

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14837

研究課題名(和文)細胞接着配列とのハイブリッド化によるインターフェロン シグナル増強ペプチドの開発

研究課題名(英文)The exploration of functional domain of IFN-tau with synthetic peptides for the possible substitution of recombinant protein

研究代表者

高橋 昌志(Masashi, Takahashi)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：10343964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシインターフェロン(IFN)- $\tau$  構成アミノ酸配列の探索を目的として化学合成ペプチドによる活性化の可否を検討した。化学合成した11種のペプチドを単独、または混合して子宮内膜細胞に添加し、IFN活性化指標であるMX1、2、ISG15の遺伝子発現よりIFN- $\tau$  活性を評価した。次に、組換えIFN- $\tau$  とペプチドの同時添加でIFN- $\tau$  の競合を評価した。組換えIFN- $\tau$  添加によりISGs発現量が増加したが、ペプチド単独添加、組換えIFN- $\tau$  とペプチドの同時添加によるISGs発現効果は見られなかった。今回合成したペプチド配列は、立体構造の変化により受容体への結合能を失った可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present research is to search the activities of synthetic peptides constituting IFN- $\tau$  for a possible substitution for recombinant IFN- $\tau$ . Eleven peptides (long chain: 27-28 aa, short chain: 7-17 aa) have been chemically synthesized from amino acid sequence and structure of IFN- $\tau$ . Each or mixed peptides or recombinant IFN- $\tau$  were added to cultured bovine endometrium stromal cells to detect the expression of MX1, 2 and ISG15 that belong to interferon-stimulated genes (ISGs). Next, each or mixed peptides were added to the cells with recombinant IFN- $\tau$  and expression of ISGs was evaluated. IFN- $\tau$  significantly stimulated ISGs expression, whereas all single or mixed peptides did not. Addition of single or mixed peptides did not show the inhibitory effect of IFN- $\tau$ . These result suggest that synthetic peptides would not have agonist and antagonist ability or binding to IFN receptor by the possible structural change.

研究分野：家畜繁殖

キーワード：インターフェロン 子宮内膜細胞

### 1. 研究開始当初の背景

受精卵移植利用による子畜生産技術は過去 20 数年にわたって人工繁殖技術の中心的な位置を占め、育種改良にも大きく貢献してきた。しかし、依然として新鮮胚移植の受胎率は 50%前後、凍結胚では 40%前後で推移、停滞しており、さらなる受胎率向上に対する技術開発が大いに期待されている。IFN は着床前期の胚から産生され、子宮細胞上にある I 型 IFN 受容体を介する反芻動物固有の妊娠シグナルとして知られている。IFN は、妊娠シグナル伝達機構の解明や胎率向上を目的とした妊娠シグナル増強投与など、多岐にわたっての研究への利用、あるいは胚移植時に投与するという活用としてその研究ニーズは高い。

現在 IFN の確保には大腸菌や昆虫細胞発現系により組換え合成されたタンパク質が国内外で用いられている。しかし、国内ではごく一部の研究機関で合成系を持つのみで、基礎研究や生体投与するに十分な量を確保できていない。加えて、組換え体ということで、特に生体投与実験へ使用する際には、より慎重な手続きが必要となる。このため高い需要があるにもかかわらず、一時行われていた研究への活用に大いに制限となり、支障をきたしている。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞接着(RGD)配列を IFN シグナル活性最少ペプチド配列の両側に単独、または連続して配置させたハイブリッドペプチドを化学合成し、上皮細胞上の細胞接着因子受容体との結合性を高めることで IFN 受容体との結合を強化・上皮細胞表面局所濃度を高める新たなシグナルを構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

### ISG 誘導に及ぼす長鎖 IFN- ペプチドの効果

#### ペプチド合成

WISS-MODEL を用いて三次元化した IFN の 192 アミノ酸配列の予測立体構造より 25-30 残基のペプチド 7 種類(図 1)および I 型 IFN 受容体結合部位などを考慮(図 2)して化学合成した。合成したペプチドは DMSO に溶解し、既に確認済みの IFN の活性ユニットと同等の濃度として培養液に希釈添加して使用した。

Pe1	M	A	F	V	L	S	L	L	M	A	L	V	L	V	S	Y	G	P	G	R	S	L	G	C	Y	L	S	E
Pe2	D	H	M	L	G	A	R	E	N	L	R	L	L	A	R	M	N	R	L	S	P	H	P	C	L	Q	D	R
Pe3	K	D	F	G	L	P	Q	E	M	V	E	G	N	Q	L	Q	K	D	Q	A	I	S	V	L	H	E	M	L
Pe4	Q	Q	C	F	N	L	F	Y	T	E	H	S	S	A	A	W	N	T	T	L	L	E	Q	L	C	T	G	L
Pe5	Q	Q	Q	L	E	D	L	D	A	C	L	G	P	V	M	G	E	K	D	S	D	M	G	R	M	G	P	I
Pe6	L	T	V	K	K	Y	F	Q	G	I	H	V	Y	L	K	E	K	E	Y	S	D	C	A	W	E	I	I	R
Pe7	V	E	M	M	R	A	L	S	S	S	T	T	L	Q	K	R	L	R	K	M	G	D	L	N	S	L		

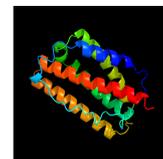


図 1 化学合成した長鎖ペプチドのアミノ酸配列

1 AB-loop	C	L	Q	D	R	K	D																						
2 C-helix	T	T	L	L	E	Q	L	C	T	G	L	Q	Q	Q	L	E	D												
3 D-helix	K	K	Y	F	Q	G	I	H	V	Y	L	K	E	K															
4 E-helix	W	E	I	I	R	V	E	M	M	R	A	L	S																

図 2 IFNAR との結合領域ペプチドのアミノ酸配列

#### 子宮内膜細胞の採取と培養

食肉公社より採取した非妊娠ウシ子宮の子宮角を切開し、子宮内膜細胞を分散採取した。細胞はペトリディッシュ内で 70%コンフルエントになるまで  $1.0 \times 10^5$  個/ml となるように濃度を調製し、38.5 °C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。培養細胞は継代し、以降の試験に使用した。

子宮間質細胞を 48well ディッシュに 5% FBS in DMEM、 $1.0 \times 10^5$  cell/ml で各 well に 200  $\mu$ l ずつ添加し、well の底面の 7 割以上になるまで 38.5 °C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。細胞の増えた 48well ディッシュの各 well を PBS

で洗浄後、control 区, 0.1 % DMSO 添加区、Pe1-7 ペプチド単独添加区 (3.5  $\mu$ M), Pe1-7 ペプチド混合添加区 (5  $\mu$ M) (All), および, IFN- (500IU) 添加区に区分し、38.5、5% CO<sub>2</sub> で 3 時間培養した。

#### IFN- 活性に及ぼす合成ペプチドの競合効果

細胞増殖後、各 well を PBS で洗浄後 control 区, IFN- 添加区 (500IU IFN-) および、競合区 Pe1-7 +500IU IFN- (IFN- All 区) に区分し、38.5、5% CO<sub>2</sub> で 3 時間培養した。

#### IFN- 活性に及ぼす IFN 受容体結合領域合成ペプチドの活性効果

細胞増殖後、各 well を PBS で洗浄後、control 区, 0.1 % DMSO 添加区、AB-loop (PeAB), C (PeC), D (PeD), E (PeE) helix ペプチド複合添加区 (10  $\mu$ M) (All), および, IFN- (500IU) 添加区に区分し、38.5、5% CO<sub>2</sub> で 3 時間培養した。培養終了後 RNA 抽出、cDNA 合成および定量 PCR による遺伝子発現を実施した。解析遺伝子は、代表的な ISG である *MX1* および *ISG15* を対象とした。

### 4. 研究成果

#### ISG 誘導に及ぼす長鎖 IFN- ペプチドの効果

ペプチド無添加である control 区に比べ、IFN- 区で *MX1* および *ISG15* の発現量が有意に上昇しており ( $p < 0.05$ )、IFN 応答効果が確認された。これに対して、control 区と Pe1-7 区では *MX1*、*ISG15* の発現量に有意な差はなく、pe1-7 による IFN- 活性は見られなかった (図 3)。同様に、All 区においても *MX1*、

*ISG15* の発現誘導は見られなかった (図 3, 4)。

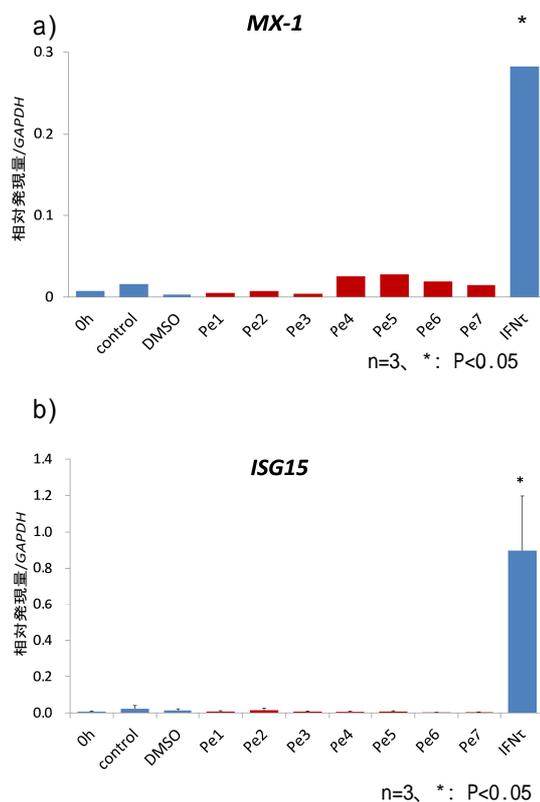


図 3 *MX1*(a)および *ISG15*(b)の発現に及ぼす長鎖ペプチド添加の効果

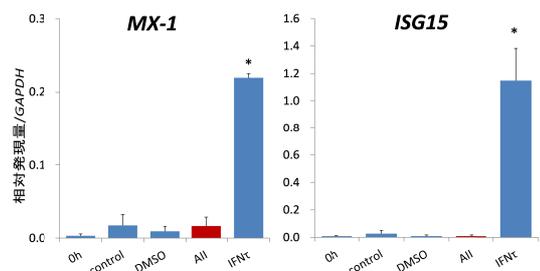


図 4 *MX1*(a)および *ISG15*(b)の発現に及ぼす長鎖ペプチド混合添加の効果 n=3, \*: P<0.05

#### IFN- 活性に及ぼす合成ペプチドの競合効果

IFN- 添加によって誘導がみられた *MX-1* 発現はペプチド 1-7 の混合添加競合処理によって、発現阻害効果は見られなかった (図 5)。一方、*ISG15* の発現はペプチド 1-7 添加によって低下がみられたが (Fig5a)、DMSO の添加によっても有意な発現低下となった (Fig5b)。

培地への0.5%程度までのDMSO添加は遺伝子発現への影響は与えないとされているが、今回、MX-1では見られなかった遺伝子発現へのDMSOの影響がISG15ではその発現を減少させたことは、ISG15の発現調節機構、あるいはその感受性にDMSOが影響する可能性も示唆された。

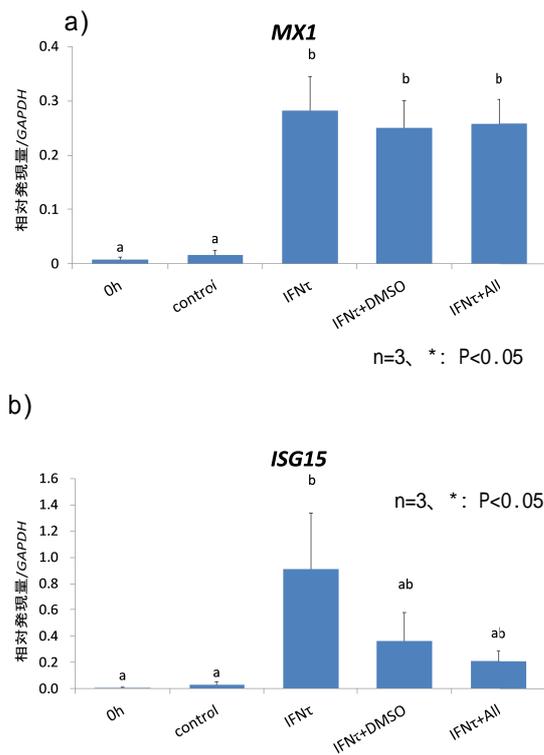


図5 MX1(a)およびISG15(b)の発現に及ぼすIFNと長鎖ペプチド糾合の効果 a vs b: p<0.05

IFN- 活性化に及ぼすIFN受容体結合領域合成ペプチドの活性効果

培養子宮内膜細胞にAB-loop, C, D, E helixを添加し、MX1およびISG15の発現を解析した結果、両遺伝子の発現への刺激効果は認められなかった(図6 a,b)。

本研究では、IFNの192アミノ酸配列のペプチドを化学合成し、そのIFN活性の有無を検証することを目的とした。結果として、今回設計したペプチドのすべてにおいて、IFN添加で増加したMX1およびISG15の遺伝子発現は今回合成した11種類のペプチド

での活性化刺激効果は見られなかった。IFNが属するI型IFNの受容体は細胞膜上にIFNAR1、2の二量体で形成されており、リガンドであるIFNは両受容体と反応しなければMX1やISG15などのISGsの発現が誘導されないと考えられている。

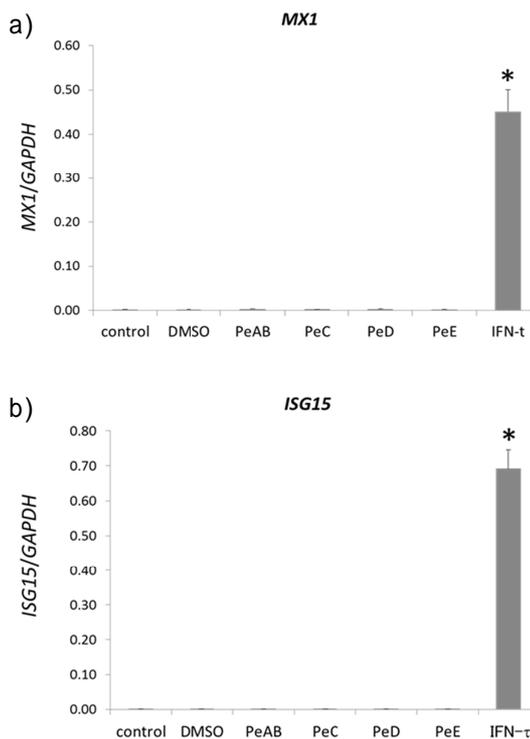


図6 MX1, ISG15の発現に及ぼす短鎖ペプチド添加の効果

また、IFNAR1またはIFNAR2と結合する化合物を合成した研究では、片方の受容体と結合した化合物において、その阻害効果が報告されている。また、ヒトIFN-2において、ヘリックスC、D、EはIFNAR1と、ヘリックスEとヘリックスAとヘリックスBを繋ぐループAB構造はIFNAR2と接触していることが報告されており、それぞれ離れた箇所にある領域と反応しなければならないと考えられる。今回、検討した全ペプチドによるISGs応答性へのアゴニスト及びアンタゴニストとしての機能が見られなかったため、今回合成した長鎖ペプチドはIFNAR1、2の両方と同時に反応しないことが示唆された。

二量体構造をとるIFN受容体に類して、二

量体の受容体と結合するフィブロネクチンは、連続したアミノ酸配列が活性リガンド領域を持つため、その活性リガンド領域をもつペプチドが可能であった。これに対して、IFN- は、離れた幾つかの場所に活性リガンド領域をもつ可能性があり、その活性を有する構造ペプチドは、タンパク質の立体構造及び離れた複数個所の活性リガンド領域を保持している必要がある。今後は長鎖ペプチドによる複数個所の活性リガンド領域の検討が必要であると考えられる。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Shirozu T, Suzuki T, Iwano H, Ogiso T, Bai H, Kawahara M, Kimura K, Takahashi M .  
The effect of knock down of IFNAR by RNAi on expression of interferon- induced genes in bovine endometrial epithelial cells . (九州産業大学 福岡県福岡市、第17回アジア大洋州畜産学会大会、2016.8.22-25) .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/anim/breed>

/

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

高橋 昌志(TAKAHASHI, Masashi)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10343964