

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22499

研究課題名(和文) In Silico でのペプチド性加水分解酵素 (Catalytide) の創造

研究課題名(英文) Creation of novel Catalytide with In Silico

研究代表者

秋澤 俊史 (Akizawa, Toshifumi)

高知大学・医学部・特任教授

研究者番号：30202526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規低分子酵素ペプチド(Catalytide)の創造を最終的に市販のPCとMM2及びMMFF94パラメータを用いてCatalytideの立体構造解析を解析した。その結果、活性中心アミノ酸の決定と活性発現に必要な立体構造を決定することができた。そこで5残基ペプチドの中でA11-29に対して最も加水分解活性が強いGSGHRを基に様々なDアミノ酸置換のコンピュータモデリング及びその加水分解活性について検討を行なった結果、Dアミノ酸を含む新規Catalytideを発見することができた。以上より、安価なPCで新規Catalytideの創造が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Catalytideは新規性が極めて高く、特に5残基ペプチドは誘導体も含め合成は極めて簡単で、PCによる構造解析も酵素タンパク質と異なり短時間でできる。申請者らの保有する70種を超える5残基ペプチドの立体構造をPCで解析し、酵素活性に必要なアミノ酸の空間的位置関係を解析することで、新規Catalytideの創造が可能となる。本研究の成果は、これまでの治療薬とは全くストラテジーの異なった日本発の根本的なアルツハイマー病治療薬の開発のみでなく、凝集性タンパク質が発症原因となるパーキンソン病、ALS、プリオン、IgA腎症などの治療薬開発に繋がることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：To find the novel Catalytide in Silico, we analyzed the stereo-structure of Catalytides by Personal Computer (PC) with MM2 and MMFF94 parameters. As the results, we determined the active center amino acid and stereo-structure required for activity. We next tried to identify the novel Catalytide. We applied our finding to 5-mer Catalytide, GSGHR, that the most effective protease against A11-29 and several kinds of that derivatives including D-amino acid in the molecule. As the results, we identified the novel Catalytide. This study indicated that Catalytide can be created with ease in Silico by PC with MM2 and MMFF94 parameters without supercomputer. We are now trying to the novel Catalytide being applicable for SARS-CoV-2 spike.

研究分野：分析科学

キーワード：Catalytide アルツハイマー病 神経変性疾患 酵素ペプチド ALS パーキンソン病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

今まで、酵素活性発現には、基質との結合部位であるポケットや活性中心の立体構造を有する必要があることから高分子タンパク質特有の性質と考えられていた。現在までに、酵素の改変を目的とした研究が多く行われてきたが、X線構造解析のデータをもとに酵素の改変・活性の評価にはX線構造解析のデータをもとにスーパーコンピュータを用いた立体構造解析を行い、改変後のリコンビナントを作成し活性評価を行うことが必要である。これらの検討は高価な機器を使うため限られた施設でしか行うことはできず、そのため膨大な時間・費用が必要となる。さらには、活性評価においてはリコンビナントタンパク質を調製する必要があり、加えて、細胞由来の酵素ペプチド等のコンタミネーション等を回避するために精製過程が煩雑になる。

我々は、これまでは存在しないとされていた水分解酵素活性を有する5-9アミノ酸よりなる数種類の低分子合成ペプチドを見出しその総称として Catalytide (Catalytic peptide) と名付けた^{1, 2, 3}。Catalytide の内、Tob1 タンパク質 BoxA 領域由来の9残基合成ペプチド JAL-TA9 (YKGSGRMI) がアミロイド 42 (A 42) を分解するセリンプロテアーゼであることを明らかとした (図 1)²。



図 1 A 42 に対する JAL-TA9 の切断点。

a-A 42: 可溶性 A 42、s-A 42: 固体の不溶性 A 42

これまで短鎖ペプチドはフレキシブルな立体構造を構築し、タンパク質のような特徴的な高次構造は形成しないと考えられていた。我々は酵素活性を有するためには短鎖であっても酵素特有の立体構造を形成すると考え、NMR を用いて JAL-TA9 の立体構造を解析した。その結果、Lys と Met 及び Ser と Arg 間にそれぞれ NOE が観測され JAL-TA9 が立体構造を形成していることが証明された。次に NOE 情報を基に市販のパーソナルコンピュータ(PC)と MM2 及び MMFF94 パラメーターを用いてコンピュータモデリングを行った結果、セリンプロテアーゼ活性発現に必要なキャタリティックトライアドとオキシアニオンホールを形成していることが明らかとなった。一研究室内で PC による Catalytide の酵素活性が物理・化学的に解析できることが可能であることが証明された。(図 2)。

更に、NOE 情報を適応せずにコンピュータモデリングを行なった立体構造が NOE 情報適応時と類似していることが明らかとなった^{1, 2}。

このことから、Catalytide の立体構造解析には、MM2 及び MMFF94 パラメーターを用いた計算が有用であることが明らかとなり、一研究室内で PC による Catalytide の酵素活性が物理・化学的に解析できることが証明された。

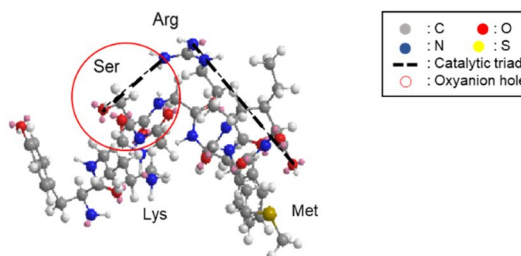


図 2 JAL-TA9 の立体構造解析

加えて、JAL-TA9 立体構造解析の結果、中心部分 GSGFR の 5 アミノ酸でもセリンプロテアーゼ活性発現に必要な立体構造を示すことが示唆された^{1, 2}。

GSGFR の酵素活性と立体構造を検討した結果、JAL-TA9 と比較するとアミロイド 42 に対する切断活性が低下したものの、NMR 測定においては JAL-TA9 と同様に Ser と Arg に NOE が観測された。このことより、5 残基でも酵素活性を示し、立体構造を形成することが明らかになった。さらに GSGFR を基に置換体を 35 種類合成し活性を比較した結果、1 アミノ酸置換により基質特異性が変化することが明らかになった。その中の 10 種類のペプチドについてコンピュータモデリングにて立体構造を解析し、活性ペプチドの立体構造に規則性の存在が示唆された^{1, 2}。これらの結果より、5-mer Catalytide である GSGFR は In Silico での新規 Catalytide 創造のモデルペプチドとなると考え、以下の研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、安価な PC と構造解析ソフトを用いて酵素活性発現に必須のアミノ酸の同定と立体構造決定を行い、最終的に In Silico による新規 Catalytide の創造を目指す。

3. 研究の方法

(1) In Silico での新規 Catalytide の検索：

立体構造を市販の PC と構造解析ソフト (Chem 3D) を用いて MM2 及び MMFF94 パラメーターで解析を行う。各アミノ酸の空間的距離を含むアミノ酸即その相互の位置関係を詳細に比較検討することで活性発現に必須のアミノ酸の同定と立体構造を決定する。方法としては、Chem 3D 上でペプチドを作成し、すべてのペプチド結合及び二面角を 180 度と規定する。次に、MM2 パラメーターにて total energy が安定するまで繰り返し構造最適化を行い、その後 MMFF94 パラメーターを用いて再度構造最適化を行う¹⁾。空間的な距離の算出にはダミーボンドを作成し距離を測定する方法を用いた。これらの方法により GSGFR を基に D アミノ酸置換体などの立体構造を推定 JAL-TA9 及び GSGFR 等と比較検討することで、活性型に近いものと不活性型と考えられるものを選出した。ドッキングシミュレーションは A 11-29 を基質として行った。

(2) ペプチド合成：

選出したペプチドを固相法で自動合成し、HPLC を用いて精製する。目的ペプチドを質量分析により確認した^{1,2,3)}。

(3) 酵素活性測定：

酵素活性の測定では、基質として A 42、SOD1、-Synuclein、tau 由来フラグメントペプチドを用いて行った。切断活性は、HPLC 及び MS により評価した^{1,2,3)}。

4. 研究成果

(1) 活性中心の同定と切断部位とのドッキングシミュレーション

Catalytide として同定している 5 残基ペプチド (RYGSG) の立体構造解析を MM2 及び MMFF94 パラメーターを用いて行った。その結果、活性中心が Ser である構造と Tyr である構造の 2 パターンが可能性として考えられた。RYGSG の A 11-29 に対する切断点を MS 及び HPLC で解析すると A 11-29 の二か所で優先的に切断することが明らかになった。そこで、酵素として RYGSG、基質として A 11-29 を用いてドッキングシミュレーションで立体構造解析及び切断部分のペプチド結合の距離及びエネルギーを解析した。まず、活性中心が Ser である構造を用いた場合は、A 11-29 の切断点部分のカルボニル基と RYGSG の Ser との距離は 5.9 であった。一方、活性が弱かった GSGYR を用いて同様の検討を行なった結果、A 11-29 のカルボニル基との距離は 7.0 となり RYGSG と比較すると距離が離れていることが明らかになった。また、RYGSG の Tyr が活性中心と考えられる立体構造を用いて同様にを行った結果、Ser が活性中心と考えられる立体構造へ変化し Ser と A 11-29 のカルボニル基との距離が 6.0 であることが明らかになった (図 3a)。これらのことから RYGSG は Ser を活性中心とする Catalytide であることが示唆された。さらに、ドッキングシミュレーション後に各 A 11-29 のカルボニル基と近づけてエネルギーを算出した結果、切断部位ではエネルギーが低値を示すことが明らかになった (図 3b)。このことから、市販の PC を用いた立体構造解析により Catalytide の加水分解酵素活性の評価が可能であることが示唆された。

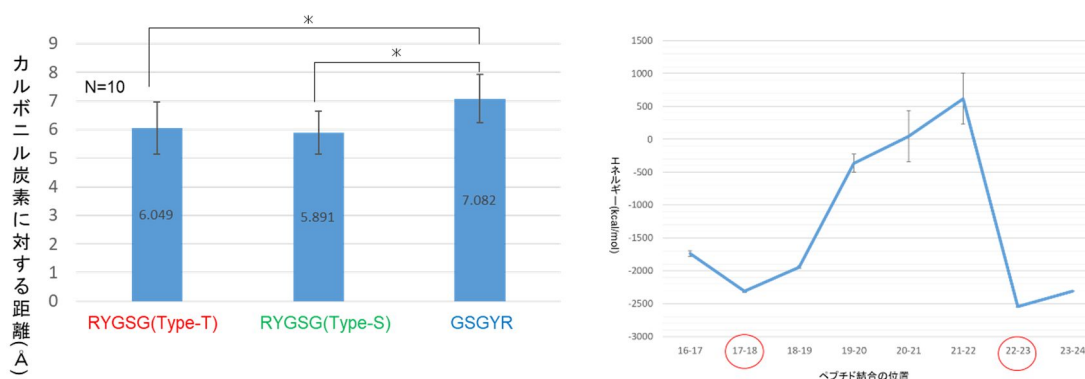


図 3 ドッキングシミュレーション

(a) A 11-29 のカルボニル炭素に対する距離 (b) ペプチド結合の位置とエネルギー

(2) In Silico による新規 Catalytide の創造

これまでの検討により、5-mer Catalytide の中で GSGHR が A 11-29 に対して最も活性が強い加水分解酵素活性を示すことが明らかとなっている²⁾。そこで GSGHR を基に様々な D アミノ酸置換のコンピュータモデリング及びその切断活性について検討を行なった。

まず、活性の強い GSGHR においては His のイミダゾール基と C-末端カルボキシル基が近い構造を取ることが示された。一方、コンピュータモデリングで全てのアミノ酸を D 体置換した D-GSGHR、逆配列の D 置換体である retro-inverso-GSGHR では 2 種類とも GSGHR と比較して立体構造が大きく崩れたことから、酵素活性を示さないことが考えられた (図 4)。実際に 2 種類を合成し活性測定を行った結果、酵素活性は認められず、コンピュータモデリングによる予測が可能であることが裏付けられた。

次に、そこでさらに、GSGHR の各アミノ酸をそれぞれ D-アミノ酸に置換したペプチドの立体

構造をコンピュータモデリングで解析したところ、GSGHR の Ser 及び His を D-アミノ酸に置換した G_DSG_DHR では GSGHR の立体構造と同様に His のイミダゾール基及び C-末端カルボキシル基の距離が近く、活性発現に必要な立体構造を形成していることが示唆された (図 4)。このことから、より生体内で安定な Catalytide 候補となり得る可能性が示唆された。一方、全てのアミノ酸を D 体に置換した D-GSGHR では Ser が離れた位置に存在し、活性型ではないことが示唆された。また、GSGHR と同じ立体構造を形成する可能性のある D-アミノ酸を用いた逆配の Retro-inverso-GSGHR においても酵素活性を示す可能性のある立体構造を形成することはなかった。これらのペプチドの酵素活性を測定した結果、 G_DSG_DHR に酵素活性が認められたことより、PC を用いたコンピュータモデリングにより新規 Catalytide の創造が可能であると結論付けた。

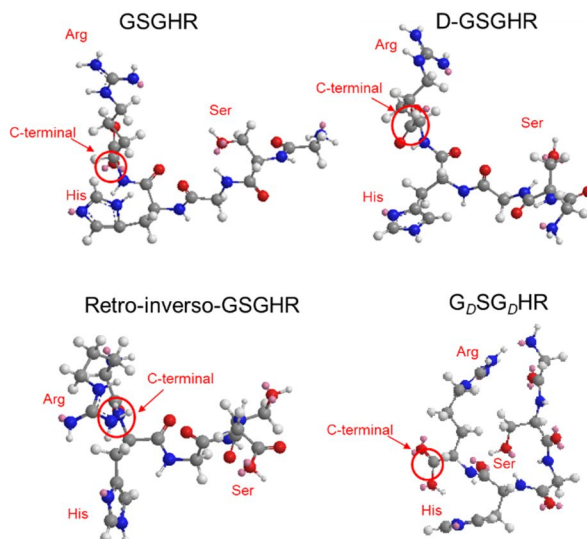


図 4 GSGHR のコンピュータモデリング

本研究の成果は現在論文投稿の準備をおこなっている。また、本研究の方法の有用性を実証すべく、SARS-CoV-2spike 由来のペプチドフラグメントを用いてコロナに有効な新たな Catalytide の検索・創造に取りかかったところである。

引用論文

- 1) Rina Nakamura, Motomi Konishi, Masanari Taniguchi, Yusuke Hatakawa, Toshifumi Akizawa: The discovery of shorter synthetic peptides derived from Tob1 protein, *Peptides* 116, 71-77, 2019
- 2) Rina Nakamura, Motomi Konishi, Yoichiro Higashi, Motoaki Saito, Toshifumi Akizawa: Comparison of the catalytic activities of 5-mer synthetic peptides derived from Box A region of Tob/BTG family proteins against the amyloid-beta fragment peptides, *Integrative Molecular Medicine*, 6, 1-4, 2019
- 3) Rina Nakamura, Motomi Konishi, Yusuke Hatakawa, Motoaki Saito, Toshifumi Akizawa: The Novel Catalytic Peptide, A Synthetic Nona-Peptide (JAL-TA9) Derived from Tob1 Protein, Digested the Amyloid- Peptide, *Journal of Royal Science*, 1, (2) 30-35, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hatakawa Yusuke, Nakamura Rina, Konishi Motomi, Sakane Toshiyasu, Tanaka Akiko, Matsuda Akira, Saito Motoaki, Akizawa Toshifumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Amyloid beta cleavage by ANA TA9, a synthetic peptide from the ANA/BTG3 Box A region	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions	6. 最初と最後の頁 e12146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/trc2.12146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Rina, Konishi Motomi, Sakaguchi Yuko, Hatakawa Yusuke, Tanaka Akiko, Sakane Toshiyasu, Saito Motoaki, Akizawa Toshifumi	4. 巻 4
2. 論文標題 JAL-TA9 Inhibits Aggregation of Hprp180-192 through the Cleavage Reaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacy and Pharmacology Research	6. 最初と最後の頁 23-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26502/fjppr.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hatakawa Yusuke, Nakamura Rina, Konishi Motomi, Sakane Toshiyasu, Saito Motoaki, Akizawa Toshifumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Catalytides derived from the Box A region in the ANA/BTG3 protein cleave amyloid- fragment peptide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e02454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2019.e02454	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Rina, Konishi Motomi, Hatakawa Yusuke, Saito Motoaki, Akizawa Toshifumi	4. 巻 1
2. 論文標題 The Novel Catalytic Peptide, A Synthetic Nona-Peptide (JAL-TA9) Derived from Tob1 Protein, Digests the Amyloid Peptide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Royal Science	6. 最初と最後の頁 30-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Rina, Konishi Motomi, Higashi Youichirou, Saito Motoaki, Akizawa Toshifumi	4. 巻 6
2. 論文標題 Comparison of the catalytic activities of 5-mer synthetic peptides derived from Box A region of Tob/BTG family proteins against the amyloid-beta fragment peptides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Integrative Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/IMM.1000374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Rina Nakamura, Motomi Konishi, Yusuke Hatakawa, Saito Motoaki, Toshifumi Akizawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Evaluation of the proteolytic activity of 5-mer peptides in BoxA region of Top/BTG family proteins against Amyloid- fragment peptides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide Science 2019, The Japanese Peptide Society	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 中村里菜、小西 元美、新武 享明、東 洋一郎、齋藤 源顕、秋澤 俊史
2. 発表標題 Alzheimer's model mouse を用いた 9 残基酵素ペプチド JAL-TA9 脳内投与の効果
3. 学会等名 第 20 回 KMS Research Meeting
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rina Nakamura, Youichirou Higashi, Takaaki Aratake, Motomi Konishi, Motoaki Saito, Toshifumi Akizawa
2. 発表標題 Effects of 9-Mer Catalytide, JAL-TA9 to APP Knock-in Mice through the Single Direction Dose into Hippocampus
3. 学会等名 International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and related neurological disorders (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 里菜、小西 元美、新武 享明、東 洋一郎、齊藤 源顕、秋澤 俊史
2. 発表標題 Alzheimer's model mouse を用いた 9 残基酵素ペプチド JAL-TA9 脳内投与の効果
3. 学会等名 第 39 回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rina Nakamura, Youichirou Higashi, Takaaki Aratake, Motomi Konishi, Yusuke Hatakawa, Motoaki Saito, Toshifumi Akizawa
2. 発表標題 Catalytide improves the cognitive deficits by injecting into the CA1 of hippocampus in Alzheimer's disease model mice
3. 学会等名 Cold Spring Haver (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村里菜、小西元美、齊藤源顕、秋澤俊史
2. 発表標題 Tob/BTG ファミリータンパク質 BoxA 領域由来フラグメントペプチドの加水分解酵素
3. 学会等名 病態プロテアーゼ学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村里菜、小西元美、齊藤源顕、秋澤俊史
2. 発表標題 フラグメントペプチドを用いた Tob/BTG ファミリータンパク質 BoxA ドメインの機能解析
3. 学会等名 第 32 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本隆幸、小西元美、中村里菜、秋澤俊史
2. 発表標題 5 残基 Catalytide (RHGSG) とA 1-20 とのドッキングシュミレーション
3. 学会等名 第 32 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西航平、小西元美、中村里菜、秋澤俊史
2. 発表標題 5 残基 Catalytide (RYGSG) とA 11-29 とのドッキングシュミレーション
3. 学会等名 第 32 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rina Nakamura, Motomi Konishi, Yusuke Hatakawa, Saito Motoaki, Toshifumi Akizawa
2. 発表標題 Evaluation of the proteolytic activity of 5-mer peptides in BoxA region of Top/BTG family proteins against Amyloid-fragment peptides
3. 学会等名 第 56 回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rina Nakamura, Yusuke Hatakawa, Motomi Konishi, Saito Motoaki, Toshifumi Akizawa
2. 発表標題 Creating the novel proteolytic peptide (Catalytide) extracting from protein enzyme
3. 学会等名 11th General Meeting of the International Proteolysis Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アミロイド の凝集抑制剤、アミロイド 凝集疾患用医薬組成物、及びその用途	発明者 秋澤俊史、齊藤源 顕、東洋一郎、中村 里菜	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2020-167404	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------