

平成22年 6月14日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19570112  
 研究課題名（和文） 前駆体タンパク質の構造生物学的研究を基礎とした生理活性ペプチド成熟機構の解明  
 研究課題名（英文） Structural Studies on precursor proteins of bioactive peptides to elucidate their maturation.  
 研究代表者  
 山口 宏 (YAMAGUCHI HIROSHI)  
 関西学院大学・理工学部・教授  
 研究者番号：10252719

研究成果の概要（和文）：ペプチドホルモンであるウログアニリンの前駆体であるプロウログアニリンのX線結晶構造の高分解構造を決定した。成熟体領域とプロ領域の間の相互作用だけが重要であるのではなく、中間体とプロ領域の相互作用も重要であるのではないかということが示唆された。さらに、フォールディング過程の速度論的解析を行い、二つの中間体構造が重要である事を明らかにした。その他、 $\beta$ アミロイド前駆体蛋白質の溶液中での挙動も解析した。

研究成果の概要（英文）：Prouroguanylin (PUG) is precursor of uroguanylin that is peptide hormone. X-ray crystal structure of PUG has been determined at high resolution. In the folding process of PUG, the structure suggests that not only interactions between proregion and peptide region in the PUG that has correct folding but also those in the folding intermediates are very important. Furthermore, kinetic analysis of a folding process of PUG has been performed. It is elucidated that two folding intermediate structures are important in the folding process. In addition, behaviors of  $\beta$ -amyloid precursor protein in the solution were analyzed by CD, DSC and light scattering.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析、結晶構造、フォールディング解析、フォールディング中間体、ウログアニリン、プロウログアニリン、アミロイド前駆体タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

ペプチドホルモンなどの生理活性ペプチドは、構造と活性の相関において最も強い活性を示すアミノ酸配列を有している。これは、

進化の過程において、生体の様々な思考錯誤の結果得られたものと考えられるが、どのようにしてそのアミノ酸配列の選択が行われ、活性発現に必須な立体構造が形成されたか

については、まだほとんど分かっていない。一般に、ペプチドホルモンはプレプロホルモンとして発現し、プロセッシングにより生理活性ペプチドになる。また、 $\beta$ -アミロイド前駆体タンパク質は、異常プロセッシングによりアルツハイマー病患者の病変部位に沈着する $\beta$ -アミロイドを生成する。これらの正常または異常なプロセッシングが、どのように制御されて起こるのかを明らかにする事や、前駆体タンパク質の構造が成熟体の構造形成にどのように寄与しているのかを明らかにする事は、生理活性ペプチドを理解、利用する上で必須である。この目的のため、これらの生理活性ペプチドの前駆体タンパク質の構造学的な研究を行い、溶液中での安定性や挙動、原子レベルでの構造を解明する事が重要な課題となる。

## 2. 研究の目的

ペプチドホルモンの前駆体タンパク質であるプロオピオメラノコルチン、プロウログアニリンおよび $\beta$ アミロイド前駆体タンパク質の安定した供給方法を確立し、構造研究の遂行を可能にする事を目的とする。さらに、得られた試料のX線結晶構造解析を試み、詳細な原子レベルの立体構造を決定する事を目的とする。並行して、光散乱による溶液中での会合状態の解析や、示差走査熱量計による熱測定を通じた安定性の評価など溶液中での試料の物理化学的測定を通じた、溶液中での状態解析を行う。さらに、プロウログアニリンに関しては、ジスルフィド結合を還元した完全変成状態からのリフォールディング過程の速度論解析を行い、そのフォールディング機構を解明する。これらの結果を通して、前駆体タンパク質の構造的意義を明らかにする事を目的とする。

プロウログアニリンは、腸管や腎臓等に存在するペプチドホルモンであるウログアニリン（グアニル酸シクラーゼ活性化ペプチド）の前駆体タンパク質である。ウログアニリンは、受容体タンパク質であるグアニル酸シクラーゼCに結合することで、これら臓器の水分調節を行うと考えられている。ウログアニリンの構造活性相関の研究過程において、天然型のジスルフィド結合をもつウログアニリンが生体外では極端に生成し難く、他のジスルフィド結合異性体に比べて熱力学的に不安定であることが明らかになっている。さらに、その天然型の立体構造の形成には、成熟体のアミノ酸配列の情報だけでは不十分であり、プロセッシングにより除去されるプロ配列が必須であり、プロ領域が分子内シャペロンとして機能することも明らかにされた。前駆体タンパク質であるプロウログアニリンの構造を解明することにより、プロ領域が分子内シャペロンとして機能するタ

イプの成熟機構解明の手がかりとすることが可能である。

プロオピオメラノコルチン (POMC) は、ACTH(adrenocorticotropin)前駆体タンパク質として知られ、ACTHを初めとしてLPH、MSH、エンケファリン等の数々の生理活性ペプチドの前駆体である。すなわち、1つの前駆体タンパク質から数多くのペプチドホルモンが生成する。成熟体であるペプチドホルモンへのプロセッシングの過程、およびプロセッシング酵素の制御機構については、すでに生化学的解析がなされており、多くの情報が蓄積されている。また、成熟体そのものの立体構造解析もNMRにより解析がなされているものがあり、受容体タンパク質との結合構造についても情報が蓄積されている。しかしながら、この前駆体タンパク質の立体構造については、試料が生体から微量にしか得られないことから、全く解析がなされていない。安定してPOMCを得る条件を確立する事により今後の研究を大きく進める事ができる。最終的目標は、POMCのX線結晶構造解析を行い、得られた立体構造と、既に蓄積されている成熟体ペプチド群のNMR構造との比較を行うことにより、前駆体タンパク質中の生理活性ペプチド部位の構造と成熟体ペプチドの構造との関連を明らかにし、プロセッシングの順序を規定している要因を立体構造から明らかにすることである。

$\beta$ アミロイド前駆体タンパク質 (APP) は、アルツハイマー病患者の脳皮質に異常沈着する $\beta$ -アミロイドの前駆体タンパク質であり、生体内に広く存在している。これまで、 $\beta$ アミロイドについては数々の研究が行われてきたが、何故生体でそのような異常プロセッシングがおこり $\beta$ アミロイドペプチドが作り出されるのかは不明である。APPの構造学的な知見を得る事により異常プロセッシングやタンパク質自身の機能推定のための情報を得る事を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究遂行のため、X線結晶構造解析や物理化学的解析に適した結晶を得る必要があるため、精製試料の大量調製を試み、結晶化条件検索および結晶化実験を行った。X線結晶構造解析に用いる試料は、十分高度に精製する必要があるため、各試料の調製方法を培養条件・精製条件全てにおいて検討を繰り返した。

プロウログアニリン、POMC、 $\beta$ アミロイド前駆体タンパク質に関して精製条件を確立できたので、結晶化条件検索を繰り返し行った。

(2) プロウログアニリンは、結晶構造解析に適した結晶が得られたため、実験室レベルでの回折予備実験を行った後、SPring-8のシ

ンクロトン放射光を用いて回折強度データを収集し、構造決定を行った。

(3) プロウログアニリンは成熟体領域の2つを含む3つのジスルフィド結合を持つ。また、天然構造は(Cys<sup>41</sup>-Cys<sup>54</sup>, Cys<sup>74</sup>-Cys<sup>82</sup>, Cys<sup>77</sup>-Cys<sup>85</sup>)の結合様式を持ち、フォールディング中間体は異性体1(Cys<sup>41</sup>-Cys<sup>54</sup>, Cys<sup>74</sup>-Cys<sup>85</sup>, Cys<sup>77</sup>-Cys<sup>82</sup>)と異性体2(Cys<sup>41</sup>-Cys<sup>54</sup>, Cys<sup>74</sup>-Cys<sup>77</sup>, Cys<sup>82</sup>-Cys<sup>85</sup>)の結合様式を持つ。まず、還元変性状態のプロウログアニリンおよび異性体1、2を調製し、それぞれのタンパク質20 nmolに対して、1 mM GSSGと2 mM GSHを含む0.1 M Tris/HCl (pH 8.0)緩衝液による希釈法によってフォールディング反応を行い、等量の1 M HClを加えることによるacid-quench法によって反応を停止させ、HPLCの溶出時間によって種々のフォールディング種の割合の解析を行った。

(4) アミロイド前駆体タンパク質の動的光散乱実験を行い、溶液中での会合状態の解析を行った。また、ヘパリン存在時の状態変化を明らかにするため、ヘパリンを存在させた状態でのCDスペクトル測定、動的光散乱、示差走査熱量計による熱測定を行った。

(5) 生理活性ペプチドのフォールディング解析の過程で、種々のアミノ酸やアミノ酸誘導体の添加がフォールディング中間体や成熟タンパク質自身を安定化し、凝集が起こりにくくなる事を見いだした。これまでは、アルギニンなど限られた種類のアミノ酸について同様の報告が成されていたが、幅広く多くの種類のアミノ酸類について検討を行った。タンパク質を安定化する事から、タンパク質結晶作製時においてのアミノ酸やアミノ酸誘導体を添加する事による効果の検討をリゾチームおよびヘモグロビンをモデルタンパク質として行った。

#### 4. 研究成果

生理活性ペプチドの立体構造形成機構を解明するために、プロウログアニリン、プロオピオメラノコルチン(POMC)、S-APP $\alpha$ の調製方法を検索し、SDS-PAGE、Native-PAGEで単一バンドを示し、動的光散乱で単分散を示す試料の調製に成功した。 $\beta$ アミロイド前駆体タンパク質は、動的光散乱では6量体と考えられる結果を示し、CDスペクトル測定の結果は報告されている部分構造と矛盾しない、 $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ シートを含む構造を持つ事を示唆した。これらの結果より、これらの精製試料を用いて物理化学的解析を行った。さらに、プロウログアニリンは、天然型構造だけでなく、ジスルフィド結合の異性体であるフォールディング中間体の精製条件も確立し、以下の研究に用いた。

(1) 対象の3種類のタンパク質の結晶化

条件の検索を行ったがPOMC、アミロイド前駆体タンパク質の良質な結晶を得る事はできなかった。プロウログアニリンは、2種類の結晶系で結晶化に成功した。最初に得られた結晶は高分解能の回折を与えたが、双晶であり解析を行う事はできなかった。新たに結晶化条件検索を行い、次に得られた結晶を用い、SPRing-8におけるデータ収集を行い、高分解能X線結晶構造の決定に成功した(図1)。この構造より、成熟体領域とプロ領域の間の相互作用だけが重要であるのではなく、中間体とプロ領域の相互作用も重要であるのではないかということが示唆された。

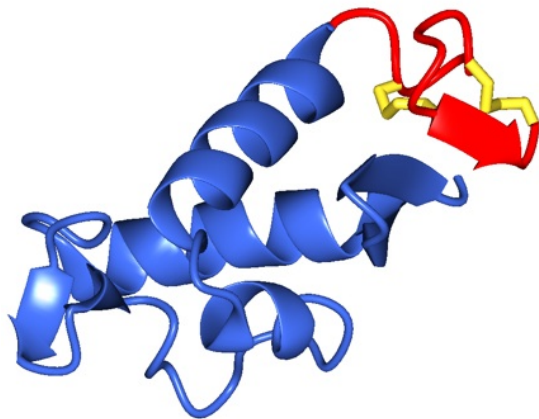


図1 プロウログアニリンの結晶構造  
青：プロ領域 赤：成熟体領域 黄：ジスルフィド結合

(2) 還元変性状態からのフォールディングの速度論的解析により、プロウログアニリンのフォールディングはスルフィドの酸化である初期相と形成されたジスルフィド結合のシャッフリングである後期相の2相から構成されることを明らかにした(図2)。

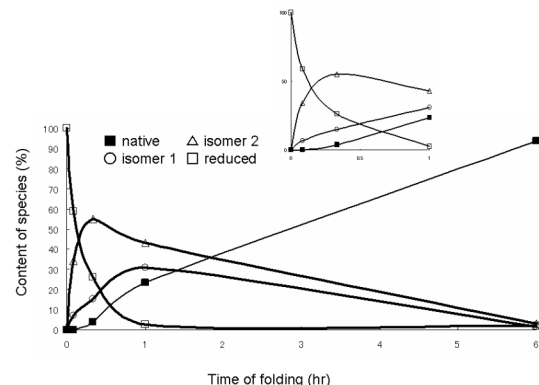


図2 プロウログアニリンの還元変成状態からのフォールディング過程の速度論的解析

フォールディングの初期相においてジスルフィドの掛け違った異性体1と2がより多く集積され、後期相においてこれらの間違ったジスルフィドをシャッフリングすることで天然型に移行することがわかった。

(3) 異性体1、2からの酸化フォールディング実験の結果、異性体1からのフォールディングは、一旦異性体2を経て天然型に収束する経路を示唆し、律速段階は異性体2であることが明らかになった(図3)。さらに、異性体2からのフォールディングは、初期相において異性体1と天然型を生成しつつ、律速段階は異性体2で有る事を示した(図4)。

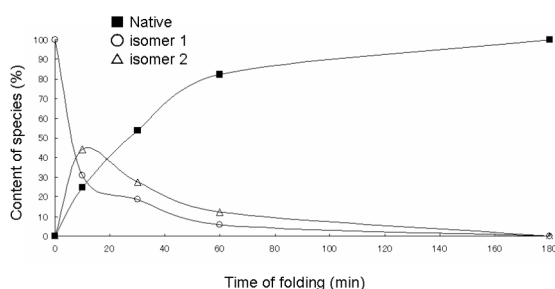


図3 異性体1からの酸化フォールディング解析

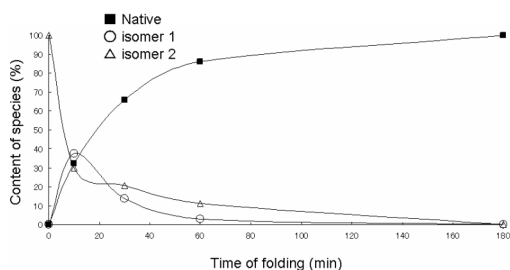


図4 異性体2からの酸化フォールディング解析

(5) 示差走査熱量測定による成熟体、各フォールディング異性体の安定性の評価も行った(図5)。天然型の熱変性中点( $T_m$ )は72°Cであり、異性体1の $T_m$ は、天然型より僅かに低い70°Cであった。一方、プロ領域によって構造制御されない異性体2の $T_m$ は51°Cであった。前述した結果と併せて、プロ領域とウログアニリン、異性体1の成熟領域との相互作用は、前駆体タンパク質であるプロウログアニリンや異性体1の構造安定性に強く寄与していることが明らかになった。

(6) リゾチームおよびヘモグロビンの結晶化時にアミノ酸のエステル誘導体およびアミド誘導体を溶液に添加する事により、結晶が析出しないような沈殿剤の濃い条件などでも結晶析出が観測される事を見いだした。

さらに他のタンパク質でも試み、一般的にタンパク質の結晶化に利用できるという結論を得た。

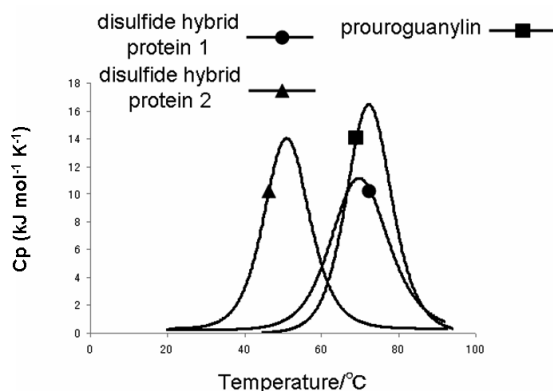


図5 プロウログアニリンの天然型、異性体1、2の示差走査熱量計による熱測定

## 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11件)

1. H. Konishi, M. Okumura, M. Saiki, H. Yamaguchi, and Y. Hidaka. Gly scan of prouroguanilin to elucidate essential amino acid residues for the intra-molecular chaperone function. *Peptide Science* 2008, 査読有, (2009). 473-476.
2. L. Ito, Y. Hidaka, H. Yamaguchi (6名3番目). Crystallization and preliminary X-ray structural studies of prouroguanilin. *Acta Crystallogr.*, 査読有, (2008). **F64**, 531-532.
3. M. Okumura, H. Konishi, L. Ito, M. Saiki, H. Yamaguchi, and Y. Hidaka. Folding analysis of de novo-designed disulfide hybrid proteins; role of propeptide region on protein folding. *Peptide Science* 2007, 査読有, (2008). 463-464.
4. L. Ito and H. Yamaguchi. Effect of amino acids and amino acid derivatives on crystallization of hemoglobin and ribonuclease A. *J. Synchrotron Rad.*, 査読有, (2008). **15**. 316-318.

[学会発表] (計20件)

1. 奥村正樹、新規創製した人工タンパク質におけるプロ領域の役割、第47回日本生物物理学会年会、2009年10月30、徳島文理大

学

2. 奥村正樹、Thermodynamic and kinetic studies on propeptide-mediated folding of *de novo*-designed disulfide hybrid proteins. 第8回オーストラリアペプチド学会、2009年10月12日、クーランコープ、オーストラリア

3. 奥村正樹、プロ領域を利用した人工タンパク質の立体構造形成機構の解析、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月21日、熊本

4. 松岡篤、ヒト由来アミロイド前駆体タンパク質細胞外領域 S-APP- $\alpha$  の発現、精製、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月21日、熊本

5. 伊藤廉、Solution designs for protein crystallization using amino acids and amino acid derivatives. The 4th Asian Conference on Crystal Growth and Crystal Technology. 2008年5月22日、東北大学

6. 奥村正樹、新規創製したジスルフィド混成蛋白質の立体構造形成機構解析、第44回ペプチド討論会、2007年11月7、8日、富山

7. 奥村正樹、Role of pro-leader sequence of *de novo* designed disulfide hybrid peptides. 4th International Peptide Symposium、7th Australian Peptide Conference、2nd Asia-Pacific Inter-national Peptide Symposium、2007年10月23日、ケアンズ (オーストラリア)

8. 伊藤廉、The effect of additives on protein crystallization. 2nd Inter-national Symposium on Diffraction Structural Biology 2007、2007年9月11、12日、東京

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：リフォールディング剤および蛋白質のリフォールディング方法

発明者：山口宏、伊藤廉、葛西祐介、  
山田英俊

権利者：学校法人関西学院

種類：出願

番号：PCT/JP2009/68438

出願年月日：2009年10月27日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 宏 (YAMAGUCHI HIROSHI)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号：19570112

(2)研究分担者

日高 雄二 (HIDAKA YUJI)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：70212165

(H20～ 連携研究者)