

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651237

研究課題名(和文) 分子間相互作用に基づくペプチド生成反応を利用した溶液系リガンド探索法の開発

研究課題名(英文) Construction of Detection System for Ligand Screening in Solution Using Peptide Generation based on Molecular Interactions

研究代表者

高橋 剛 (Takahashi, Tsuyoshi)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・准教授

研究者番号：90345380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：溶液系での新規リガンド探索法の開発を目的とし、リガンド-タンパク質間の近接効果を利用したペプチド連結反応と、ペプチド鎖の情報を酵素活性に変換する方法の開発を試みた。本手法が有効に働くかを具体的に調べるために、モデル化合物を利用して「リガンド-標的タンパク質間相互作用に依存したペプチド断片連結反応」と「生成したペプチド鎖を用いた酵素再構成系」の構築を試みた。モデル系としてコイルドコイルペプチドおよび、酵素再構成系としてリボヌクレアーゼSを用いた実験により、本手法が溶液系での分子間相互作用検出に利用できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a screening system in solution for ligands capable of binding to proteins, we have attempted to construct a ligation reaction between peptides bearing a ligand and a protein when the ligand-protein interaction occurs. Moreover, using the generated peptide, enzymatic activity can be generated. Using a model interaction pair, coiled-coil peptides, and ribonuclease S reconstitution, we have successfully demonstrated that the detection system can work well.

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：ペプチド リガンド探索 分子間相互作用

をそれぞれの断片ペプチドに配置した(図2)。全てのペプチドは、Fmoc 固相合成法により合成し、逆相 HPLC により精製した。また、酵素再構成系で必要となる S タンパク質は、改変された S タンパク質アミノ酸配列をコードするプラスミドをウィスコンシン大学 Raines 教授より供与いただいたものを改変して用いた。大腸菌を用い S タンパク質の発現を行い、不溶性画分から回収した。巻き戻しを行った後、逆相 HPLC による精製により目的とする S タンパク質を調製した。

円二色性(CD)スペクトル測定により、設計したアナログペプチドと S タンパク質との相互作用について検討した。ペプチド・タンパク質ともに $10\ \mu\text{M}$ で混合した溶液の CD スペクトル測定から、7 残基目にシステインを配置したペプチド SP-2 は、野生型の S ペプチドと同様のスペクトルを示し、野生型と同程度の複合体形成能を示すことが分かった。一方で、9, 10 残基目を置換したアナログペプチド SP-1 では、若干 CD スペクトルの強度が低下した。これは、2 箇所を変異させたことによる S タンパク質との相互作用能の低下、または、複合体の構造特性の変化をあらわしていることが示唆された。また、複合体の酵素活性(リボヌクレアーゼ活性)の測定を行った。複合体の酵素活性は、野生型、SP-2、SP-1 の順で活性が低下した。特に SP-1 の活性が低かったことから、複合体の構造特性や 10 残基目のアルギニンをシステインに置換したことの影響が考えられた。一方で SP-2 の活性は十分に高かったものの、その断片ペプチドである SP2C と S タンパク質の混合溶液も酵素活性を若干示した。このため、SP-2 およびその断片ペプチドを用いる系は、相互作用検出系に適していないことが分かった。以降の実験は、SP-1 系について行った。

次に、コイルドコイルペプチドを担持したペプチドを用いて、ペプチド間相互作用による近接効果に基づくペプチド断片間の連結反応について検討した。SP-1 のフラグメント SP1N-K3 と SP1C-E3 を中性緩衝液中でインキュベーションし、K3 と E3 の相互作用による NCL 反応について HPLC を用いて評価した。反応は短時間で進行し、約 2 時間のイン

キュベーションで 30~40% 反応が進行した。一方で、コイルドコイルペプチドをもたない SP1N と SP1C-E3 をインキュベーションした場合、NCL 反応がほとんど進行しないことが分かった。この結果から、ペプチド間相互作用による近接効果により NCL 反応が進行していることが示された。

最後に、ペプチド間の連結反応で生成した SP-1-E3 ペプチドと S タンパク質を混合し、酵素活性の測定を行った。NCL 反応液を 500 倍希釈し、S タンパク質と混合して酵素活性を測定した。SP-1-E3 標準サンプルを用いた酵素活性測定から、NCL 反応の進行率を概算した。その結果、NCL 反応の進行と酵素活性が良好な相関を示すことが分かった。このことから、酵素活性を指標にして NCL によるペプチド生成量を見積もることができること、酵素活性を指標として相互作用の有無を評価できることが分かった。

4. 研究成果

以上、本研究では、溶液系で利用可能な新規リガンドスクリーニング法の創製を目標とし、リガンド-タンパク質間の相互作用を簡便かつ高感度に検出する手法の開発を試みた。モデル系としてコイルドコイルペプチドによる相互作用検出系を構築し、ペプチド間相互作用による近接効果に基づくペプチド断片の連結反応が良好に進行することが示された。また、生成したペプチド鎖を用いたリボヌクレアーゼ S 再構成系を利用することで、低濃度の生成ペプチドを酵素活性として読み出すことが分かった。現在、コイルドコイルペプチド以外の相互作用対での本手法の有効性を調べており、良好な結果を得つつある。本研究を発展させることで、化学合成ペプチドライブラリからの有用リガンド分子の迅速スクリーニングが可能になることが期待される。

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 1 件)

- ① Tsuyoshi Takahashi, Akinori Saito, Interaction-Dependent Native Chemical Ligation and Enzyme Reconstitution for Detection of Peptide-Peptide Interactions. *Chem. Lett.*, *accepted* 査読有 (2014)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 高橋剛, 齋藤彰紀, リガンド-タンパク質間相互作用に依存したペプチド生成反応を用いる相互作用検出法の構築, 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 27 日～30 日, 名古屋大学
- ② 齋藤彰紀, 高橋剛, 分子間相互作用を検出する分子ツールとしての利用を目指したリボヌクレアーゼ A 由来 S ペプチドアナログの設計. 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 22 日～25 日, 立命館大学 草津キャンパス
- ③ Akinori Saito, Tsuyoshi Takahashi, Construction of detection system for ligand-protein interactions using ribonuclease S reconstitution and native chemical ligation, 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium and 50th Japanese Peptide Symposium, 6th～8th, November, 2013, Osaka
- ④ Tsuyoshi Takahashi, Construction of detection system for ligand-protein interactions using β -galactosidase complementation and native chemical ligation, 6th～8th, November, 2013, Osaka
- ⑤ 齋藤彰紀, 高橋剛, ネイティブケミカルライゲーションに基づくペプチド生成反応を利用した RNase A 再構成系の構築, 第 7 回バイオ関連合同シンポジウム, 2013 年 9 月 27 日～29 日, 名古屋大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 剛 (TAKAHASHI TSUYOSHI)
群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・准教授
研究者番号 : 90345380

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

