



PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

No.93

2014年7月

THE JAPANESE PEPTIDE SOCIETY

<http://peptide-soc.jp>

新会長ご挨拶

ペプチド科学は生命科学の基礎をなすものとして、理学、工学、医学、薬学、農学などの領域の発展に大きく貢献してきました。1990年、ペプチド科学に携わる者の学会として、アメリカペプチド学会、ヨーロッパペプチド学会などが海外で結成されたのと期を同じくして日本ペプチド学会が結成され、我が国におけるペプチド科学の発展を図るとともに、欧米の学会とも緊密な連携を保ちつつ国際的な活動を分担することとなりました。1997年に第1回の国際ペプチドシンポジウム (IPS) が京都において開催されましたのも、日本ペプチド学会の呼びかけによるものであります。この度、第12期会長・下東先生の後を受け、第13期の日本ペプチド学会・会長を拝命することとなりました。歴代の会長・理事・監事・評議員の先生方をはじめとする諸先輩方が築かれてきた学会活動に微力ながらも貢献できるよう、鋭意努める所存です。何とぞご支援賜りますようお願い申し上げます。



赤路 健一

日本ペプチド学会の最も重要な事業は、毎年秋に開催される年会「ペプチド討論会」です。第1回のペプチド化学討論会は1962年に大阪で開催され、以後回を重ね昨年50回の節目を迎えました。この間日本ペプチド学会は、2004年の1st Asian-Pacific International Peptide Symposium (APIPS)、2006年の4th Peptide Engineering Meeting、2010年度国際ペプチドシンポジウム・IPS、などの国際学会の開催にも携わってきました。昨年2013年の第50回ペプチド討論会は第4回 APIPSとの併催として開催され、最近日本で開催されたペプチド討論会のうち2～4年に1回は国際会議として開催されるようになっております。このように、ペプチド討論会は広く海外を含めたペプチド研究者を対象とする総合的な学術集会へと進化しつつあり、研究発表の多くが英語でおこなわれるようになっております。このような対応により、毎年の討論会はもちろん各種国際会議も回を追って急速に盛況となり、我が国におけるペプチド科学研究の活況を内外に強く示す機会となっております。ペプチドがかかわる多様な領域の研究者の方々に積極的に討論会に参加いただき、ますます内容が充実されることを強く願っております。

2001年からは、特に若手研究者の課題探求の意識か

らペプチドフォーラムが企画されるようになり、これまでに19回を数えています。次代を担う若い研究者の方々の挑戦的な企画を大いに期待しております。日本ペプチド学会はこのような継続的事業を通じて国際化が急速に進む研究環境に対応し、グローバルなペプチド科学の学術進展、特にその基盤となる次代を担う若い研究者の育成に努めております。今後もこのような活動を継続・発展させるため、会員の皆さまの積極的なシンポジウム等への参加を心からお願い申し上げる次第です。

日本ペプチド学会ではこれら学術集会とあわせ、学会賞、奨励賞および討論会でのポスター賞の選考・授与を行っております。また、アメリカ・ヨーロッパ・アジアとほぼ全世界をカバーするペプチド関連学会への若い会員の参加・発表を支援し、新しいテーマ探求の一助としていただくために国際学会 (APS, EPS, IPS, APIPS、そして中国および韓国の討論会) 参加に対する JPS Travel Award の授与を行っております。これら Award 事業を大いに利用していただき、新たな研究展開を図っていただくきっかけとしていただくことも学会の大きな使命の一つと考えております。多くの研究者の方々の積極的な応募をお待ちしております。

日本ペプチド学会では、このような日々の活動の広報を通じた新たな会員の参加と学会活性化をめざし、ホームページやニュースレターによる情報発信を行ってきました。ニュースレターでは、学術雑誌では得られない貴重な情報が盛り込まれた紙面づくりが行われております。会員の皆様にもユニークな情報発信の場として積極的にこのニュースレターご利用いただきたいと考えております。また、ホームページを通じた情報発信は最近とみに重要度が増しており、ペプチド学会でも多様な情報を盛り込むべく今年度からホームページを一新いたしました。ぜひこのホームページにつきましても会員の皆様からのご意見を頂き、魅力的な情報発信の場にしたいと考えております。

今後とも、様々な活動を通じて会員の皆様の研究のますますの発展に少しでも寄与できる学会をめざして努力したいと考えております。学会に対する要望などございましたら、会長あるいはお近くの理事、評議員、または学会事務局までお寄せください。皆様のご支援をあらためてお願い申し上げ、ご挨拶に代えさせていただきます。

あかじ けんいち
京都薬科大学薬品科学教室
akaji@mb.kyoto-phu.ac.jp

オートファジー誘導物質としての 8-ニトロcGMP

1. はじめに

オートファジーは、恒常性維持や疾患の観点から爆発的な勢いで発展している研究分野である。本稿では、内因性のオートファジー誘導因子8-ニトロcGMPについて紹介する¹⁾。



有本 博一

2. 生体分子のニトロ化, 8-ニトロcGMPの発見

一酸化窒素 (NO) は、ガス状のシグナル分子である。血管弛緩因子として同定され、1998年にはノーベル生理学賞の対象となっている。細胞間を超えて拡散する性質があり、代表的な機能として可溶性グアニル酸シクラーゼの活性化 (cGMPの合成促進) が知られている。

NOは化学的反応性が高いラジカルなので、酸化、ニトロソ化、ニトロ化など生体分子と修飾反応をおこなう。これらの修飾は、生体分子の傷害と捉えられることもできる。実際、本稿に関連するニトロ化修飾、とくに、グアニン環8位のニトロ化については1990年代半ばに大島寛史教授、J. P. E. Spencer 教授らによってDNA/RNA 損傷の観点から活発に研究されていた。一方、熊本大学 (当時) の赤池孝章教授らは、グアニン環ニトロ化がDNA鎖以外にも存在し、炎症や細菌感染症に対して保護的に働くという逆向きの着想をもとに研究を進め、8-ニトロcGMPの細胞内存在を突き止めた (筆者も化学者として、この共同研究に参画した)²⁾。

8-ニトロcGMPは、穏和な条件下でシステイン残基と徐々に反応してS-グアニル化反応を起こす (図1, パネルA)。この予想外の反応性は、タンパク質機能に影響を与えると考えられた。実際、8-ニトロcGMPは、レドックスセンサーであるKeap1のシステイン残基と反応してNrf2を活性化し、細胞保護的な応答を起こすことが分かった²⁾。

3. 8-ニトロcGMPの生理機能解明を目指して: 蛍光プローブの利用^{3, 4)}

8-ニトロcGMP報告の翌年、新学術領域研究「活性酸素シグナル」が組織され、筆者は計画研究として本格的に生理機能解明の検討を始めた。化学出身の特徴を生かすべく、生細胞イメージング用8-ニトログアニン蛍光プローブの開発に着手した。プローブを培養細胞に投与すると粒子状の蛍光局在が観察され、これはリソソームマーカーとよく共局在した (図2)。また、8位にニトロ基を持たないグアニン蛍光プローブをコントロールとして投与すると、細胞質に広く分散し、ニトロ体の局在と明確な違いが見られた。

以上の知見は、8-ニトログアニン誘導体とリソソームを介する細胞内分解系の関係を示唆している。細胞内分解系の主たるものとして、ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジーがある。

4. 一酸化窒素シグナルとオートファジー

オートファジーは、酵母からは乳類まで幅広く存在する細胞内分解経路であり、恒常性維持には欠かせない。オートファゴソームとよばれる二重膜からなる小胞が生じ、内部に取り込まれた基質が分解、再利用される。私達が毎日合成しているタンパク質の大部分は、オートファジーにより供給されるアミノ酸に基づくと言われている。

化学合成した8-ニトロcGMPを培養細胞 (RAW264.7やA549) に投与すると、オートファゴソーム数が増加し、オートファジーが誘導されることがわかった (図1, パネルB)¹⁾。一口にオートファジーと言っても複数の経路が知られているが、この場合はAtg5に依存する古典的な経路でオートファジーを誘導することが明らかとなった。

オートファジー誘導におけるNOの役割は、十分に明らかになっていないが、LPS刺激条件下においてはNOと活性酸素の両方に依存してオートファジーが誘導されることが知られている。すなわちYuanらは、NO合成酵素 (NOS) の阻害剤を用いるとLPS処理した心筋細胞においてもオートファジーが抑制されることを示した⁵⁾。既に述べたように乳類細胞のLPS刺激によって8-ニトロcGMPが生じる。これらの事実を考え合わせると、NOに依存するオートファジー誘導において内因性8-ニトロcGMPが重要な役割を果たすと予想された。

5. 細菌排除に関わるオートファジーと8-ニトロcGMPの関係 (図3)¹⁾

オートファジーは、細胞内に侵入した病原体 (細菌やウイルス) の排除にも関与する。そこでA群連鎖球菌感染系 (GAS感染系) を用いて、8-ニトロcGMPの働きを調べた。この細菌は取り込みのちエンドソームから細胞質へ抜け出し、そこで認識されてオートファゴソームに捕捉されることが分かっている。

8-ニトロcGMPを培地に添加すると、GASに感染したマウスマクロファージ様RAW264.7では細菌排除が有意に促進された。同時にオートファゴソーム数も増加し、オートファジー活性化が示唆された。リソソームの機能 (オートファジーに必須) を阻害すると、GAS排除促進効果はキャンセルされるので、8-ニトロcGMPによる細菌排除促進は、化合物の直接的な抗菌活性によらないことが分かる。

細菌感染によりマクロファージ細胞内ではNOや活性酸素が生じる。結果として内因性の8-ニトロcGMPが生じるはずである。これは免疫細胞化学によって直接証明できた。各種の阻害剤を使って、内因性8-ニトロcGMP生成を抑制するとオートファジーが抑制され、GASの排除も遅延した。これらの観察は、抗菌オートファジーにおける8-ニトロcGMPの重要性を示唆している。同様の効果は、初代マクロファージ細胞でも見られ、*in vivo*における自然免疫応答の一端を表していると考えられた。

さて、飢餓による誘導と異なり、細菌感染によるオートファジー誘導は選択的とされる。つまり、狙った標的を選んで分解する機構があると考えられている。この関係で、上記の免疫細胞化学実験は、思いが

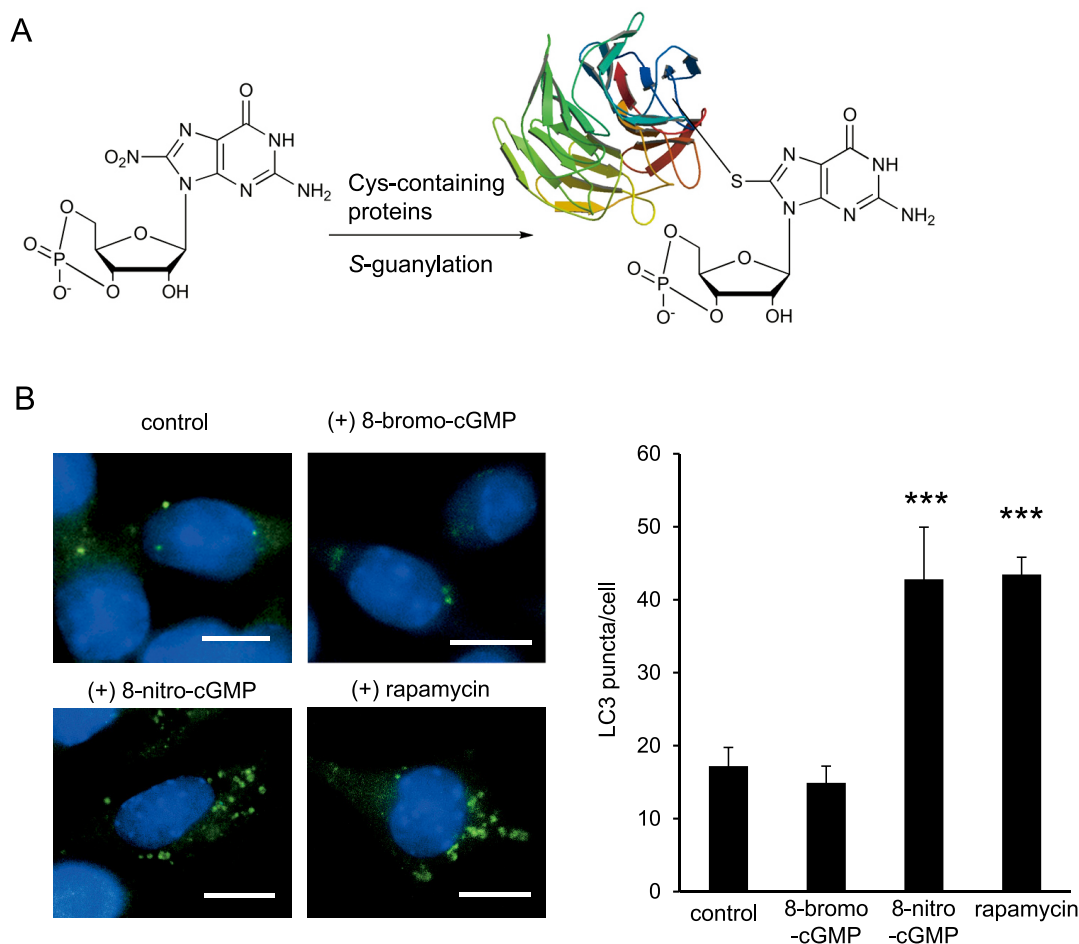


図1 8-ニトロcGMPによるタンパク質S-グアニル化反応 (パネルA, スケールバー 10 μ m), およびオートファジー誘導 (パネルB: RAW264.7細胞, 青 DAPI, 緑はオートファゴソーム, 8-ブromoおよび8-ニトロcGMP 100 μ M, ラパマイシン 200 nM) ¹⁾

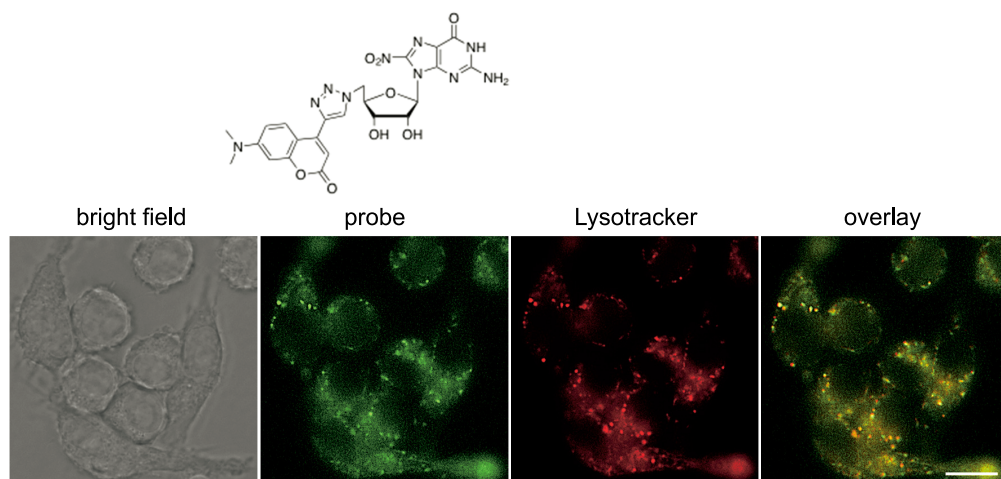


図2 ニトログアノシン蛍光プローブはリソソーム局在を示す (RAW264.7) ⁴⁾

けない発見をもたらすことになった。細菌 (GAS) の周囲にS-グアニル化修飾が観測されたのである。

このS-グアニル化は、細胞質において概ね半数のGASで確認された。一方、オートファゴソームに捕捉されたGASに注目すると、この割合は跳ね上がり、90%以上のGASにS-グアニル化修飾が見られた。S-グアニル化修飾が、選択的排除の目印である可能性が大きく浮上した。

オートファジーによる細菌の選択的捕捉過程で、ユビキチン鎖による標識化が一部の細菌 (サルモネラなど) で知られている。また、ユビキチン鎖がp62などのアダプタータンパク質を介してLC3タンパク質と結合し、オートファゴソーム形成を促進することも知られている。私達の結果から、S-グアニル化とユビキチン化の関係が疑われた。検討したところGAS表面のS-グアニル化はユビキチン修飾に先立って起こ

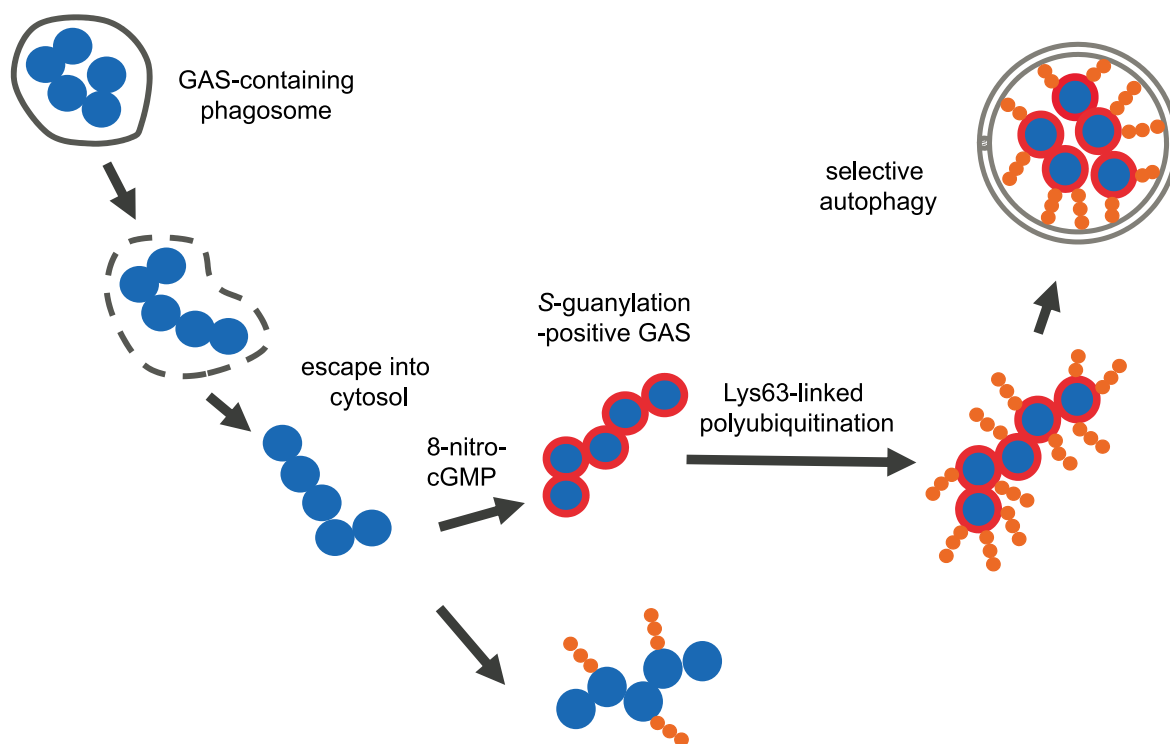


図3 内因性8-ニトロcGMPによる抗菌オートファジー誘導のモデル（青はA群連鎖球菌、赤はS-グアニル化、オレンジはユビキチン鎖、二重膜はオートファゴソームを表す）¹⁾

り、S-グアニル化されたGAS細胞が優先してユビキチン化を受けることが示唆された。実際、薬剤でS-グアニル化を抑制すると細菌周囲のユビキチン化は明確に抑制された（逆に、ユビキチン化の阻害は細菌のS-グアニル化レベルに影響を与えなかった）。つまり、8-ニトロcGMPは、単にオートファジーレベルを上げるだけでなく、分解対象の周囲に集積して、選択性を支配しているのである。

オートファジーに対する個々の病原体の応答は個々に違いがあり、今回GASで観察された8-ニトロcGMPの効果を全ての病原体に一般化するには、さらなる検討が必要である。一方、非感染条件下、S-グアニル化されたタンパク質が、同様にユビキチン化を受け、オートファジーによる分解を受ける初期的結果が得られている¹⁾。この事実は、S-グアニル化がユビキチン化を促進するメカニズムの一般性を想像させる。

6. オートファジー誘導のmTOR 依存性

近年の研究でオートファジーと癌、神経変性疾患、クローン病など様々な疾患との関係が証明されている。治療薬開発を目指して、オートファジーの促進と阻害の両方が検討されている。

化合物によるオートファジー活性化には、ラパマイシンがよく用いられる。ほ乳類細胞におけるラパマイシンの標的（mammalian target of rapamycin: mTOR）は、オートファジーのネガティブレギュレーターである。すなわち、mTORの機能を阻害すると、オートファジーが活性化される。しかしながら、mTORは、広汎なタンパク質の生合成を制御しているため、その特定の疾患の治療薬としては副作用が懸念される。そのため、mTOR非依存的経路によるオートファジー誘導に注目が集まっている。リチウムカチオンやトレ

ハロースなどがmTOR非依存的にオートファジーを誘導する⁶⁾。8-ニトロcGMPも、mTOR非依存的経路でオートファジーを誘導するので¹⁾、今後は活発な創薬展開が期待される。

7. おわりに

私達は、もともと（今も）天然物有機化学をバックグラウンドにしている。しかし、過去6年ほどで研究内容は大きくオートファジー研究にシフトすることになった。「牛に引かれて善光寺参り」という言葉がある。「これは」という分子に何処までも付いて行くことで、本来のバックグラウンドとかけ離れた、思いがけないところへ導かれる。今回は内因性低分子を研究対象としたことで細胞生物学への道が拓けた。研究開始当初はそこまで強く意図していた訳ではないが、「牛」の選択は運命の分かれ目である。

謝辞

今回紹介した研究は、伊藤千秋博士（現 金沢大がん進展研）、斎藤洋平博士（現 金沢大薬）を中心に進められた。抗菌オートファジーの評価は、中川一路教授、野澤孝志博士（京大院医）にご指導いただいた。8-ニトロcGMP全般の共同研究者である赤池孝章教授、澤智裕准教授、藤井重元博士（東大院医）にも深く感謝する。

引用文献

- 1) Ito, C.; Saito, Y.; Nozawa, T.; Fujii, S.; Sawa, T.; Inoue, H.; Matsunaga, T.; Khan, S.; Akashi, S.; Hashimoto, R.; Aikawa, C.; Takahashi, E.; Sagara, H.; Komatsu, M.; Tanaka, K.; Akaike, T.; Nakagawa, I.; Arimoto, H. Endogenous Nitrated Nucleotide Is a Key Mediator of Autophagy and

Innate Defense against Bacteria. *Molecular Cell*, **2013**, 52, 794-804.

- 2) Sawa, T.; Zaki, M. H.; Okamoto, T.; Akuta, T.; Tokutomi, Y.; Kim-Mitsuyama, S.; Ihara, H.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Fujii, S.; Arimoto, H.; Akaike, T. Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Nature Chem. Biol.* **2007**, 3, 727-735.
- 3) Saito, Y.; Taguchi, H.; Fujii, S.; Sawa, T.; Kida, E.; Kabuto, C.; Akaike, T.; Arimoto, H. 8-Nitroguanosines as chemical probes of the protein S-guanylation. *Chem. Commun.* **2008**, 5984-5986.
- 4) Saito, Y.; Ito, C.; Fujii, S.; Sawa, T.; Akaike, T.; Arimoto, H. Fluorescent probes for live cell imaging of endogenous guanine nitration. *ChemBioChem* **2013**, 14, 1068-1071.
- 5) Yuan, H., Perry, C.N., Huang C. et al.: LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, 296, H470-H479.
- 6) Fleming, A., Noda, T., Yoshimori, T.; Rubinsztajn, D. C. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nature Chem. Biol.* **2011**, 7, 9-17.

ありもと ひろかず
東北大学大学院生命科学研究科
arimoto@biochem.tohoku.ac.jp

ポリフェノールの高度利用を目指した エステラーゼ研究

1. はじめに

フィトケミカルはさまざまな分野での応用が進められている。その中には、多様なフェノール酸エステル化合物、フラボノイド配糖体などがあり、食品においては、その味や加工特性に関わり、また、これらは抗酸化性、抗菌性、メタボリックシンドロームパラメーター改善効果など有用機能を有するものが多い。このうち、タンニンやカテキンには没食子酸がデプシド結合（エステル結合）で存在し、茶飲料においてはそれが不溶化して白濁（クリームダウン）する原因となっている。クリームダウンの防止やビールの清澄化等のために、没食子酸を加水分解するタンナーゼが利用されている。また、没食子酸自体にも抗酸化性等の有用機能があり、カテキン分解物は機能性を向上させることができる。タンナーゼに関する研究は古く、1960年代に*Aspergillus oryzae*の酵素の性質が報告され¹⁾、茶飲料の加工など温故知新的な特徴がある一方で、有用健康機能が見つかったカテキンおよびタンニンのタンナーゼを介した脱没食子酸による可溶化、また、没食子酸自体にも抗酸化性等の機能があり没食子酸の酵素抽出、さらに、エラグタンニンの構造は複雑であることから



小関 卓也

エラグタンニンの構造決定へのタンナーゼの利用など、酵素利用技術の開発が期待できる。また、植物糖質素材はバイオ燃料、パルプ、食品そして飼料など、工業分野や食品分野に応用可能である。植物糖質のうち、イネ科植物の細胞壁の構成成分はヘミセルロースの割合が20-40%と比較的高く、植物バイオマスを酵素糖化するにはセルロースに加えてヘミセルロースを効率よく分解することが必要である。ヘミセルロースの一つであるキシランは1,4-β-キシロースのポリマーを主鎖として側鎖にアラビノフラノース、O-メチルグルクロン酸、フェルラ酸およびp-クマール酸を含み、また、一部のキシロースはアセチル化されている。ヘミセルロースを効率よく分解するには主鎖を加水分解する酵素に加えて側鎖の基質を分解するアクセサリ酵素と呼ばれるα-L-アラビノフラノシダーゼ、α-グルクロニダーゼ、フェルラ酸エステラーゼ、アセチルキシランエステラーゼの存在が不可欠である。一方、食品機能の面からフェルラ酸エステラーゼの有効性が報告されてきている。例えば、乳酸菌などの腸内細菌がフェルラ酸エステラーゼを分泌することで食物繊維が分解されてフェルラ酸が遊離する²⁾。フェルラ酸は血圧降下、コレステロール低下、血糖値低下などの作用を有し、ヒトの腸管から吸収されたフェルラ酸は生活習慣病の予防・改善が期待される³⁾。このようにフェルラ酸エステラーゼはバイオ燃料生産に重要であるばかりでなく、生理活性物質として有用なフェルラ酸の抽出など、産業上有用な酵素の一つと考えられる。本稿では麹菌由来のタンナーゼおよびフェルラ酸エステラーゼの触媒作用を紹介する。

2. *A. oryzae* タンナーゼ

天然には様々な形態のタンニンおよびカテキンが存在する。没食子酸（3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸）がデプシド結合したカテキンは、（+）および（-）カテキンガレート（（+）-Cgおよび（-）-Cg）、（+）および（-）エピカテキンガレート（（+）-ECgおよび（-）-ECg）、（+）および（-）エピガロカテキンガレート（（+）-EGCgおよび（-）-EGCg）などのように化学構造の異なるカテキンが存在する。タンナーゼは没食子酸を加水分解するが、*A. oryzae*では2つのタンナーゼ遺伝子が報告されている^{4,5)}。しかしながら、詳細な基質特異性などの機能解析に関する報告はなかった。また、*A. oryzae* タンナーゼの成熟タンパク質は翻訳後の修飾過程で2つのヘテロサブユニットからなると報告されている⁴⁾。このような背景を踏まえ、筆者らは*A. oryzae* 由来の市販タンナーゼ製剤から精製したネイティブタンナーゼと*A. oryzae* RIB40由来のタンナーゼ遺伝子（*AotanaA*）を*Pichia pastoris*を用いて発現させたりコンビナント酵素を用いて基質特異性などの解析を行った⁶⁾。SDS-PAGEからネイティブ酵素およびリコンビナント酵素とも45 kDa-70 kDaの幅広いバンドを示し、高度にN糖鎖修飾されていることが分かった（図1）。エンドグリコシダーゼH処理後ではそれぞれのタンパク質で30kDaと32kDa、30kDaと34kDaの2つのバンドが確認できた（図1）。リコンビナント酵素で脱糖鎖処理後の2つのバンドのN末端配列を調べたところ、34kDaタンパク質は

AoTanAのN末端ドメインに発現ベクター由来で酵母 α -ファクターシグナル配列に由来する5アミノ酸が付加した産物、30kDaタンパク質はAoTanAのArg316以降のC末端ドメイン産物であることが分かり、リコンビナントタンパク質においても翻訳後修飾が示唆された。熱安定性は両酵素とも40℃まで安定で、50℃ではネイティブ酵素は70%以上の活性を保持していたのに対し、リコンビナント酵素は約40%と違いがみられた。両酵素の脱N-糖鎖処理を行い熱安定性を測定し

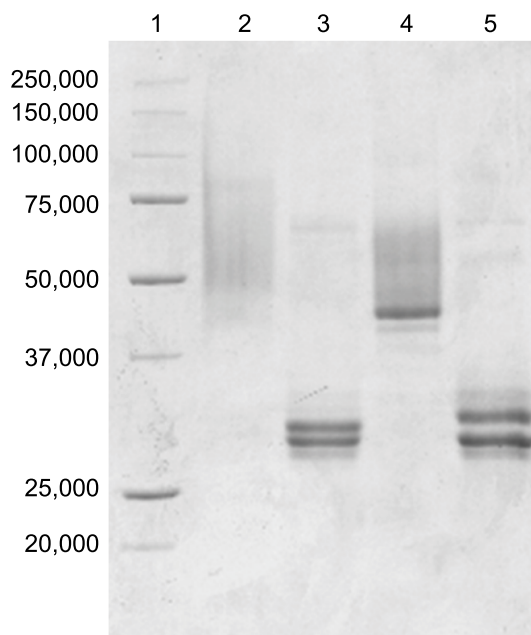


図1 精製した野生型およびリコンビナントタンナーゼとエンドグリコシダーゼH（エンドH）処理後のポリアクリルアミドゲル電気泳動
レーン1、スタンダードタンパク質；レーン2、野生型タンナーゼ；レーン3、エンドH処理後の野生型タンナーゼ；レーン4、リコンビナントタンナーゼ；レーン5、エンドH処理後のリコンビナントタンナーゼ。

たところ、40℃で残存活性が低下しはじめ、50℃ではほとんど活性が消失した。この結果からN糖鎖が耐熱性に寄与することが示唆された。タンナーゼ基質に対する比活性はリコンビナント酵素よりもネイティブ酵素の方がわずかに高い傾向を示し、合成基質より天然基質に対して触媒効率が高く、(-)-ECgに対して最も高かった（表1）。基質特異性は基質構造の違いにより触媒効率が異なることから、ポリフェノールの化学構造も関係していることが推定できる。

3. *A. oryzae*フェルラ酸エステラーゼ

フェルラ酸エステラーゼは、2004年の時点で、表2に示すようにアミノ酸配列の相同性と4つの合成基質に対する特異性でタイプA-Dの4タイプに分類された。また、エステル加水分解酵素を分類しているESTHERデータベース (<http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER>)⁷⁾ においてはリパーゼやタンナーゼファミリーなどに分類される。その中で、タイプCのフェルラ酸エステラーゼはESTHERデータベースにおいてはタンナーゼファミリーに属している。*A. oryzae* 由来のタンナーゼファミリーに属する遺伝子は11個同定され、他のカビ由来に比べて数が多い。その中でいくつかの遺伝子の特徴付けた。AO090001000066 (aspor_q2up89) はタンナーゼファミリーに分類されたフェルラ酸エステラーゼの一つであったが、基質特異性はタイプCではなく、タイプBであったためAoFaeBと名付けた⁸⁾。AoFaeBのアミノ酸配列はAoTanAと類似しているが、タンナーゼ活性はなく、しかしながら、既知のクロロゲン酸エステラーゼとの類似性はなかったものの、クロロゲン酸（カフェオイルキナ酸）に対する分解性を示した。従って、フェルラ酸エステラーゼの基質特異性による分類は、必ずしもアミノ酸配列の相同性による分類とは対応しないことが分かる。

4. 新規エステラーゼ

筆者らはフェルラ酸エステラーゼやタンナーゼの活性中心セリン残基近傍のアミノ酸配列が保存され

表1 ネイティブ及びリコンビナントタンナーゼの触媒パラメーター

酵素	基質	K_m $\times 10^{-3} \text{M}$	$V_{\max}$ $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	k_{cat} s^{-1}	k_{cat}/K_m $\times 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
ネイティブ	MGA	1.02 ± 0.09	67.7 ± 2.2	70.2 ± 2.3	69.2
	EGA	0.86 ± 0.41	18.3 ± 9.8	19.0 ± 10.1	22.1
	PGA	1.12 ± 0.28	18.0 ± 2.9	18.6 ± 3.0	16.6
	(-)-Cg	0.45 ± 0.11	76.9 ± 8.4	79.8 ± 8.7	179.3
	(-)-ECg	0.34 ± 0.11	99.7 ± 19.2	103.4 ± 19.9	308.8
	(-)-EGCg	0.32 ± 0.11	83.0 ± 16.8	86.1 ± 17.4	273.4
リコンビナント	MGA	1.97 ± 0.49	58.0 ± 6.4	60.2 ± 6.6	30.6
	EGA	1.30 ± 0.23	9.4 ± 1.4	9.8 ± 1.5	7.54
	PGA	1.38 ± 0.02	19.7 ± 1.4	20.5 ± 1.5	14.9
	(-)-Cg	0.47 ± 0.08	62.2 ± 0.2	64.5 ± 0.2	137.3
	(-)-ECg	0.23 ± 0.07	65.1 ± 13.2	67.5 ± 13.7	293.6
	(-)-EGCg	0.26 ± 0.01	59.9 ± 9.1	62.1 ± 9.5	234.0

MGA, メチルガラレート; EGA, エチルガラレート; PGA, プロピルガラレート; (-)-Cg, (-)-カテキンガラレート; (-)-ECg, (-)-エピカテキンガラレート; (-)-EGCg, (-)-エピガロカテキンガラレート

ているものの、それらとは異なるクラスターに分類される酵素遺伝子が存在することを見だし、*A. oryzae* 由来の遺伝子をゲノム情報を利用して探索し、AO090023000615 (aspor_q2uh24) の機能を解析した。AO090023000615リコンビナント酵素の最適 pH は7.0, pH5.0-9.0において安定で、最適温度は45℃, 50℃まで安定であった。基質特異性はフェルラ酸エステラーゼ基質のMFA, MpCA, MCA, MSA, タンナーゼ基質の没食子酸メチル (3,4,5-トリヒドロキシ安息香酸メチル; MGA) および(-)-ECg 並びに(-)-EGCg, さらに3,4-ジヒドロキシ安息香酸メチルには活性を示さず、興味深いことに、4-ヒドロキシ安息香酸エチル (E4HBA), 4-ヒドロキシ安息香酸プロピル (P4HBA), 4-ヒドロキシ安息香酸ブチル (B4HBA) に対して活性を示した (図2)。これら4-ヒドロキシ安息香酸エステル類はパラベンと称され、抗菌剤として食品、日用品、化粧品等に配合されている。糸状菌由来のパラベンエステラーゼは初めて見出され、本酵素をAoPrbAと名付けた⁹⁾。本酵素はパラベンを加水分解するが、フェルラ酸エステラーゼ活性やタンナーゼ活性は示さず、基質特異性の狭いエステラーゼであり、パラベンの一つであるブチル4-ヒドロキシ安息香酸エステルのカビに対する抗菌性は本酵素の作用により消失

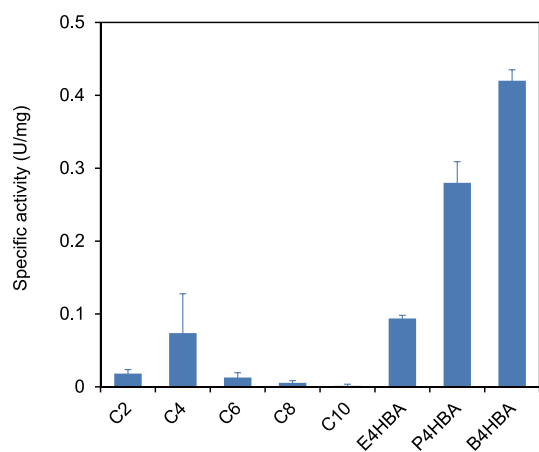


図2 α-ナフチルエステル類 (C2-C10) およびパラベン (E4HBA, P4HBA, B4HBA) に対する比活性

した (図3)。

5. タンナーゼファミリーのユニークなモチーフ

フェルラ酸エステラーゼの触媒残基はSer, Asp, Hisのcatalytic triadで構成され、リパーゼおよびセリンプロテアーゼと同様の触媒機構で、その構造はα/βヒドロラーゼフォールドを有している。最近、*A. oryzae* 由来フェルラ酸エステラーゼ (AoFaeB) の結晶構造を明らかにした¹⁰⁾。本酵素の構造は触媒ドメインとlidドメインの2つのドメインから構成され、これまで報告のない大きなlidドメインと、触媒残基のSer, His残基の隣のそれぞれのCys残基がジスルフィド結合を形成するユニークなモチーフを有することがわかり、CS-D-HCモチーフと名付けた。また、CysをAlaに置換した変異酵素は活性が1/1000程度に低下した。このモチーフはタンナーゼファミリーに共通して見いだされ、このファミリーのタンパク質に重要な構造の一つと推察される。

6. おわりに

本稿ではポリフェノールの利用に関わるタンナーゼやフェルラ酸エステラーゼの構造と機能について紹介してきたが、本酵素はバイオマスの効率的分解に寄与するとともに、食品素材の開発の面からも重要であることがわかってきた。麹菌ゲノム情報を基にした酵素の構造解析が一段と進み、機能との関連性が明らかに

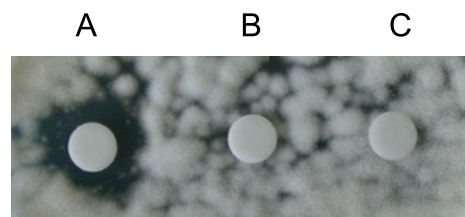


図3 *A. oryzae*に対するブチル4-ヒドロキシ安息香酸 (B4HBA)の抗微生物活性に及ぼすAoPrbAの影響 A; B4HBA (1.0 μM), B; B4HBA (1.0 μM)+AoPrbA (5.0 μg), C; B4HBA (1.0 μM)+AoPrbA (10.0 μg)をペーパーディスクに添加し、PD寒天培地で*A. oryzae*を30℃, 4日間培養

表2 アミノ酸配列の類似性と4種類の桂皮酸メチルエステルに対する特異性に基づいたフェルラ酸エステラーゼの分類

項目	Type A	Type B	Type C	Type D
基質特異性	MpCA MFA MSA	MpCA MCA MFA	MpCA MCA MFA MSA	MpCA MCA MFA MSA
ESTHERデータベースでの帰属	Lipase_3	Esterase_PHB	Tannase	α β_hydrolase
ジフェルラ酸遊離能	有 (5-5')	無	無	有 (5-5')
糸状菌での報告例	<i>Aspergillus niger</i> FaeA <i>Aspergillus tubingensis</i> FaeA <i>Aspergillus awamori</i> FaeA <i>Talaromyces stipitatus</i> FaeA	<i>Penicillium funiculosum</i> Fae-1 <i>Fusarium oxysporum</i> FaeB <i>Aspergillus niger</i> AxeA <i>Aspergillus oryzae</i> AxeA <i>Aspergillus ficcum</i> AXE	<i>Aspergillus niger</i> FaeB ^a <i>Aspergillus oryzae</i> FaeB ^a , FaeC <i>Aspergillus nidulans</i> FaeB ^a <i>Talaromyces stipitatus</i> FaeC	<i>Neurospora classa</i> FaeD <i>Aspergillus clavatus</i> Fae <i>Coprinopsis cinerea</i> Est1

^a, 基質特異性はタイプBの特異性を示す

されることにより、今後の応用展開が期待される。

最後に、本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻・伏信進矢先生との共同研究によるものです。また、寄稿の機会を与えていただ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) Iibuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K., Studies on tannin acyl hydrolase of microorganisms part III. Purification of the enzyme and some properties of it. *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 803-809 (1968).
- 2) Guglielmetti, S., Noni, I. D., Caracciolo, F., Molinari, F., Parini, C. and Mora, D., Bacterial cinnamoyl esterase activity screening for the production of a novel functional food product. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 1284-1288 (2008).
- 3) Poquet, L., Clifford, M. N. and Williamson, G., Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metabol. Dispos.*, **36**, 190-197 (2008).
- 4) Hatamoto, O., Watarai, T., Kikuchi, M., Mizusawa, K. and Sekine, H., Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, **175**, 215-221 (1996).
- 5) 町田ら, タンナーゼ, その遺伝子及びタンナーゼの製造法, 特許4370395 (2009).
- 6) Mizuno, T., Shiono, Y. and Koseki, T., Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*. *J. Biosci. Bioeng.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.04.003>
- 7) Lenfant, N., Hotelier, T., Velluet, E., Bourne, Y., Marchot, P. and Chatonnet, A., ESTHER, the database of the alpha/beta-hydrolase fold superfamily of proteins: tools to explore diversity of functions. *Nucleic Acids Res.*, **41**, D423-429 (2013).
- 8) Koseki, T., Hori, A., Seki, S., Murayama, T. and Shiono, Y., Characterization of two distinct feruloyl esterases, AoFaeB and AoFaeC, from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 689-696 (2009).
- 9) Koseki, T., Mihara, H., Murayama, T. and Shiono, Y., A novel *Aspergillus oryzae* esterase that hydrolyzes 4-hydroxybenzoic acid esters. *FEBS Lett.*, **584**, 4032-4036 (2010).
- 10) Suzuki, K., Hori, A., Kawamoto, K., Thangudu, R. R., Ishida, T., Igarashi, K., Samejima, M., Yamada, C., Arakawa, T., Wakagi, T., Koseki, T. and Fushinobu, S., Crystal structure of a feruloyl esterase belonging to the tannase family: a disulfide bond near a catalytic triad. *Proteins*, accepted.

こせき たくや
山形大学農学部食料生命環境学科
tkoseki@tdsl.tr.yamagata-u.ac.jp

タンパク質間相互作用を阻害する ペプチド医薬の開発

1. はじめに

我々の体を構成する1つ1つの細胞の中には、酵素を含む無数のタンパク質が存在し、我々の想像の域を遥かに超える非常に複雑なネットワークにより細胞の機能を制御している。一方で、酵素が活性化すべきでない時に異常に活性化したり、または活性化すべき時に不活性化したりなど、その制御が正常に保たれなくなると、神経変性疾患など多くの病変が引き起こされる。そこで以前より、特定の酵素を特異的に阻害する化合物の探索が盛んに行われてきた。その阻害剤の標的となる部位の多くは酵素の活性中心であるが、カルパインやカテプシン、カスパーゼといった多くの類似の分子種から成るスーパーファミリーを形成する酵素群に対しては、阻害剤の特異性が低いという傾向があった。また、細胞質とミトコンドリア、細胞質と核、細胞質と小胞体などといった2つ以上のオルガネラに、類似のまたは同種の酵素が存在する場合、活性中心を標的とした従来の阻害剤では両方の機能が阻害されてしまい、細胞が正常に機能していく上でむしろ不利益となる場合も多かった。例えば、Ca²⁺依存性中性システインプロテアーゼであるカルパインの阻害剤では、ミトコンドリアに存在するカルパインだけでなく細胞質にあるカルパインも阻害されてしまうため、細胞の機能が破綻してしまうという懸念があった。そこで我々は、ある1つの酵素が分子シャペロンや足場タンパク質など別のタンパク質と結合して活性が制御されている場合、その相互作用を合成ペプチドによって競合的に阻害することによって活性を特異的に抑えることは出来ないものかと考えた。本稿では、我々がこれまで明らかにしてきたミトコンドリアカルパインの機能とその特異的阻害法の原理、阻害ペプチドの探索法、細胞内への送達方法、網膜の視細胞変性に対するペプチドの効果について概説する。



尾崎 拓

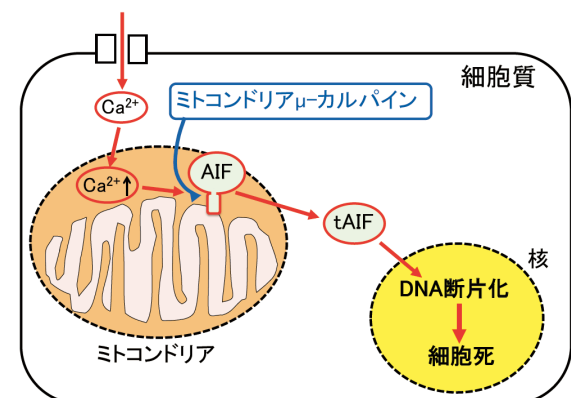
2. ミトコンドリアカルパインとその生理機能

カルパインは活性化にCa²⁺を必要とする細胞内システインプロテアーゼで、基質分子を限定分解することで様々な細胞機能を調節する¹⁾。哺乳類では14種類の分子種が存在し、 μ -カルパインやm-カルパインなど組織普遍的に存在するものと、カルパイン3など組織特異的に存在するものがある。これら全てのカルパイン分子種は細胞質にのみ存在すると考えられていたが、ミトコンドリアにもカルパイン様活性をもつプロテアーゼが存在するという知見がいくつか報告されていた。そこで我々は、ラット肝臓のミトコンドリアからカルパイン様のプロテアーゼを精製したところ、ミトコンドリアにも少なくとも2種のカルパイン分子が存在していることを明らかにした²⁻⁴⁾。その1つであるミトコンドリア μ -カルパインの生理機能を図1に示した。ミトコンドリア μ -カルパインは、ミトコンドリア内のCa²⁺の上昇に伴って活性化し、基質となるア

ポトシス誘導因子 (AIF: Apoptosis-Inducing Factor) のN末端を限定的に分解することによって、AIFをミトコンドリア内膜から切り離す。限定分解されたAIF (tAIF: truncated AIF) は、ミトコンドリアから細胞質、さらには核へ移行し、DNAaseを活性化させることによりDNAの断片化を誘導する。DNAの断片化が起こると細胞は死に至る。このAIFを介した細胞死は、網膜色素変性や虚血性脳疾患、アルツハイマー、心筋梗塞、シスプラチン誘導性腎障害などで起こると言われている。我々は、網膜色素変性モデルラットにおける視細胞変性の初期にミトコンドリアカルパインが活性化して、AIF依存性の視細胞死が誘導されることを明らかにした⁵⁾。そこで我々は、ミトコンドリアカルパインを特異的に阻害することによって視細胞変性を抑制しようと考え、ミトコンドリアカルパインの特異的阻害ペプチドの開発に着手した。

3. 合成ペプチドによる特異的阻害法の原理

ミトコンドリア μ -カルパインはERp57と呼ばれる分子シャペロンと結合している (図2)。そこで我々は、カルパイン由来の合成ペプチドによりこの結合を競合的に阻害することを試みた。抗体と抗原の結合が抗体認識部位のペプチドを作用させることによって解除さ



動物細胞

図1 ミトコンドリア μ -カルパイン依存的細胞死の機構

れるという原理を基にしたものである。すなわち、ミトコンドリア μ -カルパインとERp57が結合している部位に相同的な配列の合成ペプチドを作用させることによって、その結合を解除させ、ミトコンドリア μ -カルパインを不安定化または不活性化させようとする試みであった。分子シャペロンと結合して存在する多くのタンパク質は、分子シャペロンと解離すると、正常に機能しなくなる場合が多いことから、ミトコンドリア μ -カルパインを特異的に阻害するにはこの方法が最適だと考えた。

4. ミトコンドリア μ -カルパインを特異的に阻害するペプチドの開発

ミトコンドリア μ -カルパイン特異的阻害ペプチドの開発を始めようとした当初、ミトコンドリア μ -カルパインとERp57の結合部位はまだ解明されていなかった。しかしながら、細胞質 μ -カルパインとミトコンドリア μ -カルパインは構造維持ドメインのアミノ酸配列が一部異なっていることを示唆する実験データを得ていたため、おそらくこのドメインのどこかにERp57が結合しているのではないかと考えた。そこで、この構造維持ドメインのアミノ酸をN末端側から20残基毎に分割し、赤色で示すように3残基ずつ重複させて、全部で14本のペプチドを合成した (図3)。

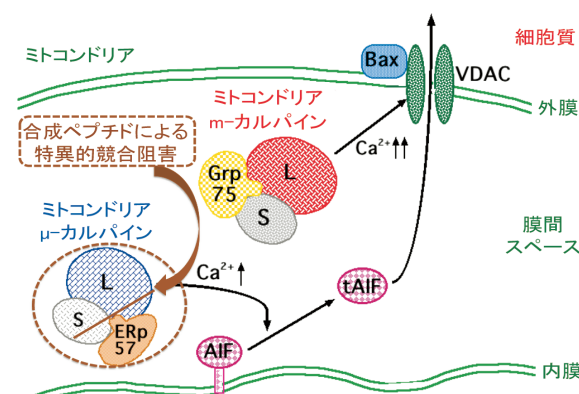


図2 合成ペプチドによるミトコンドリア μ -カルパインの特異的競合阻害

1	MAEELITPVY	CTGVSAQVQK	QRDKELGLGR	HENAIKYLQ	DYENLRARCL	QNGVLFQDDA
61	FPPVSHSLGF	KELGPNSSKT	YGIKWKRPT	LLSNPQFIVD	GATRTDICQG	ALGDCWLLAA
121	IASLTNETI	LHRVVPYQGS	FQEGYAGIFH	FQLWQFGEW	DVVVDDLPT	KDGKLVFVHS
181	AQGNEFWSAL	LEKAYAKVNG	SYEALSGGCT	SEAFEDFTGG	VTEWYDLQKA	PSDLYQIILK
241	ALERGSLG	SINISDIRDL	EAITFKNLVR	GHAYSVTDK	QVTYQGQVRN	LIRMNPWGE
301	VEWKGPWSDN	SYEWNKVDY	EREQLRVKME	DGEFWMSERD	FIREFTKLEI	CNLTDPALKS
361	RTLNRNNTIF	YEGTWRRGST	AGGRNYPAT	FWVNPQFKIR	LEEVDADDY	DSRESGCSFL
421	LALMQKHRRR	ERRFGRDMET	IGFAVYQVPR	ELAQPVHLK	RDFFLANASR	AQSEHFNLRL
481	EVSNRIRLPP	GEYIVVPSTF	EPNKEGDFLL	RFFSEKKACT	QLDDQIQAN	LPDEKVLSE
541	EIDDNFKTLF	SKLAGDMEI	SVKELQTIIN	RIISKHKDLR	TNGFSLESCR	SMVNLMDRDG
601	NGKLGLEVEFN	ILWNRIRNYL	TIFRKFDLDK	SGSMSAYEMR	MAIEAAGFKL	NKKLHELIIT
661	RYSEPDLAVD	FDNFVCCCLR	LETMFRFFKI	LDTLDGVVT	FDLFWLQLT	MFA

図3 μ -カルパイン構造維持ドメインの部分ペプチド

各ドメイン

活性制御

活性中心

構造維持

Ca²⁺結合

次に、どのペプチドがミトコンドリア μ -カルパインの活性を阻害するか試験管内で調べた結果、N末端から2番目と9番目のペプチドが活性を特異的に阻害することが分かった⁶⁾。さらに、この2種のペプチドをミトコンドリア μ -カルパインに作用させたところ、ERp57との解離が誘導され、他のプロテアーゼにより分解されることも示された⁶⁾。続いて、活性阻害効果のあった2種のペプチドの位置を調べた(図4)。N末端から2番目のペプチドを青色、9番目のペプチドを黄色で示した。驚くべきことに、この2種のペプチドが由来する部位は、活性ドメインと構造維持ドメインに存在するアミノ酸の側鎖が塩架橋(Salt Bridge)を形成している立体構造上とても重要な部位であった。この塩架橋部位にERp57が結合して、ミトコンドリア μ -カルパインを安定化していることが示唆された。2種の合成ペプチドによりミトコンドリア μ -カルパインとERp57の結合を解離させることに成功した。

5. 膜透過ペプチドの付加による細胞内への送達

ミトコンドリア μ -カルパインに対して阻害効果のあった2種のペプチドを、細胞内さらにはミトコンドリアへ効率よく送達させるため、阻害効果のある領域を20残基から10残基まで限定した。その過程で、N末端側から9番目のペプチドは阻害効果を失ったため、N末端側から2番目のペプチドのみを選んで以後の

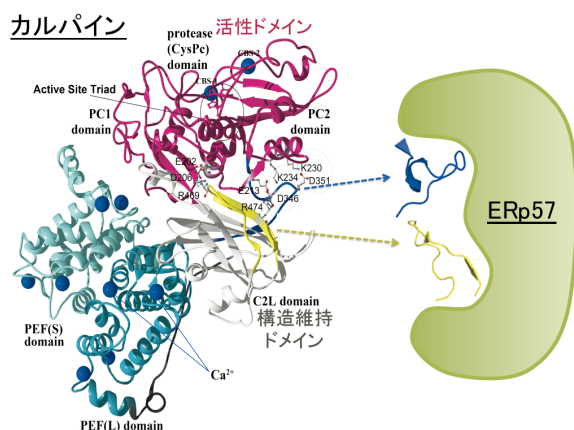


図4 カルパインの立体構造における活性阻害ペプチドの位置と活性阻害機構

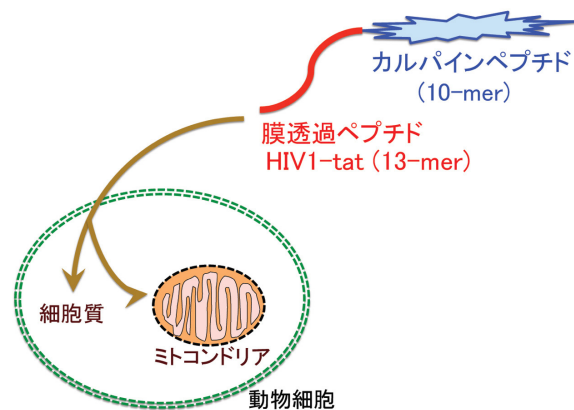


図5 膜透過ペプチドHIV1-tatによる細胞内へのペプチド送達

実験に使用した。まず、膜透過ペプチドをカルパインペプチドのN末端またはC末端に付加して、ペプチドを効率よく細胞内に取り込ませようと試みた(図5)。HIV1-tatやオリゴアルギニンなどの膜透過性のあるペプチドを用いて、動物細胞へ特定のペプチドやタンパク質などを導入する方法は確立されつつある⁷⁾。既に報告されている数種類の膜透過ペプチドを試した結果、HIV1-tatをカルパインペプチドのN末端に付加したものが、最も高い活性阻害効果を示した⁶⁾。培養細胞を用いて、実際にHIV1-tatを付加したカルパインペプチド(Tat- μ CL)が細胞内、さらにはミトコンドリアまで送達されているのか確かめたところ、核および細胞質、ミトコンドリアへ送達されていることが分かった。さらにラットを用いて硝子体投与または点眼投与を施したところ、視細胞を含む網膜の各細胞へTat- μ CLが送達されていることが確認された⁶⁾。

6. 網膜の視細胞変性に対するミトコンドリア μ -カルパイン阻害ペプチドの効果

我々の以前の研究により、網膜の視細胞変性の初期に、ミトコンドリアカルパインが活性化し、AIF依存性の細胞死を引き起こすことが示された⁵⁾。そこで、網膜視細胞変性モデルラットでみられる網膜変性に対してTat- μ CLが保護効果を示すか否かを調べた。視細胞変性モデルラットへTat- μ CLを硝子体内注射または点眼投与したところ、視細胞変性が有意に抑制され、視機能の低下を抑えることができた^{6,8)}。従って、Tat- μ CLは網膜視細胞変性に対する治療薬として期待されている。また、虚血・再灌流誘導性の網膜神経節細胞死に対してもペプチドの保護効果が示されたことから、神経節細胞死が観察される緑内障に対しても治療効果を有する可能性が見い出された。さらに、ミトコンドリア μ -カルパインやAIFが関与する虚血性脳疾患など網膜視細胞変性以外の多くの疾患に対しても治療効果を有する可能性が高いと考えられる。

7. おわりに

本稿では、合成ペプチドによりタンパク質-タンパク質間の結合を解除することによって、ある特定のタンパク質の機能を特異的に阻害するという新たなペプチド医薬の概念を紹介した。この手法は、ミトコンドリアカルパインに限らず、様々な疾患に関わる多くのタンパク質を標的としたペプチド医薬の開発に広く利用できると信じている。

本稿で紹介させて頂いた研究は、弘前大学農学生命科学部石黒誠一教授、岩手大学農学部山下哲郎准教授、弘前大学大学院医学研究科中澤満教授ならびに上野伸哉教授を始めとする多くの方々の御指導を賜りながら実施してきたものです。その方々に、この場をお借りして深く感謝申し上げます。また、このような寄稿の機会を与えて頂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、心より御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Ono Y, Sorimachi H., Calpains: an elaborate proteolytic system., *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1824(1): 224-236.
- 2) Ozaki T, Tomita H, Tamai M, Ishiguro S., Characteristics

of mitochondrial calpains., *J. Biochem.*, 2007, 42(3): 365-376.

- 3) Ozaki T, Yamashita T, Ishiguro S., ERp57-associated mitochondrial μ -calpain truncates apoptosis-inducing factor., *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, 1783(10): 1955-1963.
- 4) Ozaki T, Yamashita T, Ishiguro S., Mitochondrial μ -calpain plays role in release of truncated apoptosis-inducing factor from mitochondria., *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, 1793(12): 1848-1859.
- 5) Mizukoshi S, Nakazawa M, Sato K, Ozaki T, Metoki T, Ishiguro S., Activation of mitochondrial calpain and release of apoptosis-inducing factor from mitochondria in RCS rat retinal degeneration., *Exp. Eye Res.*, 2010, 91(3): 353-361.
- 6) Ozaki T, Nakazawa M, Yamashita T, Sorimachi H, Hata S, Tomita H, Isago H, Baba A, Ishiguro S., Intravitreal injection or topical eye-drop application of a μ -calpain C2L domain peptide protects against photoreceptor cell death in Royal College of Surgeons' rats, a model of retinitis pigmentosa., *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1822(11): 1783-1795.
- 7) Futaki S, Hirose H, Nakase I., Arginine-rich peptides: methods of translocation through biological membranes., *Curr. Pharm. Des.*, 2013, 19(16): 2863-2868.
- 8) Ozaki T, Ishiguro S, Hirano S, Baba A, Yamashita T, Tomita H, Nakazawa M., Inhibitory peptide of mitochondrial μ -calpain protects against photoreceptor degeneration in rhodopsin transgenic S334ter and P23H rats., *PLoS One*, 2013, 8(8): e71650.

おごき たく
弘前大学大学院医学研究科
t-ozaki@cc.hirosaki-u.ac.jp

高度にN-メチル化された生物活性ペプチドの簡便合成法の開発

1. はじめに

N-メチル化されたペプチドは天然有機化合物中に多く見受けられ、多様な生物活性を示す。例えばシクロスポリンA (CsA) は、N-メチルアミノ酸 (MeAA) を7残基含む天然環状ペプチドであり、臓器移植時の拒絶反応の抑制をはじめとして様々な自己免疫疾患の治療に用いられている。CsAのアナログ体であるAlisporivir (DEBIO-025) は、免疫抑制剤としての効果はないが抗C型肝炎ウイルス薬候補として有望であり、現在臨床試験が行われている。一方、生物活性ペプチドのN-メチル化アナログは、凝集阻害や代謝安定性・脂溶性の向上などに有効であり、ペプチド創薬の観点からも注目を集めている¹⁾。

N-メチル化ペプチドを合成する最も単純な方法は、



山田 圭一

MeAAをビルディングブロックとして通常のペプチド合成と同様に伸長反応を行うことである。保護 MeAAの合成は、古くから行われており²⁾、一部は市販品として入手可能である。また、N-メチル化ペプチドの合成に適した縮合剤 (PyBrop, CIP-HOAt, BEP/BEMT など)³⁾ が開発され、N-メチル化天然ペプチドの全合成研究を通じてその有用性が示されてきた。さらには、福山アミン合成を応用したoNBS-SPPS (oNBS = 2-nitrobenzenesulfonyl) も開発され、保護 MeAAを用意せずとも配列中の任意の位置にMeAAを導入したペプチドの合成が可能である⁴⁾。このようにN-メチル化ペプチドの化学は、合成手法の開発と共に日々進化してきた。本稿ではN-メチル化ペプチドの化学合成について筆者らの研究を交えながら紹介したい。

2. 位置選択的N-メチル化を利用したペプチドの配座解析

種々のアミド化合物をDMF中で過剰のCH₃IとAg₂Oを作用させると収率よくN-メチルアミドが得られる。この方法は保護アミノ酸のN-メチル化にも適用でき、簡便に保護 MeAAが得られる⁵⁾。筆者の恩師である川井正雄先生らは、高分解能NMRが十分普及していない時代にこの反応を生理活性ペプチドに適用し、得られたN-メチル化生成物のアミノ酸分析をもとに微量で配座解析を行うことができることを示した⁶⁾。この方法によりN-メチル化に抵抗するアミノ酸残基、すなわち分子内水素結合に関与するアミノ酸残基とN-メチル化を受けるアミノ酸残基、すなわち溶媒に露出したアミノ酸残基を区別することができる。余談だが、本法は後に α , α -二置換グリシン含有鎖状ペプチドの配座解析にも利用されている⁷⁾。

このN-メチル化反応はプレパラティブスケールでも適用可能であり、 β -シート型環状ペプチド抗生物質グラミシジンS (GS, *cyclo*(Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro)₂)のbis-Boc誘導体では分子内水素結合に関与しないOrn及びD-Pheの4つのアミド水素がメチル化されたtetra-N-methyl体を収率良く与えた (図1)。一方、2つの保護Orn側鎖NHはN-メチル化に抵抗した。NMR解析の結果、Orn側鎖NHと β -ターンを構成するD-Pheのカルボニル基との間で*i* $\rightarrow$ *i*+2型の分子内水素結合を形成しており、これがN-メチル化に抵抗する要因であると考えた^{8a)}。また、筆者らはtetra-N-methyl体の単結晶の作成に成功し、X線結晶構造 (図2a)を得ることができた。その結果、Orn側鎖の立体化学が変わり、*i* $\rightarrow$ *i*+2型の水素結合が*i* $\rightarrow$ *i*-3型になることも分かった (図2b)^{8b)}。この研究が契機となり、筆者らはN-メチル化生物活性ペプチドの合成研究へと傾注していくこととなった。

3. 鎖状ペプチドへのMultiple N-methylation: シクロスポリンOの液相全合成

段階伸長法でN-メチル化ペプチドを合成する場合、N-メチル基の立体障害に起因する縮合効率の低下が懸念されるため、縮合方法の選択が鍵となる。しかし、保護 MeAAが連続する配列を含むペプチドの合成において、縮合剤の工夫だけでは縮合効率の低下を克服できず、欠損ペプチドの副生が避けられなかつ

た。筆者らは、これらの問題点を克服する手段としてペプチド鎖を構築してから分子内の全てのアミドを一挙に*N*-メチル化して完全*N*-メチル化ペプチドを得る方法 (Multiple *N*-methylation 法) を提案した (図3)。この反応の基質となる非メチル化前駆体の合成には一般的なペプチド合成法が適用できるので保護アミノ酸活性化時のラセミ化の危険性が低い。また、*N*-メチル基に起因する縮合効率の低下もないので、保護MeAA誘導体を1残基ずつ段階伸長する方法よりも効率的にMeAA残基が連続する鎖状ペプチドを合成することができる。実際にシクロスポリンO(CsO) 中

の*N*-メチル化ペプチドセグメントBoc-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeLeu-OMeをH-Leu-OMeから全収率75%で合成した。Multiple *N*-methylationの反応条件を種々検討した結果、室温24時間で完全に*N*-メチル化するには1残基あたりCH₃Iが30当量、Ag₂Oが5当量必要であった。2つめの*N*-メチル化ペプチドセグメントBoc-Sar-MeLeu-OHも同様の手法で合成した。3つめの*N*-メチル化ペプチドセグメントの合成はH-Ala-OBzlを出発物質として段階伸長法により行った。Boc-Val-OHとH-MeLeu-Ala-OBzlの縮合はEDC-HOAt (0.1 eq.)で十分反応が進行し、収率84%でトリペプチドを与えた。こ

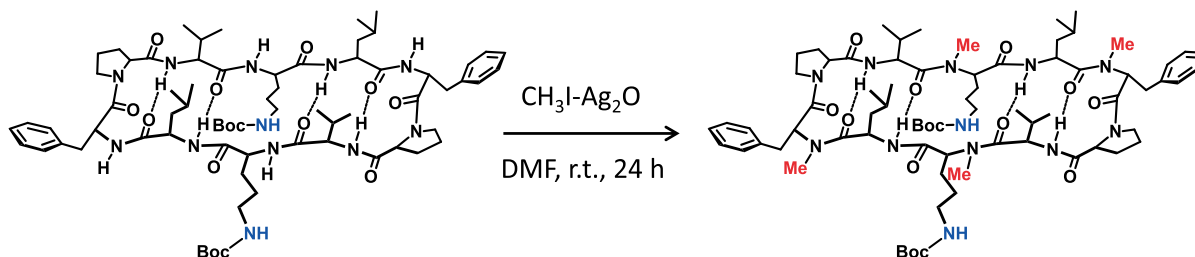


図1 GS誘導体の位置選択的*N*-メチル化

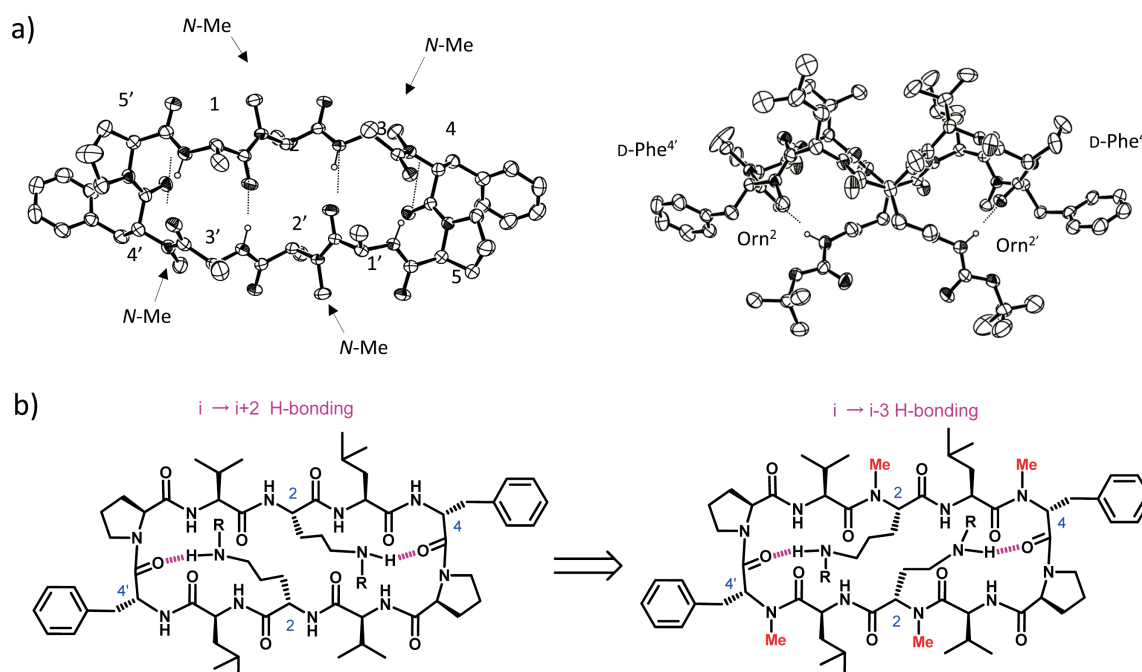


図2 a) tetra-*N*-methyl GS誘導体のX線結晶構造 (アミドNH以外の水素原子は省略している。点線は分子内水素結合を示している。Val及びLeuの側鎖は簡略化のため省略している。), b) *N*-メチル化に伴うOrn側鎖立体化学の変化

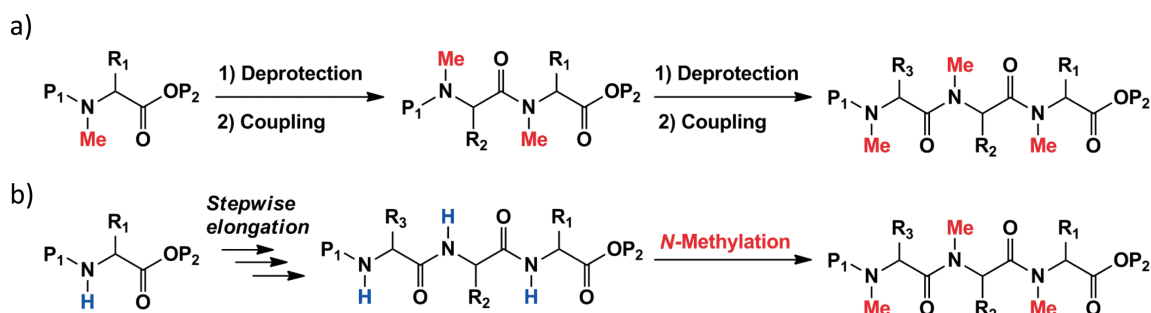


図3 a) *N*^ε-保護MeAAの段階伸長による*N*-メチル化ペプチドの合成, b) Multiple *N*-methylation法による*N*-メチル化ペプチドの合成

これらのペプチドセグメントをHATUで縮合し、接触水素化による末端保護基の除去と環化反応を経てCsOの液相全合成を達成した(図4)⁹⁾。NMR測定の結果、*N*-メチル基に由来する7つのシグナルと4つのアミド水素由来のシグナルを確認した。また、アミド水素の温度依存性を調べたところ、シクロスポリンAと同様の分子内水素結合の形成が示唆され、目的物が得ら

れたことを確認した(図5)。

4. 環状デブシペプチドへのMultiple *N*-methylation: PF1022Aの液相全合成

PF1022Aは、強力な抗線虫活性を有する*N*-メチル化環状デブシペプチドであり、4つのMeLeuと2つのD-乳酸(D-Lac)とD-フェニル乳酸(D-PhLac)か

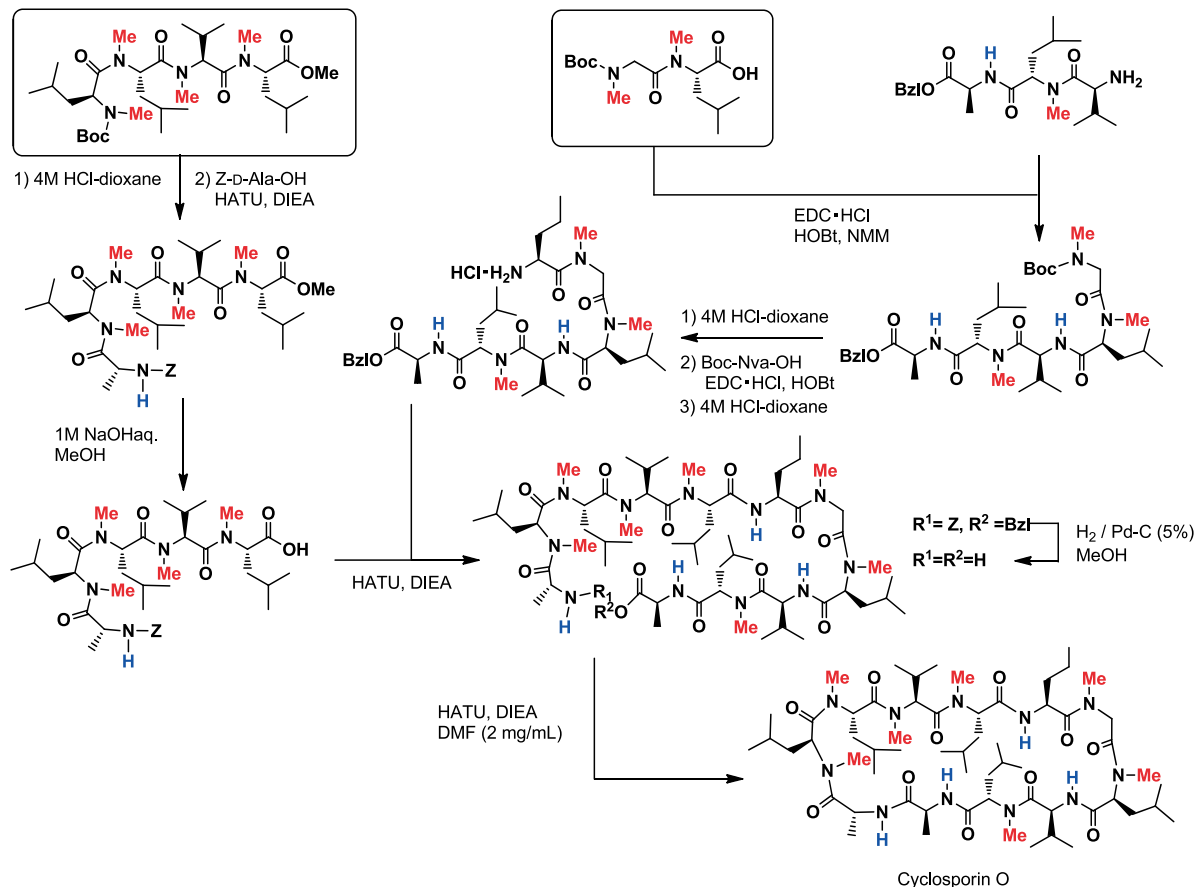


図4 Multiple-*N*-methylation法を利用したシクロスポリンOの液相全合成

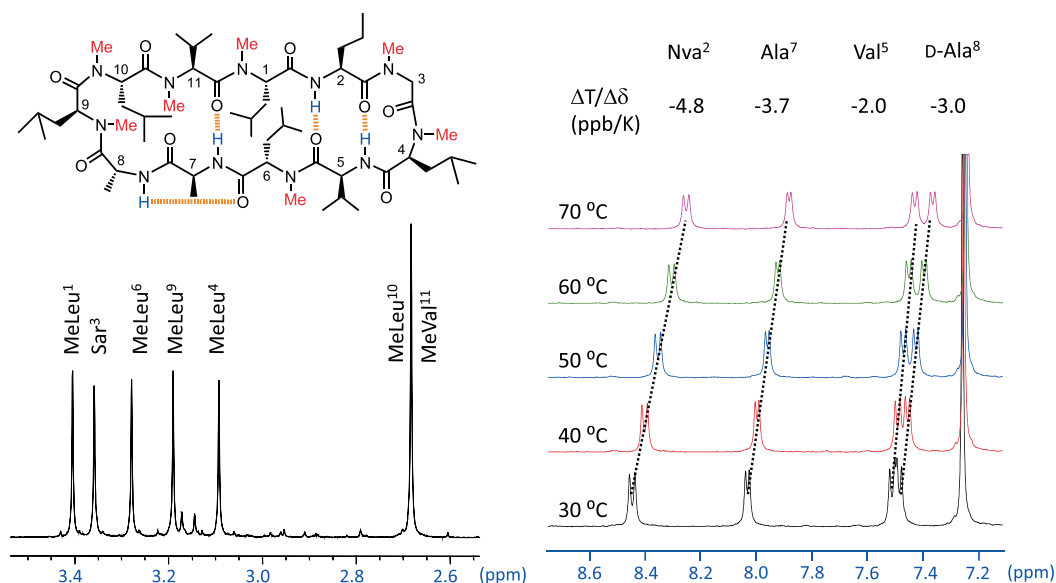


図5 シクロスポリンOの¹H NMRスペクトル(抜粋) a) *N*-メチル基由来のシグナル, b) アミド水素由来のシグナル

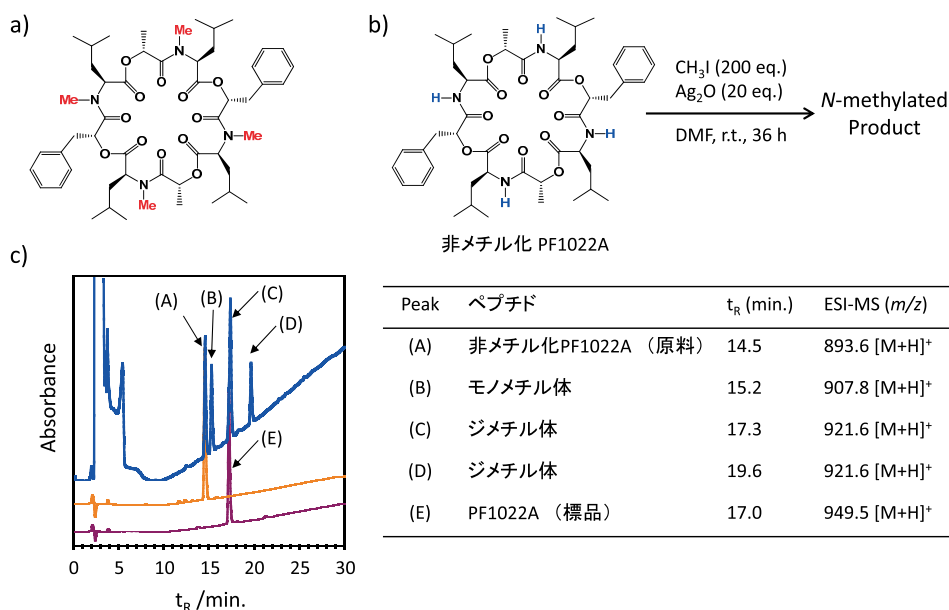


図6 a) PF1022Aの構造, b) 非メチル化 PF1022Aに対するMultiple *N*-methylation, c) *N*-メチル化生成物の同定, HPLC条件: カラムYMC-Pack Pro C4 (150×4.6 mmI.D.), 溶離液: 70–100% CH₃CN (0.1%TFA), 流速: 1 ml/min., 検出: UV220 nm

ら成る (図6 a)。現在, PF1022Aの誘導体である Emodepsideが安全性の高い動物用駆虫薬 (商品名: Profender) として市販されている。以前, 著者らが文献既知の合成法 (液相法) に基づき全合成を行ったところ, *N*-メチル化ジデブシペプチドのセグメント縮合の収率が著しく低く, PF1022Aの全収率はわずか2%であった。そこで, メチル化されていない環状ペプチド前駆体に対してMultiple *N*-methylationを行い, PF1022Aが合成できるかどうか検討した。

まず, メチル化されていない前駆体環状ペプチド (cyclo(Leu-D-Lac-Leu-D-PhLac)₂) を液相法にて合成し, *N*-メチル化反応に付したところ, 先のGS誘導体の場合と同様に分子内水素結合に関与する2つのアミドは*N*-メチル化に抵抗し, 2種類のジメチル体を与えた (図6 b)。その後, 鋭意反応条件を検討した結果, 鎖状前駆体を環化後精製せずに*N*-メチル化すると収率よく目的とするPF1022Aを与えることが分かった。この方法での全収率は52%であり, Multiple *N*-methylation法の有用性の一端を示すことができた¹⁰⁾。

5. MeAA残基が連続する鎖状ペプチドの合成: Multiple *N*-methylationとマイクロ波固相合成の比較

近年, マイクロ波固相合成 (MW-SPPS) を用いて*N*-メチル化ペプチドを合成する試みがなされている。AlbericioらはFmoc-MeAA (3 eq.)をDIPCDI(3 eq.), HOBt(3 eq.)で活性化させ, MW照射下で35℃, 20分間反応させると縮合は完結し, 純度よく完全メチル化された短鎖ペプチドを与えることを示した¹¹⁾。しかし, N末端にMeVal残基を持つペプチド樹脂に対するアシル化では, MW照射による反応促進効果は見られない。例えば, 筆者らは以前 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンアンタゴニストであるCilengitideの鎖状前駆体 (H-Asp(O^tBu)-D-Tyr(^tBu)-MeVal-Arg(Pbf)-Gly-OH) を

MW-SPPSにて合成した。D-Tyr(^tBu)-MeVal間の縮合ではHATUを用いてもトリプルカップリングが必要で, Aib含有ペプチドのMW-SPPSで効果があったCOMU¹²⁾を用いた場合でもダブルカップリングが必要であった¹³⁾。また, MeValが連続するペプチドの合成はさらに困難を極める。筆者らはHATUを用いてMW照射下 (50℃, 10分間) でFmoc-MeVal-OHとH-MeVal-Gly-(2-Cl-Trt)-resinを縮合させたが, トリプルカップリングでも反応は完結しなかった。このようなMeVal残基が連続する*N*-メチル化ペプチドの合成にはMultiple *N*-methylation法が適している。一例として抗マラリア活性を示す海洋天然物由来リポペプチドDragonamide A (図7 a)¹⁴⁾の部分合成について述べる。Dragonamide Aは, MeVal残基が3つ連続する配列を有している。本研究ではペプチド部分の合成にMultiple *N*-methylation法を適用した。まず, 非メチル化前駆体 Boc-Val-Val-Val-Phe-OMeを液相法で合成後, DMF中室温でCH₃I (120 eq.), Ag₂O (20 eq.)と反応させたところ, 対応する*N*-メチル化ペプチドBoc-MeVal-MeVal-MeVal-MePhe-OMeを定量的に与えた。C末端メチルエステルをアルカリけん化後, 混合酸無水物法よりアミド化し, 目的ペプチドを全収率27%で得ることができた (図7 b)¹⁵⁾。

6. 今後の展望

N-メチル化ペプチドの合成に関する最近の研究例について紹介する。WhiteらはAg₂Oを使わないMultiple *N*-methylationにより*N*-メチル化環状ペプチドライブラリーを構築し, ペプチドの膜透過性評価に応用した¹⁶⁾。この方法では樹脂上で直接*N*-メチル化を行うことで効率良くライブラリーを構築することが可能であり, 今後の展開が注目される。また, Danishefskyらはisonitrile誘導体を用いてC末端側へとペプチド鎖を伸長して*N*-メチル化ペプチドを合成する方法を開発し, 冒頭で述べたCsAの液相全合成を

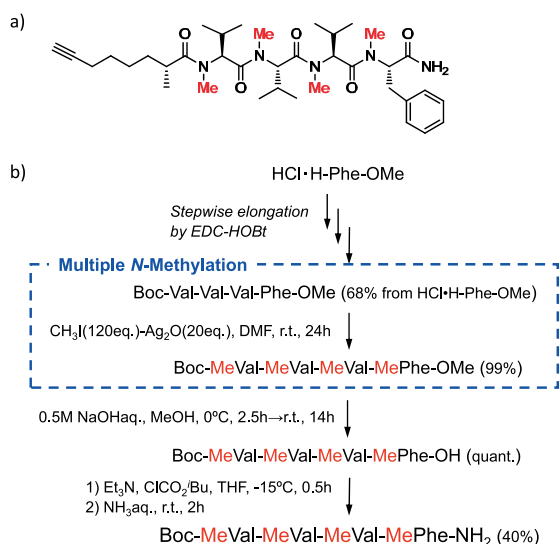


図7 a) Dragonamide Aの構造, b) Multiple N-methylation法を利用したDragonamide A部分ペプチドの合成

達成した¹⁷⁾。化学合成以外では、フレキシザイムを利用した翻訳合成¹⁸⁾が注目されており、今後生物活性ペプチドのスクリーニングにおける強力なツールになるものと思われる。

本稿ではN-メチル化ペプチドの化学合成について筆者らの研究成果を中心に紹介した。ここで取り上げた合成法を含め、N-メチル化ペプチドに対する関心が深まり、ペプチド創薬の発展に貢献することを願って止まない。

本稿で紹介した研究は、川井正雄 名誉教授、山村初雄 教授（名古屋工業大学大学院工学研究科）、齋藤一樹 博士（東京大学大学院新領域創成科学研究科）、片貝良一 名誉教授（群馬大学工学部材料工学科）、松尾一郎 教授、奥浩之 准教授（群馬大学大学院理工学府分子科学部門）、清水弘樹 博士、長島生 氏（産業技術総合研究所生物プロセス研究部門）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並びに日夜研究に励んでくれた遠藤晃哉 氏、中津信吾 氏、吉成隆昌 氏にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また、本稿執筆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) Chatterjee, J.; Reichenmacher, F.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 254–269.
- 2) Aurelio, L.; Brownlee, R. T. C.; Hughes, A. B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5823–5846.
- 3) El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.
- 4) Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2690–2691.
- 5) Olsen, R. K. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1912–1915.
- 6) Kawai, M.; Nagai, U. *Chem. Lett.* **1977**, 1397–1398.
- 7) Moretto, A.; Crisma, M.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Toniolo, C. *Biopolymers (Peptide Science)* **2006**, *84*, 553–565.

- 8) a) Kawai, M.; Yamamoto, T.; Yamada, K.; Yamaguchi, M.; Kurobe, S.; Yamamura, H.; Araki, S.; Butsugan, Y.; Kobayashi, K.; Katakai, R.; Saito, K.; Nakajima, T. *Lett. Pept. Sci.* **1998**, *5*, 5–12. b) Yamada, K.; Unno, M.; Kobayashi, K.; Oku, H.; Yamamura, H.; Araki, S.; Matsumoto, H.; Katakai, R.; Kawai, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12684–12688.
- 9) a) Yamada, K.; Endo, T.; Oku, H.; Katakai, R. *Peptide Science 2004*, Y. Shimohigashi (Ed.), The Japanese Peptide Society, Osaka, pp591–594. (2005)
- 10) a) Nakatsu, S.; Yamada, K.; Oku, H.; Katakai, R. *Peptide Science 2006*, H. Ishida & H. Mihara (Eds.), The Japanese Peptide Society, Osaka, pp 66–67. (2006), b) 山田圭一, 中津信吾, 奥浩之, 片貝良一, 「PF1022類の製造法」, 特許第4734656号 (2011)
- 11) Rodríguez, H.; Margarita Suarez, M.; Albericio, F. *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 136–140.
- 12) Subiros-Funosas, R.; Acosta, G. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6200–6202.
- 13) Yamada, K.; Nagashima, I.; Hachisu, M.; Matsuo, I.; Shimizu, H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 1066–1070.
- 14) a) Jiménez, J. I.; Scheuer, P. J. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 200–203.; b) McPhail, K. L.; Correa, J.; Linington, R. G.; González, J.; Ortega-Barria, E.; Capson, T. L.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 984–988.
- 15) Yoshinari, T.; Yamada, K.; Oku, H.; Katakai, R. *Peptide Science 2006*, H. Ishida & H. Mihara (Eds.), The Japanese Peptide Society, Osaka, pp 50–51. (2006)
- 16) White, T. R. *et al. Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 810–817.
- 17) Wu, X.; Stockdill, J. L.; Wang, P.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4098–4100.
- 18) Kawakami, T.; Murakami, H.; Suga, H. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 32–42.

やまだ けいいち
群馬大学大学院理工学府 分子科学部門
kyamada@gunma-u.ac.jp

第51回ペプチド討論会

日時：2014年10月22日（水）～2014年10月24日（金）
会場：徳島大学蔵本キャンパス 大塚講堂
主催：日本ペプチド学会
ホームページ：<http://www.societyinfo.jp/jps51/>
本文：詳細についてはHPをご参照ください。

問合先

住所：〒770-8505 徳島県徳島市庄町1-78-1
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
担当者名：大高 章
Tel: 088-633-7283
Fax: 088-633-9505
E-mail: aotaka@tokushima-u.ac.jp

第46回若手ペプチド夏の勉強会開催のお知らせ

2014年8月3日から2泊3日で、第46回若手ペプチド夏の勉強会を京都府宮津市にて開催いたします。

今回の会場は、日本三景の一つ、天橋立にほど近い「京都府立青少年海洋センター マリーニピア」です。

若手ペプチド研究者からの発信を中心に、ペプチド研究の基礎からケミカルバイオロジー、創薬などの領域への広がりについて、活発な討論を通じて、今後のペプチド研究を牽引する若手研究者育成につながる勉強会の準備を鋭意進めております。

現在までのところ（6月10日現在）、全国の40を超える研究室から150名にせまる参加予定のご連絡をいただいております。また、特別、依頼、一般講演などの口頭発表は30件前後、さらに40件を超えるポスター発表申し込みをいただきまして、過去最大規模となる勉強会になることが予想され、世話人一同、心より感謝致しております。

当日、皆様と天橋立にてお会いできることを楽しみにしております。

日時：2014（平成26）年8月3日（日）～5日（火）

場所：京都府立青少年海洋センター マリーニピア

〒626-0068 京都府宮津市田井

TEL: 0772-22-0501, FAX: 0772-22-0503

URL: <http://www5.ocn.ne.jp/~marinpia/>

（北近畿タンゴ鉄道宮津駅下車、車で15分）

世話人：富崎欣也（龍谷大学理工学部）

臼井健二

（甲南大学フロンティアサイエンス学部）

（第46回若手ペプチド夏の勉強会ホームページ

http://www.usui-lab.com/peptide_summer46.html）

お問い合わせは、pepwakate46@gmail.comまでお願いいたします。

編集後記（ごあいさつ）

本年4月より広報担当理事として、ニュースレターの編集に携わるようになりました。どうぞよろしくお願い申し上げます。引き続き日本ペプチド学会の学会誌として、会員の皆様にタイムリーで有益な情報をお届けしていきたく思っております。本誌の制作では、各号毎に編集委員の先生が企画・編集を担当されています。そして、多くの先生のご寄稿によって成り立っております。本93号は山形大学大学院今野博行先生の多大なるご尽力により、4名の先生のご研究を掲載することができました。厚くお礼申し上げます。これからも会員の皆様の情報交換の場として、さらに日本ペプチド学会の活動の軌跡を残す場として、本誌の内容の充実を図っていきたく思います。会員の皆様におかれましては、今後ともご理解・ご協力の程よろしくお願い申し上げます。

林 良雄

PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN

編集・発行：日本ペプチド学会

〒562-8686 箕面市稲 4-1-2

（株）千里インターナショナル内

編集委員

林 良雄（担当理事）

（東京薬科大学薬品化学教室）

TEL・FAX 042-676-3275

e-mail: yhayashi@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（金沢工業大学バイオ・化学部応用化学科）

TEL 076-274-9259（直通）

e-mail: shinono@neptune.kanazawa-it.ac.jp

（本号編集担当：今野博行）