプチドの固定化法と末梢神経再生誘導チューブへの応用について紹介する。

組織工学（ティッシュエンジニアリング）

まず，日本ペプチド学会の先生方にはあまり馴染がないであろう組織工学（ティッシュエンジニアリング）について紹介する。筆者が幼少の頃，ウーパールーパーと呼ばれて大人気であったメキシコサラマンダー（アホロートル）は，尻尾はもちろんのこと，肢，脳，心臓などの一部を失っても再生する能力がある。一方，我々ヒトの組織は構造および機能を一度失うと再生することはない。しかし，切り傷程度であれば治癒するように，我々も自然治癒力を備えている。細胞の分化や増殖，さらには組織の構築をバイオマテリアルよりなる足場材料（スキャホールド）で制御することによって自然治癒力を最大限に高めて，アホロートルのように失った組織を再生修復させようとする治療法が組織工学である。バイオマテリアルを用いた組織再生の誘導は，1980年代から末梢神経や歯周組織を対象に，Guided tissue regeneration（GTR）と呼ばれて検討されてきた。1993年にJ. Vacantiハーバード大学教授とR.Langerマサチューセッツ工科大学教授らがヌードマウスの皮下に軟骨組織を作製し，ティッシュエンジニアリングという概念を提唱して以降は，この呼び名が広く普及している[1]。Vacantiらの報告では，グリコール酸－乳酸共重合体の多孔質足場材料に軟骨組織を播種し，それをヌードマウスの皮下に移植することで軟骨組織を作製した。ヒトの耳を背負ったVacanti mouse[2] の写真が御記憶にある先生方もいらっしゃるのではないだろうか。厳密には，細胞を用いず足場材料のみで組織再生を誘導するアプローチをGTR，足場材料と細胞とを組み合わせたアプローチを組織工学と区別するが，いずれにおいても足場材料は重要な役割を担っている。また，近年はES細胞やiPS細胞，体性幹細胞などの作製および採取法が確立されつつあり，それらの大量培養や分化制御を目指した培養基材としてのバイオマテリアル開発も盛んである。組織工学や再生医療では，最適な細胞外環境（足場）を構築し，組織再生に有利な生体反応を誘導する能力がバイオマテリアルに求められる。そのために有用な技術が，後述のバイオアクティブバイオマテリアルである。

バイオアクティブバイオマテリアル

バイオマテリアルは，コンタクトレンズや外科用縫合糸など身近なものから，人工血管，人工心臓，ステント，歯科用インプラント，透析用中空糸やカテーテルなどに用いられている。人工材料はウィルスや病原体とは異なり，生体にとって極めて特殊な異物であるため，それらが埋入されると炎症や血液凝固などに加えて，カプセル化などの反応が惹起される。そのため，いかにして生体の免疫系を欺き共存できるバイオマテリアルを開発するかが重要となる。これまでは，生体に馴染み（生体親和性），かつ血液が凝固しない（血液適合性）こと，すなわち‘バイオイナート’を要点として，高分子（合成・天然），金属やセラミックスなどのバイオマテリアルが開発されてきた。しかし，実際の医療用デバイスでは，生体組織とデバイスとの接合部や人工血管の内腔など，特定の細胞や組織との積極的な接着が要求される場合も多い。さらに，組織工学用の足場材料には，生体内で細胞や組織に能動的に機能する‘バイオアクティブ’なバイオマテリアルが求められている[3]。

バイオアクティブバイオマテリアルの開発における基本的な戦略は，人工材料による生体組織の模倣である。ご存じの通り，生体の機能および恒常性は様々な分子によって支えられており，その中でもタンパク質の役割は極めて大きい。特に，コラーゲンなどのECMとサイトカインやケモカインなどの増殖因子は生体の治癒や再生を緻密に制御しており，バイオマテリアルにとって最も必要となる機能を備えた生理活性分子である。しかし，ECMおよび増殖因子が織りなす多様な機能やナノ構造を人工的に複製することは現状では不可能である。多くの場合，タンパク質の生理機能の発現には構成する全アミノ酸が寄与している訳ではなく，数～数十残基程度のアミノ酸配列（活性部位）が機能している。分子生物学の進展に伴い，多くの活性配列がECMタンパク質から同定されている（表１）。活性配列（ペプチド）を利用することで，必要とする生理的機能を人工材料に化学的に複合することが可能となる。このようなアプローチは1990年代から試みられており，その代表的なものにフィブロネクチン由来のインテグリン結合配列であるArg-Gly-Asp（RGD）で修飾された細胞接着性バイオマテリアルがある[4]。また，本稿では詳細は割愛するが，Urry[5]やTirell[6]らの人工エラスチンのように基本構造を模倣して設計された人工タンパク質や，Zhangらのβ-sheet型自己凝集ハイドロゲル[7]などもバイオアクティブバイオマテリアルの例として挙げられる。従来のバイオマテリアルの生体親和性（バイオイナート）や分解吸収性に加えて生理活性が導入されたバイオアクティブバイオマテリアルは，新たな医療用デバイスの開発に有用と期待されている。この期待を現実のものとするためには，臨床応用を見据えた明確なターゲットの選定と最適なデバイス設計（加工法や基材）およびペプチド修飾法が重要となる。筆者らは，末梢神経再生誘導チューブの開発を目指し，生体分解性高分子であるポリ乳酸へのペプチド修飾法を検討している。

コラーゲン様ペプチドの物理吸着を利用したポリ乳酸スキャホールドの機能化

ポリ乳酸は，生体内に埋入されると乳酸に加水分解され，最終的には代謝される。また，力学的強度や加工性にも優れており，ファイバー，スポンジ，フィルムやプレートなどの成型も容易で，生体分解吸収性の外科用縫合糸や骨固定・接合材として臨床利用されている。しかしながら，細胞や組織との親和性は乏しく，ポリ乳酸の生理的機能化が望まれている。また，我々がターゲットとしている末梢神経再生誘導チューブにおいても，臨床に用いられているものはポリ乳酸を基材としており，神経再生性を補うために動物由来のコラーゲンが内腔に充填されている。生物学的な危険性を踏まえると，動物由来タンパク質の利用は可能な限り避けることが好ましい。そのため，ポリ乳酸へのペプチドなどの生理活性分子の修飾法の研究は盛んに行われてきた[8]。ポリ乳酸は分子内に反応性官能基を持たないため，異なるポリマーとの共重合，プラズマ照射，表面加水分解によって反応性官能基を導入し，それを介した生理活性分子の固定化が報告されている。しかし，これらの方法ではポリ乳酸の分子量の低下や加水分解速度の促進などの問題があった。そこで我々は，簡便性に優れ，かつポリ乳酸の特性を損なわないペプチド修飾法として物理吸着に注目して検討した。

我々はコラーゲン様繰り返し配列（$(Pro\text{-}Pro\text{-}Gly)_5$）[9]を吸着リンカーとして用いた。また，ポリ乳酸を基材とした末梢神経再生誘導チューブへの応用を想定し，活性配列として東京薬科大学 野水基義教授らによって同定されたラミニン由来のAG73 (Arg-Lys-Arg-Leu-Gln-Val-Gln-Leu-Ser-Ile-Arg-Thr)[10]を選択し，AG73-G_3-$(PPG)_5$という配列のペプチドを設計した。ポリ乳酸は疎水性高分子であることから，$(PPG)_5$セグメントが疎水性吸着し，結果としてポリ乳酸表面にAG73が固定された人工 ECM 層を構築しようというのが本アプローチである（図１）。ポリ乳酸のフィルム（分子量約13万；φ＝6.0mm, t ＝0.5mm）を作製し，1mLのAG73ペプチドもしくはAG73-G_3-$(PPG)_5$（いずれも10μM）に24時間浸漬した。純水もしくは塩化ナトリウム水溶液（1.0M）で洗浄後，フィルム上で神経幹細胞のモデル細胞として用いられているラット副腎褐色細胞腫（PC12細胞）を神経成長因子（NGF）存在下で培養して接着数および神経突起数を評価した。その結果，純水で洗浄した場合はAG73ペプチドとAG73-G_3-$(PPG)_5$の両者においてPC12細胞の接着数および分化傾向に顕著な差は認められなかった。しかし，塩化ナトリウム水溶液で洗浄した場合，AG73ペプチドでは急激に細胞接着数が減少したのに対し，AG73-G_3-$(PPG)_5$では純水で洗浄した場合とほぼ同様の活性を維持することができた（図２）。この結果は，AG73-G_3-$(PPG)_5$がポリ乳酸フィルム上に強固に吸着し，AG73が安定に固定化されていることを示唆している。このようなアプローチは極めて単純に思えるが，物理吸着のみでポリ乳酸をペプチドで修飾することができれば，その臨床的意義は極めて大きい。

オリゴ乳酸ーペプチド複合体を用いたポリ乳酸スキャホールドの機能化

先の物理吸着は簡便性には優れているものの，生体内で長期間保持することは難しいと考えられる。細胞の接着（接触）や血清タンパク質の吸着などは移植直後に惹起されるため，それらの制御を目的とする場合は物理吸着によるペプチドの固定でも充分な効果が得られるであろう。しかし，組織の再生を誘導したい場合は，固定化されたペプチドは細胞が遊走してくるまでは保持されなければならない。末梢神経の再生を考えると，チューブ移植後にシュワン細胞の増殖と軸索の伸長が誘導されるまでペプチドを維持する必要がある。神経再生誘導チューブには（１）神経再生が完了する期間までの標的組織への誘導路の確保，（２）神経再生を促進する足場，（３）縫合等に耐えうる操作

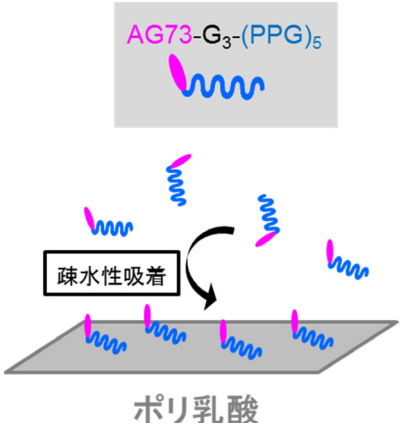


図１　物理吸着を利用したポリ乳酸へのペプチドの固定

表１　ECMタンパク質から同定された細胞接着性配列の例

Sequences	Origin	Function
RGD	Fibronectin，Vitronectin	Cell adhesion
REDV	Fibronectin (CS-III domain)	Endothelial cell adhesion
LDV	Fibronectin (CS-I domain)	Endothelial cell adhesion
YIGSR	Laminin	Cell adhesion
LRAHAVDVNG	N-cadherin	Cadherin-mediated cell adhesion
KRSR	Heparin binding domain	Cell adhesion (Osteoblast)
GFOGER	Collagen	Cell adhesion
WRTQIDSPLNGK	VCAM-1	Endothelial cell adhesion

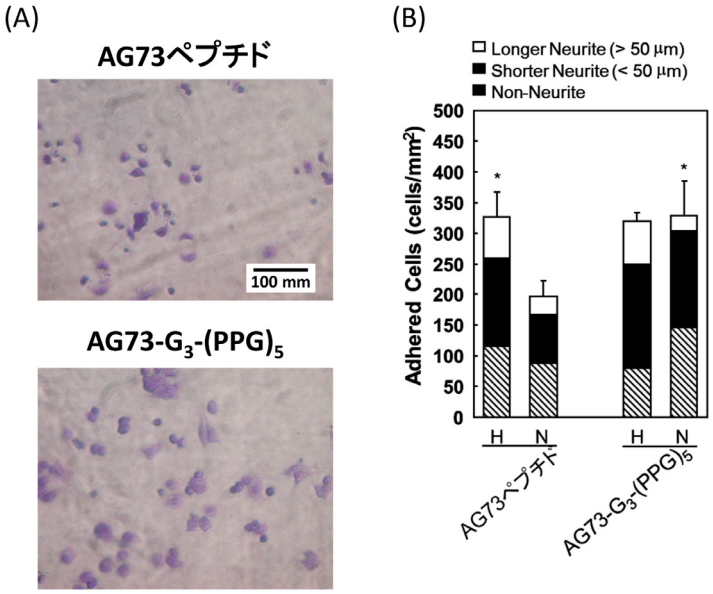


図２　AG73-G_3-$(PPG)_5$を吸着固定したポリ乳酸フィルム上でのPC12細胞の接着と神経突起の伸長[9]
（A）NaCl 水溶液で洗浄後のフィルム上でのPC12細胞
（B）純水（H）とNaCl 水溶液（N）で洗浄後の各フィルム上でのPC12細胞の接着数と突起伸長

性と柔軟性，（４）外部結合組織の侵入および癒着を防止し，かつ液性成分が透過できる構造，（５）神経再生終了後に消失する分解吸収性，（６）動物由来材料や化学架橋剤を用いない高い生体安全性といった特性が求められる。そのため，ポリ乳酸のファイバーやメッシュよりなるチューブを使った研究は数多いが，生理活性分子をチューブ内腔へ安定に修飾する技術がないために，コラーゲンなどの動物由来タンパク質で神経再生性が補われているのが現状である。乳酸にはL 体とD 体の２つの光学異性体が存在し，それらのポリマーを混合すると安定なステレオコンプレックスを形成することが知られている。我々は，オリゴD- 乳酸 /ペプチド複合体とポリL- 乳酸とのステレオコンプレックス形成を利用したポリ乳酸スキャホールドへのペプチド固定化法を考案した[11,12]。この方法は，オリゴD- 乳酸 /ペプチド複合体とポリL- 乳酸とを混合し，急速に脱溶媒することによって均一なステレオコンプレックスを形成させることで，ポリ乳酸スキャホールド上にペプチドを固定化するものである（図３）。前節と同様に神経再生性ペプチドにはAG73を選択し，本方法によるポリ乳酸スキャホールドへの固定化を検討した。まず，Fmoc 固相合成法でAG73を逐次伸長後，あらかじめ脱水縮合によって合成したオリゴD- 乳酸（分子量700 ～ 1750Da）を樹脂上で縮合させることでオリゴD- 乳酸 /AG73複合体を得た。ポリL- 乳酸とオリゴD- 乳酸 /AG73複合体を質量比97：３で混合して10％ -ヘキサフルオロイソプロパノール溶液とし，スピンコーティング法で薄膜を成型した。また，同溶液を電解紡糸（エレクトロスピニング）することでナノファイバー不織布も作製した。それらの上にPC12細胞を播種し，接着性および神経突起伸長活性を評価した。その結果，未修飾のポリL- 乳酸と比較して，オリゴD- 乳酸 /AG73複合体を混合させることによってPC12細胞の接着および突起伸長が向上した（図４）。前節の物理吸着を利用した方法と比較しても，

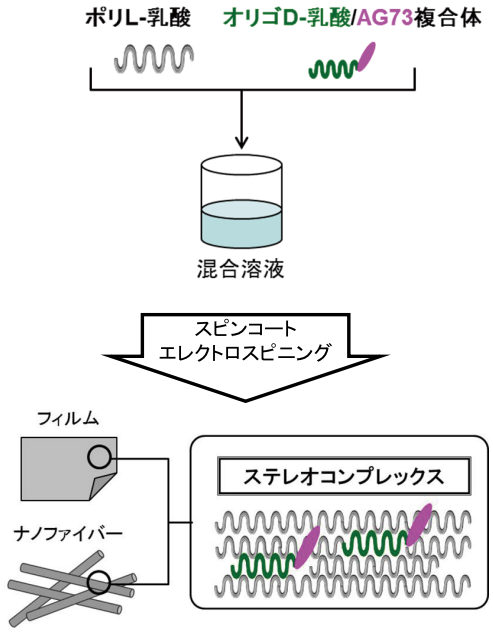


図３　ステレオコンプレックス形成を利用したポリ乳酸へのペプチドの固定

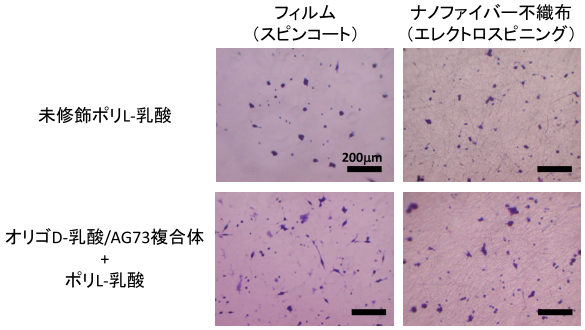


図４　オリゴD- 乳酸 /AG73複合体を混合成型したポリL- 乳酸フィルムおよびナノファイバー不織布上でのPC12細胞の接着挙動[12]

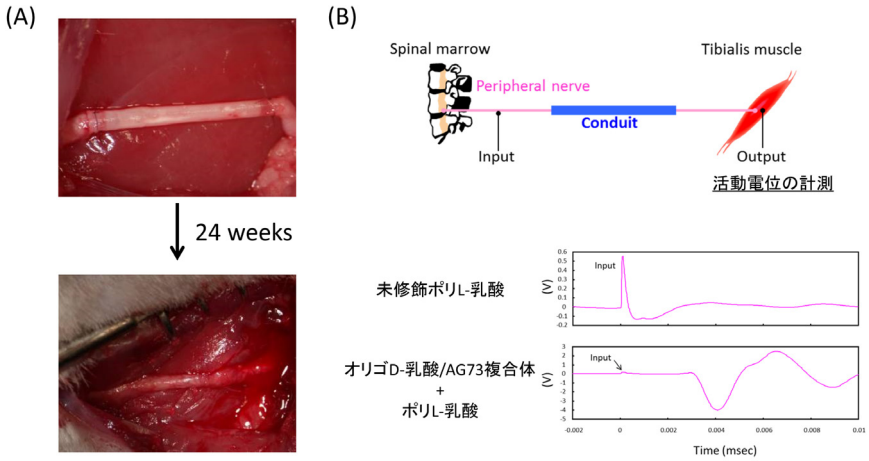


図５　オリゴD-乳酸/AG73複合体ナノファイバー神経誘導チューブのラット坐骨神経欠損部への移植[12]
（A）ラット坐骨神経欠損部に移植したチューブ［移植直後と24週後］
（B）移植24週後の活動電位測定

その差は明確であり，安定かつ充分量のペプチドが導入されていることが推察された。さらに，電解紡糸によってオリゴD-乳酸/AG73複合体とポリL-乳酸とを混合したナノファイバーを内層とした神経誘導チューブを作製し，ラットの坐骨神経に作製した10mmの神経欠損を架橋して24週後に神経再生を組織学的および電気生理学的に評価した（図５(A)）。その結果，誘導チューブは生体内で分解されており，その内部にGFAP（glial fibrillary acidic protein）およびニューロフィラメント陽性神経組織の再生が認められた。また，電気生理学的な評価でも，誘導チューブ移植部中枢側からの電気的刺激によって脛骨筋電位が検出され，機能神経が再生していることも明らかとした（図５(B)）。このオリゴD-乳酸/ペプチド複合体を用いたポリL-乳酸の機能化法は，末梢神経再生誘導チューブのみならず，動物由来材料フリーの新しい医療用デバイス開発への展開が期待される。

おわりに

本稿では，バイオマテリアルおよび組織工学の概説と，バイオアクティブバイオマテリアル開発におけるペプチドの利用例として，ポリ乳酸スキャホールドへのペプチド修飾法に関する筆者らの２つのアプローチを紹介させて頂いた。我々は，コラーゲン様ペプチド（$(PPG)_5$）の物理吸着およびオリゴD-乳酸/ペプチド複合体のステレオコンプレックス形成を利用することで，極めて簡便にポリ乳酸スキャホールドをペプチドで修飾することに成功した。また，オリゴD-乳酸/AG73複合体とポリL-乳酸よりなるナノファイバー神経再生誘導チューブにおいては，ラット坐骨神経欠損モデルを用いた*in vivo* 試験でその有用性を明らかとした。

ペプチドがバイオマテリアルの機能化に有用であること示す報告は極めて多いものの，大部分は*in vitro* の評価に留まっており，実際にデバイスとして臨床利用されるに至った例はない。その理由の一つに，生体安全性，簡便性（操作性）や基材選択性など，臨床利用に必要な特性を備えたペプチド固定化法が少ない事が挙げられる。我々は，マテリアルの研究者としてそれぞれの基材およびデバイスに適したペプチド固定化法を提供することで，ペプチドのバイオマテリアル開発への展開をよりスムーズにし，組織工学の実現ならび新規医療用デバイスの臨床応用へと発展するための一助となることができればと考えている。

ここに紹介させて頂いた研究は，（独）国立循環器病研究センター研究所生体医工学部の山岡哲二部長をはじめ，多くの共同研究者の方々の御指導ならび御支援によるものであり，ここに深く御礼申し上げます。また，末筆にて恐縮ながら，本PEPTIDE NEWSLETTER JAPANにてバイオマテリアルという少し異分野でのペプチドの有用性について紹介させて頂ける機会を賜わり，近畿大学理工学部生命科学科　日高雄二先生をはじめ，編集委員の先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Langer, R. et al., Science 260, 920–926 (1993)
2. Cao, Y. et al., Plast. Reconstr. Surg. 100, 297–302 (1997)
3. Hubbell, JA. Cur. Opi. Biotechnol. 10, 123–129 (1999)
4. Brandley BK. et al., Develop. Biol. 135, 74–86 (1989)
5. Urry, DW. et al., J. Protein Chem. 3, 403–436 (1984)
6. Creel, HS. et al., Macromolecules 24, 1213–1214 (1991)
7. Kisiday, J. et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 99, 9996–10001 (2002)
8. Yamaoka, T. et al., Koubunshi Ronbunshu 55, 328–333 (1998)
9. Kakinoki, S. et al., Acta Biomaterialia 6, 1925–1930 (2010)
10. Weeks, BS. et al., Exp. Cell Res. 243, 375–382 (1998)
11. Yamaoka, T. et al., In Proceedings of International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, HI, USA, 15–20 December 2005; Program No. 482.
12. Kakinoki, S. et al., Polymers 3, 820–832 (2011)

かきのき　さちろう
（独）国立循環器病研究センター
研究所生体医工学部
sachiro@ncvc.go.jp

第23回アメリカペプチド学会に参加して

三須　良介

今回の23rd American Peptide Symposiumは，私にとって，初めての海外での国際学会だったので，参加前から非常に楽しみにしていました。また，2010年に京都で開催された5th International Peptide Symposiumのときに知り合った友人たちも参加するとの連絡もあり，彼らとの再会という楽しみも増えたので，期待で胸を膨らませながら日本を出国しました。途中，乗り継ぎのホノルル空港で手荷物を紛失するというトラブルに見舞われましたが，同伴してくださった大石先生のサポートもあり，無事に学会会場であるヒルトンワイコロアビレッジに到着しました。

学会会場がリゾートホテルだったこともあり，普段は非常にリラックスした雰囲気が流れていましたが，ひとたび講演が始まると，会場の空気が一変しました。英語での講演に聴きなれていないこともあり，私は講演についていくことに必死だったことを記憶しています。自らのポスター発表では，外国人の先生方がたくさん来て下さり，様々なアドバイスをいただきました。最初は英語での説明が上手くできずに苦労しましたが，セッション時間が進むにつれて，相手から良いリアクションを引き出せるようになり，次第に議論を交わすことができるようになりました。自らも積極的に他の研究者のポスターをまわるように心掛けましたが，このときも自分の考えが上手く伝わらず，歯がゆい思いをすることがありました。また，ネイティブ同士のディスカッションになかなか加わることができずに悔しい思いをしたことも良い経験となりました。今後は英語でもしっかりディスカッションができるように，自らの英語力を鍛錬したいと思いました。

冒頭の友人たちとは初日のオープニングレセプションで無事に再会を果たし，それ以来，ホテル内のビーチで毎晩ビールを片手に語り合いました。研究のことや将来のこと，私生活のことなど，様々な話題を話しましたが，日本人とは全く違う考え方をしている彼らとの会話は大変興味深かったです。何もかもが新鮮で，今回の学会を通じて経験したこと全ては，私にとって貴重な財産となりました。この経験を糧にして，今後も研究に励んでいきたいと思います。

末筆ではございますが，今回の23rd American Peptide Symposiumへの参加を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並びに選考委員会の先生方に，この場を借りて深く感謝いたします。

みす　りょうすけ
京都大学大学院薬学研究科
ケモゲノミクス分野
misu.ryosuke.44s@st.kyoto-u.ac.jp

第45回若手ペプチド夏の勉強会開催報告

鳴海　哲夫

野村　　渉

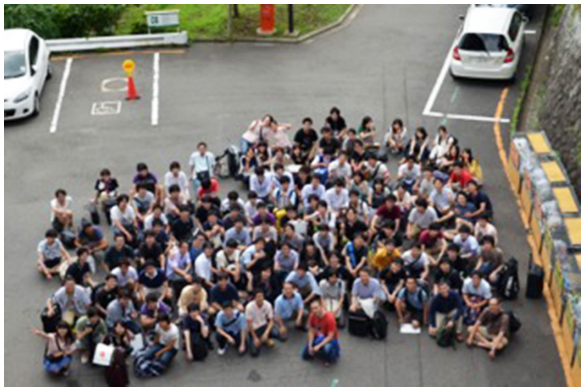
今年で第45回を迎えた若手ペプチド夏の勉強会は，東京医科歯科大学生体材料工学研究所メディシナルケミストリー分野（玉村啓和研究室）がお世話させていただき，去る平成25年7月28日から30日までの3日間，東京都八王子市の八王子セミナーハウスに於いて開催致しました。今年も早くからたくさんのお問い合わせを頂き，最終的には全国から120人（運営スタッフ15人を含む）を超える多くのペプチド若手研究者の方々に参加いただきました。一方で，日程の都合により参加できなかった方々がおられましたこと，心からお詫び申し上げます。また，今年は開催地が東

京・八王子ということもあり，宿泊費，施設利用料が例年に比べ少々高めになってしまいました。しかしながら，今年も日本ペプチド学会から運営費の一部を，また各方面からも資金面でご援助をいただき，おかげで盛大に勉強会を開催することができました。参加者を代表して，関係各位に厚く御礼申し上げます。

3日間の勉強会では例年より多い6件の特別講演，三人の先生による留学体験記，教室紹介（19研究室および1企業），12件の一般講演，25件のポスター発表がありました。

今年の若手勉強会は，7月28日に大高章先生（徳島大学）「自然に学ぶペプチド化学」の特別講演にはじまり，三原久和先生（東京工業大学）「設計ペプチドライブラリを用いるペプチドチップ」，野水基義先生（東京薬科大学）「日本の研究に足りないもの」についてご講演をいただきました。初日から活発な質問や議論があり，若手の会らしいスタートとなりました。さらに特別講演として，後藤佑樹先生（東京大学）「人工生合成系による特殊ペプチドの合成」，梅澤直樹先生（名古屋市立大学）「γ-セクレターゼを阻害するフォルダマーの開発」，松崎勝巳先生（京都大学）「定説にとらわれないサイエンス」にご講演いただき，例年以上にペプチド科学を学ぶすばらしい機会となりました。

また，特別講演に加え今年はご自身で精力的にバリバリ実験を行う若手の先生方に依頼講演として，田中智博先生（東京理科大学）「（酵素反応＋発現タンパク質）×ライゲーション＝次世代タンパク質反合成」，小林数也先生（京都薬科大学）「アジリジンアルデヒドのペプチド創薬への応用：架橋型環状ペプチドの合成研究」，谷口敦彦先生（東京大学）「触媒的酸化によるアミロイドβペプチドの凝集および毒性発現の抑制」，大橋南美先生（東京医科歯科大学）「ペプチド/タンパク質半合成技術の活用法－ヒストンコード仮説，解明への応用－」，津田修吾先生（株式会社ペプチド研究所）「苦痛の中のほんの一瞬」，向井秀仁先生（長浜バイオ大学）「国際学会発表のススメ～Young Investigators's Awardを目指そう」についてご講演いただきました。さらに，今年の留学体験記はパネルディスカッション形式で行い，小林数也先生（カナダ・トロント大学への留学），田中智博先生（アメリカ・ペンシルバニア大学への留学），大橋南美先生（アメリカ・プリンストン大学への留学）にパネリストとして，留学中の貴重な経験をお話いただきました。この場を借りて，ご講演していただいた先生方に参加者を代表して深く感謝を申し上げます。



大学院生による一般講演には12件の応募をいただき，どの発表者も自分の研究内容がしっかりとまとめられてあり，発表後の質疑応答には学生同士で活発なディスカッションが行われました。また，今年もポスター発表を企画しました。こちらは例年より多い25件の応募があり，各々1分間の口頭発表による内容説明に加え，2日目の昼食後に自由討論を行いました。それぞれのポスターで活発な議論が行われていた為，設定した時間では十分でなかったと感じ，急遽夜にもポスター発表の時間を設けました。22時の講義室が閉まる時間ギリギリまで討論が続いていたのは予想外のことであり，これは大変嬉しいことでありました。

また，1日目，2日目の晩に行った懇親会も，いつも以上に大盛況であったように思います。懇親会の会場では，深夜まで講演いただいた先生方も含め大勢の参加者が熱く語り合い，交流を深めていました。新しい仲間もできたのではないでしょうか。

さて，例年通り勉強会における各種の優秀賞を設け，参加者の投票により12人の学生さんを表彰させていただきました。学生討論部門では，最優秀賞に平和馬さん（早稲田大学），優秀賞に奥彰彦さん（京都大学），小宮千明さん（徳島大学），一般講演部門最優秀賞に加藤保治さん（東京大学），優秀賞に河野健一さん（京都大学），山本純さん（徳島大学），濱田圭佑さん（東京薬科大学），ポスター発表部門優秀賞に高辻諒さん（東京大学），鎧佳奈子さん（山形大学），小山正浩さん（信州大学），奥彰彦さん（京都大学），粟飯原圭佑さん（徳島大学）が選ばれました。おめでとうございます。受賞者の方々には賞状と副賞を贈らせていただきました。その他の発表も優秀賞に引けを取らない内容のものばかりでありました。

次回（第46回）の勉強会は，龍谷大学の富崎欣也先生と甲南大学の臼井健二先生が世話人となり，京都にて開催が予定されています。今回，特別講演に来ていただいた先生からも若手ペプチド勉強会の活発さに対して評価を頂き，大変光栄に思いました。若手ペプチド夏の勉強会は，他の研究者と有意義な議論を通じて，各人の研究と率直にかつ真剣に向き合うのに非常に良い機会であります。今後もこれまでの反省をふまえ，さらに発展させながら若手ペプチド夏の勉強会を永く続けていくことができればと思います。

なるみ　てつお
静岡大学大学院　工学研究科
化学バイオ工学専攻
E-mail: ttnarum@ipc.shizuoka.ac.jp

のむら　わたる
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
E-mail: nomra.mr@tmd.ac.jp

第19回ペプチドフォーラム
「生体分子を理解するツールとしての ペプチド科学：ペプチドで何ができるか，何がわかるか」

蛋白質を中心とした生体分子を理解することは生命現象，疾患の理解に繋がり，創薬，材料科学などの応用研究にも必要不可欠である。しかしながらその構造，機能，システムの複雑さが研究の進展を大きく妨げることがしばしば起こる。そういった場合，ペプチドを活用することでボトルネックが解消し，大きなブレークスルーをもたらすことがある。今回，ペプチド科学を活用した生命現象の理解，疾患の理解，創薬研究，材料開発を行っている先生方に話題を提供して頂き，ペプチドで何ができ，何がわかるのか，ということを学び，考えるきっかけにしたい。

日時：2013年12月６日（金曜日）13：00～18：00
会場：山形大学工学部100周年記念会館セミナー室
（〒992-8510　山形県米沢市城南4-3-16）
山形新幹線 JR 米沢駅下車，市バス（循環右まわり）あるいは山形交通バス（白布温泉行）にて城南２丁目下車
http://www2.yz.yamagata-u.ac.jp/access/
主催：日本ペプチド学会
共催：日本化学会，日本農芸化学会，日本薬学会
後援：米沢工業会，山形大学工学部
参加費：無料；懇親会費：15,000円（宿泊費込）
参加申込：参加を希望される方は氏名，所属，電子メールアドレス，ポスター発表有無，懇親会参加有無，を明記の上，今野まで電子メールでお知らせ下さい（締め切り11月15日）。お誘い合わせの上，ふるって御参加ください。
講演者：
保住健太郎先生（東京薬科大学）「ラミニン由来活性ペプチドを混合固定化した高分子多糖マトリックスの生物活性」
倉橋洋史先生（東北大学大学院医学研究科）「酵母プリオンの伝播を阻害するグルタミン・アスパラギンリッチタンパク質」
鳴海敦先生（山形大学大学院理工学研究科）「生体分子修飾ワーム状ミセルの合成と重合」
村本光二先生（東北大学大学院生命科学研究科）「ペプチドがしめす抗酸化活性の特性」
赤路健一先生（京都薬科大学）「プロテアーゼの基質認識に基づく阻害剤設計」

一般講演（ポスター）を10件程度募集します
懇親会（小野川温泉河鹿荘）
詳細はホームページをご覧下さい
http://bioorg.yz.yamagata-u.ac.jp/PepForum.html
連絡先：今野博行（山形大学大学院理工学研究科バイオ化学工学専攻）
TEL: 0238-26-3131; e-mail: konno@yz.yamagata-u.ac.jp

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：日高雄二）