

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 10 月 25 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12655

研究課題名(和文)自己組織化ペプチドによるレドックス制御

研究課題名(英文)Redox regulation of self-organized peptides

研究代表者

平岡 和佳子(WAKAKO, HIRAOKA)

明治大学・理工学部・専任教授

研究者番号：00212168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ペプチドの自己組織化を金属により制御することで、その構造を多様化し、金属中心とレドックス関連分子との結合・反応性を制御し、生化学や医学への応用を目指すものである。本研究では、ペプチドと金属イオンとの結合性に着目し、その親和性・立体構造を各種分光法により明らかにすることを試みた。あわせて、各種レドックス関連分子との反応を試み、金属結合ペプチドのレドックス調整因子としての可能性を明らかにした。さらに、金属結合による特異的変性を示すプリオンペプチド・アミロイドペプチド鎖を用いて、タンパク変性における金属イオンの影響を検討し、あわせて細胞毒性等への影響についての評価も実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属イオンとの結合により、多様な高次構造を作るペプチドが報告されている。これらのペプチドには、各種の酵素機能などの機能性ペプチドとしての可能性が期待されている。本研究は、生体内で金属イオンと会合することにより、自己組織化し、レドックス制御機能を有するペプチド鎖をデザイン・作成することを目的とした。遷移金属の多くは、酵素活性中心として、レドックス制御に大きく関与していることが報告されていることから、自己組織化を金属により制御することで、その構造を多様化し、あわせて金属中心とレドックス関連分子との結合・反応性を見いだす本研究の試みは、新規生化学や医学への応用が期待できる研究である。

研究成果の概要(英文)：This study aims to diversify the structure of peptides by controlling their self-assembly with metals, and to control the binding and reactivity between metal centers and redox-related molecules for applications in biochemistry and medicine. In this study, we focused on the binding properties of peptides to metal ions and attempted to clarify their affinity and conformation by CD and ESR. In addition, we also attempted to elucidate the possibility of metal-binding peptides as redox regulators by attempting to react with various redox-related molecules. In addition, the effects of metal ions on protein denaturation were examined using prion and amyloid peptide chains that show specific denaturation by metal binding, and the effects of metal ions on cytotoxicity were also evaluated.

研究分野：生物物理学

キーワード：機能性ペプチド レドックス制御 プリオン 自己組織化 酸化ストレス 金属配位

## 1. 研究開始当初の背景

特定の金属イオンとの結合により、多様な高次構造を作るペプチドの医学応用が注目を集めている。本研究では、生体内で金属イオンと会合することにより、自己組織化し、レドックス制御機能を有するペプチド鎖をデザイン・作成することを目的としている。二価遷移金属の多くは、単体、もしくは酵素活性中心として、レドックス制御に大きく関与している。金属結合の様式は多様であり、その立体構造は周辺ペプチドの配列により、大きく変化することが知られている。本研究では、ペプチドの自己組織化を金属により制御することで、その構造を多様化し、金属中心とレドックス関連分子との結合・反応性を制御し、生化学や医学への応用が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、ペプチドの自己組織化を金属により制御することで、その構造を多様化し、金属中心とレドックス関連分子との結合・反応性を制御し、生化学や医学への応用を目指すものである。金属結合性を持つペプチドは、その配列と金属イオンに依存して、多様な構造を形成し、結合中心の金属イオンの化学的性質も、多様なものになり得る。本研究では、ペプチドと金属イオンとの結合性に着目し、その親和性・立体構造を各種分光法により明らかにしていく。あわせて、pK値・電気伝導度等の変化と、各種レドックス関連分子との反応を試み、レドックス調整因子としての可能性を検討する。さらに、金属結合による特異的変性を示すプリオンペプチド・アミロイドペプチド鎖を用いて、病因と関連した特異的金属に競合する金属の導入を試み、変性に関連した各種の測定結果に対する金属イオンの影響を評価していく。

## 3. 研究の方法

研究に用いたペプチド、プリオン(PrP)のアミノ酸配列60-91の領域は、8個のアミノ酸配列が4回繰り返されるオクタリピートと呼ばれ、Cu<sup>2+</sup>の結合サイトとして知られている。本研究では、この8個のアミノ酸配列(octapeptide)を試料の1つとした。さらに、神経毒性領域であり、Cu<sup>2+</sup>との結合部位であるPrP93-102、さらにこのPrP93-102の配列中の93番94番のグリシン(G)をアラニン(A)に置換したペプチドPrP93-102; 93,94 GG/AAを使用した。ペプチドはライフテクノロジーズジャパンに合成を委託し入手した。

自己組織化ペプチドの相互作用の定量と構造変化の解析: ペプチド鎖の金属結合による二次構造の変化は、CDスペクトルの紫外領域の変化によって検出した。

自己組織化ペプチドにおける酵素反応発現の試み: 金属単体、および金属錯体と反応することが期待される各種のレドックス分子を反応させ、金属結合ペプチドとの反応性を検証した。反応の評価には、酸化ストレス検出用各種試薬、ESR-spintrapping法を用いて反応量の定量解析を実施した。また、より詳細な酵素活性中心としての機能を観察するために、SOD様活性、カタラーゼ様活性等レドックス関連の各種酵素活性等の検出も試みた。

ペプチド変性疾患モデルの確立: 金属結合による特異的変性を示すプリオンペプチド・アミロイドペプチド鎖を用いて、競合金属・各種分子の導入を行い、変成評価、細胞内での毒性試験を実施した。

## 4. 研究成果

octapeptideへの金属競合結合: octapeptide-Cu錯体を形成させた試料にNi<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>を加え、CD測定を行った。その結果、Ni<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>を加えた試料において600nm付近のピークの高さが減少し(Fig. 1)、Ni<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>がoctapeptide-Cuの錯体構造の安定性に影響を与えていることが明らかとなった。さらに、これらの金属イオンがoctapeptide-Cu錯体へ与える影響は濃度やpHによって変化することが明らかとなった。(Fig. 2)。

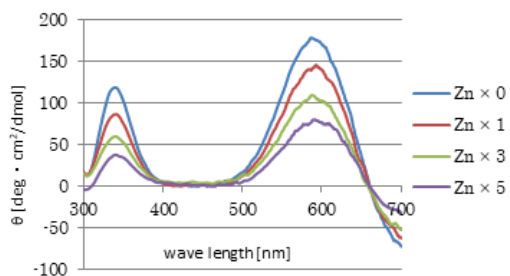


Fig.1. octapeptide-Cu 錯体と Zn<sup>2+</sup>との競合

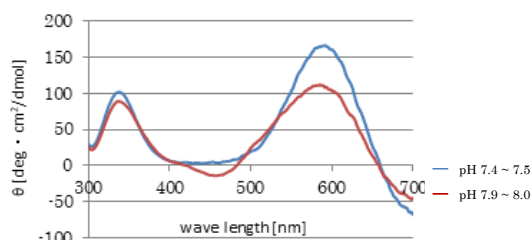


Fig.2. octapeptide-Cu 錯体と Co<sup>2+</sup>との競合  
における pH の影響

PrP93-102の金属結合における配列選択性:

PrP93-102(GGTHSQWNKP)とPrP93-102; 93,94 GG/AA(AATHSQWNKP)を用いてCu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>をそれぞれ等モル加え、CD測定を行ったところCu<sup>2+</sup>錯体と、Ni<sup>2+</sup>錯体由来する特徴的なCDスペクトルが得られた(Fig. 3)。錯体形成に93、94番のグリシンが重要な働きをしていることが示唆され、金属に配位するアミノ酸残基の配列に選択性があることが明らかとなった。

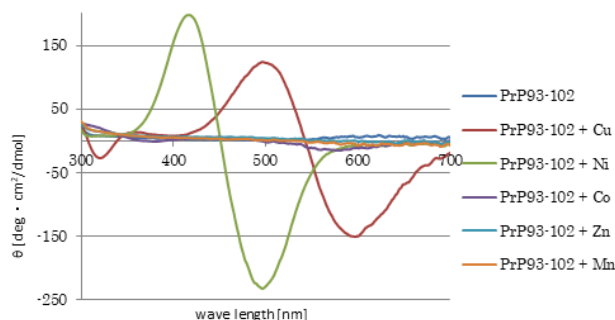


Fig. 3 PrP93-102に金属イオンを加えたCDスペクトル

ESR スピントラッピング法を用いた Octapeptide-金属錯体による ROS 発生の測定：

スピントラップ剤として5-(2, 2-Dimethyl-1, 3-Propoxycyclophosphoryl)-5-Methyl-1-Pyrroline N-Oxide (CYPMPO) (三國製薬工業)を用いた各飼料を定められた濃度で混ぜ、ESR測定用フラットセルに移し、室温でESR測定(日本電子, JEOL JES-RE1X)を行った。結果をFig.4に示した。系で発生しているOHを定量し、グラフ化した。Cu<sup>2+</sup>とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の系ではフェントン反応によりもOHラジカルを多く生成すると考えられたが、実際にはCu<sup>2+</sup>単体よりも減少していた。

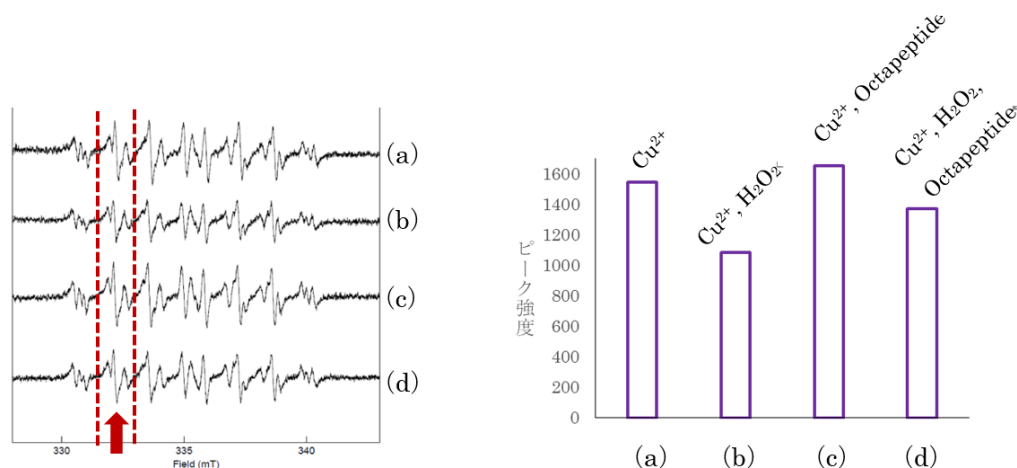


Fig.4 Cu<sup>2+</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、OctapeptideのESRスピントラッピングスペクトル

Octapeptide-金属錯体の細胞への影響：Octapeptide-各種金属(Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>)錯体と活性酸素種を細胞に加えて培養し、細胞増殖率を測定することで、生体内での金属に対するOctapeptideの働きを明らかにすることを試みた。ヒト骨髄性白血病細胞PLB-985細胞は、10%仔牛胎児血清(Fetal Bovine Serum: FBS, Bio Sera, Mexico)を含むRPMI-1640培地(Nissui)で維持した。超純水に溶解した金属塩、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Octapeptide、Antennapedia結合Octapeptideを、図のように組み合わせてRPMI-1640培地に加え、細胞を2日間インキュベートした。その後、細胞計数分析装置で細胞数を測定し、細胞増殖率を求めた。細胞増殖率は各試薬の処理濃度における細胞数を、無処理の細胞数に対する割合として算出した(Fig.5, 6)。Fig.5より、Cu<sup>2+</sup>の処理にOctapeptideを加えた場合、Cu<sup>2+</sup>単独の時と同様の細胞増殖率を示したことから、細胞外では、OctapeptideはCu<sup>2+</sup>の細胞毒性に対して影響を与えないことが示された。一方で、Antennapedia結合Octapeptideを加えると、Cu<sup>2+</sup>による細胞毒性を軽減させたことから、Octapeptideは細胞内でOctapeptide-Cu<sup>2+</sup>錯体を作ることでCu<sup>2+</sup>による細胞毒性を抑制することが示唆された。Fig.6より、Octapeptide単体で処理した場合の細胞増殖率はZn<sup>2+</sup>単体の細胞増殖率と比較して有意な差は見られなかった。Antennapedia結合Octapeptideで処理した場合の細胞増殖率はZn<sup>2+</sup>単体の細胞増殖率よりも有意に低加した。

以上から、Zn<sup>2+</sup>による細胞毒性は、細胞内でOctapeptide-Zn<sup>2+</sup>錯体を作ることで増幅したと考えられる。各値は、独立した3回の実験値の平均を示し、エラーバーは標準偏差を表す。

(\*p<0.05, \*\*: p<0.005)

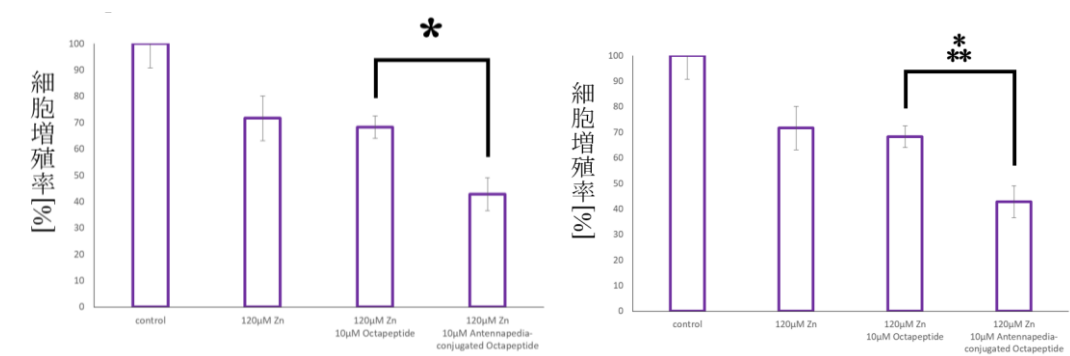


Fig.5 Octapeptide と Cu<sup>2+</sup>の細胞への影響      Fig.6 Octapeptide と Zn<sup>2+</sup>の細胞への影響

細胞増殖抑制実験では、細胞内において Octapeptide が Cu<sup>2+</sup>と反応することで、Cu<sup>2+</sup>による細胞毒性が抑制されたことが示された。さらに、Cu<sup>2+</sup>と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による細胞毒性を抑制しないことから、Cu<sup>2+</sup>の細胞毒性は、Cu<sup>2+</sup>と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の反応を経由するものとそうでないものがあると考えられる (Fig.5)。また、細胞内 Octapeptide が Zn<sup>2+</sup>と反応し、より多くの細胞毒性を生じることが示された。

ESR スピントラッピング実験では、Octapeptide と Cu<sup>2+</sup>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による OH ラジカル発生を確かめた。それによって、各反応における OH 生成と、細胞の実験との間に矛盾がないことが確認された。

プリオンタンパク質の Octarepeat 領域と Cu<sup>2+</sup>との間で取り得る錯体構造は複数種類あることが確認されており、今回の研究で明らかになった Octapeptide の働きも、錯体構造と関係している可能性がある。また、過去の研究より、プリオンタンパク質は細胞内 Fe<sup>2+</sup>の量を一定に保つ、もしくは Fe<sup>2+</sup>の細胞内取り込みを促進する役割を持つことが示されていることから、Fe<sup>2+</sup>の場合と同様に、プリオンタンパク質には Cu<sup>2+</sup>と反応することで、細胞内において過剰になった Cu<sup>2+</sup>の量を調節し、Cu<sup>2+</sup>による細胞損傷から細胞を保護する機能があることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 O. Inanami, W.Hiraoka, Y. Goto, H.Takakura, M.Ogawa	4. 巻 6
2. 論文標題 Front Cover: EPR Characterisation of Phthalocyanine Radical Anions in Near-Infrared Photocleavage of the Hydrophilic Axial Ligand of a Photoimmunotherapeutic Reagent, IR700	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chem Photo Chem	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cptc.202100278	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 該当する

1. 著者名 Wakako Hiraoka, Osamu Inanami, Shuhei Murakami	4. 巻 159, S1
2. 論文標題 Redox Potential of Single Octarepeat from Prion Protein with Divalent Metals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 S23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.072	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Wakako Hiraoka, Osamu Inanami, Shuhei Murakami
2. 発表標題 Redox potential of single octarepeat from prion protein with divalent metals
3. 学会等名 Pacifichem 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲波修, 平岡和佳子, 後藤悠人, 高倉栄男, 小川美香子
2. 発表標題 次世代光免疫療法に用いられる IR700に近赤外光照射によって生じる2つのアニオンラジカルと軸配位子切断との関連性
3. 学会等名 SEST2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平岡和佳子, 柏木慧太, 村上周 平
2. 発表標題 プリオンペプチド二価金属錯体結 合による細胞内レドックス制御へ の効果
3. 学会等名 SEST2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wakako Hiraoka, Osamu Inanami, Shuhei Murakami
2. 発表標題 Redox Potential of Single Octarepeat from Prion Protein with Divalent Metals
3. 学会等名 SFRBM 27th annual conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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