

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14784

研究課題名（和文）システインパースルフィド含有タンパク質の化学合成と生理的意義の探求

研究課題名（英文）Synthesis and analysis of cysteine persulfide-containing protein

研究代表者

武居 俊樹 (Takei, Toshiki)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：00844771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、システインパースルフィド (Cys-SSH) の生理的意義の探求を目指し、均一なCys-SSH含有ペプチド（タンパク質）の調製法の開発、安定性評価およびフォールディングに及ぼす影響を検証した。その結果、トリフェニルメタンチオールをSS結合によりCysに導入することで、酸処理のみによりCys-SSH含有ペプチドの調製に成功した。一方、Cys-SSH含有ペプチドは酸性条件においても不安定であった。グルタチオンとのトリスルフィド結合を有するペプチドを等価体としてフォールディングを試みたところ、チオールペプチドと比較して顕著にフォールディング速度が向上することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質中の構成残基としてのCys-SSHは未だ不明瞭であり、その生理的意義に関心が持たれている。一方で、均一なCys-SSH含有ペプチドを調製する方法はなく、その物性や潜在的な機能を明らかにすることは困難であった。本研究では、均一なCys-SSH含有ペプチドを調製する簡便な手法を開発し、フォールディング速度に及ぼす影響を示すことに成功した。本研究の成果は、Cys-SSHに関する基礎研究の充実に資するほか、フォールディング病などの疾患に理解の一助になると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, a method for the preparation of homogeneous cysteine persulfide (Cys-SSH) containing peptide (protein) was developed to explore the physiological significance of Cys-SSH, and evaluate their stability, and their effects on folding. Triphenylmethanethiol was introduced into Cys via SS bond, and it efficiently produced Cys-SSH containing peptide only by acid treatment. On the other hand, the Cys-SSH containing peptide was unstable even under acidic conditions. The trisulfide containing peptide with glutathione was tried to fold as an equivalent, and it was found that the folding rate was remarkably improved compared to that of the thiol peptide.

研究分野：タンパク質化学合成

キーワード：フォールディング システインパースルフィド ペプチド合成 タンパク質合成

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Cys に過剰に硫黄原子が付加したシステインパースルフィド (Cys-SSH) は、古くから存在が認められている活性硫黄分子種である。近年の研究から、システイン合成酵素の作用により生合成された Cys-SSH は、ミトコンドリア内のシグナル伝達に関与し、またタンパク質の構成残基として新生ポリペプチド鎖に挿入されることが明らかにされた。アミノ酸レベルでの機能解明が進む一方で、タンパク質の構成残基としての生理的意義は不明瞭である。一般的に、パースルフィドは不安定であることが知られ、現行の手法では無機硫化物との反応により不均一なパースルフィドを生成する方法が取られる。このため、現在の研究手法では均一な Cys-SSH 含有ペプチド (タンパク質) の調製自体が困難であり、その物性や機能の評価は不可能である。このため、均一な Cys-SSH 含有ペプチド (タンパク質) を調製する方法の開発が求められており、その生理的意義の解明に期待が持たれている。

2. 研究の目的

本研究では、前項の研究背景を基に、タンパク質の化学合成の手法を駆使することで、均一な Cys-SSH 含有ペプチド (タンパク質) を調製する方法を開発し、*in vitro* での安定性を評価する。また、合成した Cys-SSH 含有ペプチド (タンパク質) のフォールディングの挙動を解析することで、タンパク質中に存在する Cys-SSH の潜在的な機能に迫るとともに、フォールディング病などの疾患の理解の一助となる新たな知見を提供することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 均一な Cys-SSH 含有ペプチドの調製法の開発

反応速度論の解析によれば、Cys-SSH の pKa はおよそ 4.34 と見積もられており、反応性が高く、また中性以上の pH 条件では極めて不安定であると考えられる。このため、酸性条件で脱保護可能なトリチル (Trt) 基を SS 結合を介して Cys に導入したパースルフィド調製法の開発を試みる。また、より汎用性の高い手法として、ニトロベンジル及びクマリン骨格を有する光分解性保護基を SS 結合により導入し、光照射下脱保護することで所望の Cys-SSH 含有ペプチドを得る手法の開発も行う。

(2) Cys-SSH 含有ペプチドの安定性評価及び安定性向上の検討

(1)により得られた Cys-SSH 含有ペプチドを用いて、*in vitro* での安定性を評価する。酸性溶液中での挙動や、有機溶媒・糖類の添加により安定性の向上が可能か、逆相 HPLC 及び質量分析を用いて生成物を解析する。

(3) Cys-SSH 含有ペプチド (タンパク質) のフォールディング挙動の解析

(1)及び(2)により得られた知見を基に、Cys-SSH 含有ペプチドのフォールディングを行う。とりわけ、弱酸性条件かつ小胞体内の酸化的環境を考慮した条件を用いて、フォールディング反応の速度に及ぼす影響を検証する。

4. 研究成果

(1) 均一な Cys-SSH 含有ペプチドの調製法の開発

研究方法に従い、まずはモデルペプチドを用いて Trt 基を SS 結合によって導入した Cys-SSH 含有ペプチド前駆体の調製を試みた。固相合成によって得られたペプチド樹脂を 2,2-dipyridyldisulfide (DPDS) を含む TFA カクテルにより処理し、Cys が SPy 基により保護された粗ペプチドを得た。その後、DMF 中トリフェニルメタンチオールを反応させることで、対応する Cys-SSH 含有ペプチド前駆体を調製した。続いて、得られた前駆体をトリイソプロピルシラン (TIS) を含む TFA カクテルによって処理したところ、

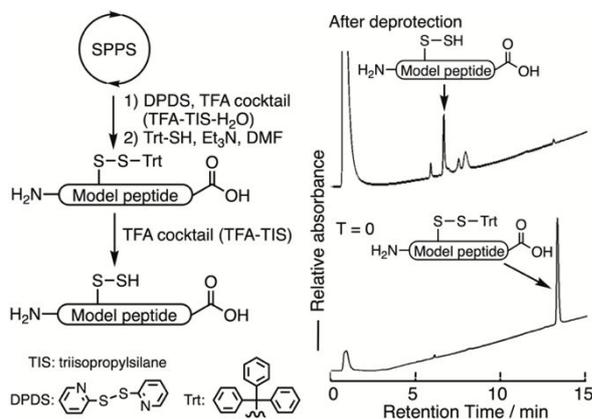


Fig. 1. Trt 基を用いた Cys-SSH 含有ペプチドの調製。

目的としたパースルフィド体を生成させることに成功した (Fig. 1)。この際、分解によって生じたチオールペプチド、パースルフィド体によるホモダイマー及びヘテロダイマーの生成も確認された。

続いて、上記パースルフィド体の粗ペプチドに対して *o*-nitrobenzyl bromide 及び 4-(bromomethyl)-7-(diethylamino) coumarin を反応させることで、それぞれニトロベンジル型、クマリン型の光分解性保護基を導入した Cys-SSH 含有ペプチド前駆体を調製した (Fig. 2)。しかし、光照射による脱保護を試みたが、脱保護過程で副反応が生じ、望むパースルフィド体を得ることは出来なかった。このため、トリフェニルメタンチオールによって得られた Cys-SSH 含有ペプチド前駆体を用いて、Cys-SSH 含有ペプチドの安定性の評価を行うこととした。

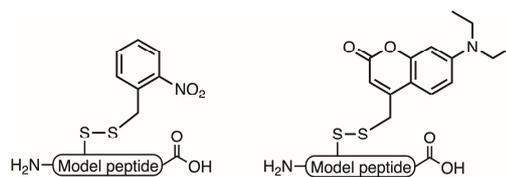


Fig. 2. 光分解性保護基を有する Cys-SSH 含有ペプチド前駆体。

(2) Cys-SSH 含有ペプチドの安定性評価及び安定性向上の検討

(1)により開発したトリフェニルメタンチオールを用いた調製法により、Cys-SSH 含有ペプチドの安定性を評価した。まずは、Fig.1 に示す条件にて調製した Cys-SSH 含有ペプチドの単離を試みた。その結果、得られた Cys-SSH 含有ペプチドを凍結乾燥したところ、そのほとんどが分解していることが逆相 HPLC による分析で明らかになった。このため、次に単離した酸性溶液中での安定性を評価することとした。しかし、酸性溶液中であっても室温下徐々に分解が進行し、安定に取り扱うことが困難であることが明らかになった (Fig. 3 (a))。そこで、安定性の向上を図るため、種々の有機溶媒の添加や糖類の添加を試みた。その結果、終濃度 0.25 M のスクロースを添加した条件において、軽微な分解抑制が観測された。また、単離直後にスクロースと混合して凍結乾燥したところ、安定性が大幅に向上することが明らかになった (Fig. 3 (b))。しかし、水溶液中では依然として不安定であり、中性以上の pH では分解が顕著であるため、Cys-SSH 含有ペプチドを直接フォールディングに使用することは困難であると考えられた。

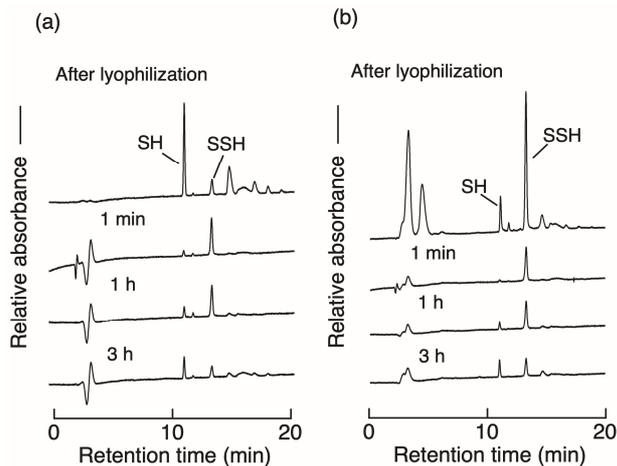


Fig. 3. Cys-SSH 含有ペプチドの安定性: (a) control, (b) 0.25 M スクロース。

(3) Cys-SSH 含有ペプチド (タンパク質) のフォールディング挙動の解析

(2)による分析の結果、Cys-SSH 含有ペプチドは極めて不安定であり、安定に取り扱うることが困難であることが明らかとなった。そこで、グルタチオンとのトリスルフィド結合を有するペプチドを調製し、パースルフィド等価体としてフォールディングを行うこととした。小胞体内は細胞質と比較して酸化的環境であることが知られ (還元型・酸化型グルタチオン比: 1:1-3:1)、新生ポリペプチド鎖中の Cys-SSH はその高い反応性により速やかにグルタチオンとのトリスルフィド結合を形成すると考えられる。すなわち、小胞体内で生じ得るトリスルフィド含有ペプチドと通常チオールペプチドのフォールディングを比較し、Cys-SSH の影響を検証することとした。グルタチオンとのトリスルフィド結合は、(1)にて開発した手法を応用し、SPy 基により活性化されたグルタチオンと Cys-SSH 含有ペプチド前駆体を TFA 中で反応させることで得ることとした。条件検討を行ったところ、ペプチド中の Cys に対して 1 等量のグルタチオンを添加することで、トリスルフィド含有ペプチドを得ることに成功した。そこで、2 対の SS 結合を有する endothelin をターゲットとし、パースルフィド等価体を調製した。得られたパースルフィド等価体と対応するチオールペプチドを 3 M のグアニジン塩酸塩、1 mM の酸化型グルタチオンおよび還元型グルタチオンを含む pH 6 の緩衝溶液に溶解させ、フォールディングを試みた。その結果、パースルフィド等価体は通常チオールペプチドと比較して有意にフォールディング速度が向上することが明らかとなった (Fig. 4)。

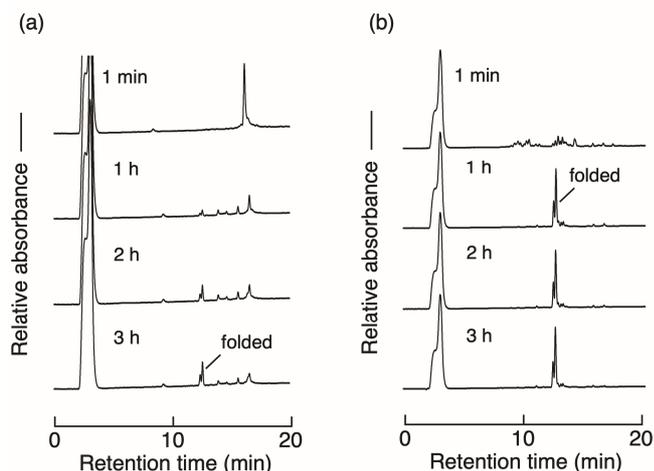


Fig. 4. Endothelin を用いた酸化的フォールディングの比較: (a) チオールペプチド, (b) トリスルフィド含有ペプチド。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Islam Md Nurul, Zhang Weidong, Sakai Katsuya, Nakazato Yuki, Tanida Ryota, Sakoda Hideyuki, Takei Toshiki, Takao Toshifumi, Nakazato Masamitsu	4. 巻 151
2. 論文標題 Liver-expressed antimicrobial peptide 2 functions independently of growth hormone secretagogue receptor in calorie-restricted mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 170763 ~ 170763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.peptides.2022.170763	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 -

1. 著者名 Takei Toshiki, Tanaka Hideaki, Okumura Nobuaki, Takao Toshifumi, Moroder Luis, Hojo Hironobu	4. 巻 29
2. 論文標題 Chemical synthesis of per selenocysteine human epidermal growth factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 e3464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/psc.3464	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 該当する

1. 著者名 Suetake Isao, Sato Kazunobu, Sugishita Tomoaki, Mishima Yuichi, Takei Toshiki, Fujiwara Toshimichi, Mutoh Risa, Shinohara Akira, Takui Takeji, Miyata Makoto, Hojo Hironobu, Arata Toshiaki	4. 巻 54
2. 論文標題 Dynamics of the HP1 Hinge Region with DNA Measured by Site-Directed Spin Labeling-EPR Spectroscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Magnetic Resonance	6. 最初と最後の頁 119 ~ 141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00723-022-01519-2	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武居俊樹, 田中秀明, 奥村宣明, 高尾敏文, Luis Moroder, 北條裕信
2. 発表標題 セレノシステイン置換型上皮成長因子の化学合成
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiki Takei, Kohei Muraoka, Toru Kawakami, Toshiaki Arata, Isao Suetake, Hironobu Hojo
2. 発表標題 Analysis of the effect of phosphorylation on HP1 dynamics by ESR spectroscopy
3. 学会等名 日本ペプチド学会 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ying He, Toshiki Takei, Hironobu Hojo
2. 発表標題 Diselenide metathesis and the substitution of sulfur by selenium in small peptides
3. 学会等名 日本ペプチド学会 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akina Yamada, Toshiki Takei, Yukimasa Taniguchi, Kiyotoshi Sekiguchi, Toru Kawakami, Hironobu Hojo
2. 発表標題 Synthesis and biological activity of cyclic RGD peptide with cysteinyl prolyl cysteine sequence
3. 学会等名 日本ペプチド学会 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武居俊樹, 村岡浩平, 川上徹, 荒田敏明, 末武勲, 北條裕信
2. 発表標題 HP1 の運動性にリン酸化が及ぼす影響のESRを用いた分析
3. 学会等名 日本化学会 第104春季年会
4. 発表年 2023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
---------	---------