

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710240

研究課題名(和文)天蚕由来生理活性ペプチドの細胞増殖抑制活性の分子基盤の解明と応用

研究課題名(英文)Structural elucidation of molecular basis of cytostatic activity of a novel peptide from a wild silkworm and its application

研究代表者

神谷 昌克(Kamiya, Masakatsu)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30399810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ヤママリンは昆虫の休眠に関与するペプチドである。また、肝がん腫瘍細胞の細胞増殖を抑制する活性をもつことからその応用が期待されるが、分子機構は不明である。本研究では、ヤママリンとフィブリラリンの相互作用の詳細を明らかにすることを目的とし、以下の成果をあげた。

(1) 大腸菌発現系による組み換えフィブリラリンの大量調製および精製の方法を確立した。(2) CD測定は、組み換えフィブリラリンが結晶構造と同じ二次構造を保持していることが明らかにした。(3) ドッキング計算の結果は、ヤママリンは有意にフィブリラリン中央のポケットに結合することが明らかにし、ヤママリンが基質の結合を阻害することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Yamamarin, a novel insect pentapeptide with an amidated C-terminus, has been isolated from diapausing pharate first-instar larvae of the wild silkworm and is thought to be responsible for the regulation of diapause. Recently, this peptide significantly suppresses the proliferation of rat hepatoma (liver cancer) cells. This finding strongly suggests that yamamarin and its derivatives are promising candidates for use as therapeutic agents. However, its action mechanisms remain unknown. In this study, we investigated the interaction between yamamarin and fibrillarlin. The following results were obtained.

(1) We have successfully obtained a recombinant fibrillarlin using E. coli expression system. (2) The CD results indicated that a recombinant fibrillarlin was correctly folded. (3) The docking calculation suggested that yamamarin can bind to a substrate-binding site of fibrillarlin.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：細胞増殖抑制活性 ペプチド 昆虫 NMR

1. 研究開始当初の背景

日本原産の蚕である天蚕から発見されたヤママリンは昆虫の休眠に関与する因子で、5つのアミノ酸残基からなる生理活性ペプチドである。研究開始当初までにヤママリンに関して次のことが明らかになっていた。

- (1) ヤママリンは天蚕以外の昆虫に対しても休眠を誘導する活性をもつこと
 - (2) ほ乳類の肝がん腫瘍細胞の細胞増殖を抑制する活性をもつこと
 - (3) ペプチドへのパルミトイル基の導入が細胞増殖活性を大きく上昇させること
- このようにヤママリンは昆虫休眠活性および哺乳類の細胞増殖抑制活性の2つの生理活性を併せ持つユニークなペプチドであり、これらの特性を生かし、新たな農薬や細胞増殖制御剤の創成を目指して開発も行われた。また、ヤママリンの細胞増殖抑制活性の分子機構の解明に取り組み、構造-機能相関の一端を明らかにした。しかし、細胞増殖抑制活性を有するヤママリンの構造特性は明らかになったが、細胞増殖抑制の詳細な分子機構についての多くは不明であった。これはこの機構に関わる分子群がこれまで特定されていないためであった。ユニークな生理活性をもつヤママリンを有効活用するためには分子機構の解明が必要である。

2. 研究の目的

ヤママリンの細胞増殖抑制活性に関わる分子としてフィブリラリンが同定され、また、ヤママリンと直接、相互作用することが明らかになった。フィブリラリンはリボソームRNA前駆体のプロセッシングに関与する分子であり、細胞増殖にも関与することが報告されている。したがって、ヤママリンの細胞増殖抑制の分子機構を明らかにするために、ヤママリンとフィブリラリンの相互作用の詳細な機構を解明する必要があると考える。本研究では、ヤママリンの細胞増殖抑制活性に直接関与するフィブリラリンに着目し、ヤママリンとフィブリラリン複合体構造の詳細を明らかにすることで、ヤママリンをリード化合物とした細胞増殖制御剤などの高機能な分子の創成につながるための基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

ヤママリンとフィブリラリン複合体構造の詳細を以下の方法で明らかにする。

- (1) 相互作用解析で用いるフィブリラリンの大量調製法を確立する。ヤママリンとの結合が確認されたヒト、ラットおよびショウジョウバエ由来のフィブリラリン遺伝子から大量発現用コンストラクトの作製を行う。作製したコンストラクトによって大腸菌を形質転換し、組み換え体の産生および精製のプロトコルを確立する。NMR解析のためのM9最

小培地での安定同位体標識試料の作製を行う。

- (2) SPRおよびITCを用いたヤママリンとフィブリラリンの相互作用解析を行う。ヤママリンがフィブリラリンに結合することは明らかになっているが、結合定数や結合自由エネルギーなどの物理パラメーターは明らかでない。結合の強さによって、NMRによる相互作用実験の条件や方法も変わるため、SPRおよびITCを用いたヤママリン・フィブリラリンの相互作用解析を行う。相互作用解析によりヤママリン・フィブリラリンの結合および解離の速度定数、結合定数、結合エンタルピー、結合エントロピーおよび結合自由エネルギーを決定し、ヤママリンとフィブリラリンの相互作用様式を明らかにする。

- (3) NMRを用いてヤママリンとフィブリラリンの相互作用解析を行い、複合体状態でのヤママリンの構造およびフィブリラリン表面のヤママリンの結合領域を明らかにする。¹⁵Nラベル化フィブリラリンに対してヤママリンを滴定し、フィブリラリンの¹⁵N-HSQCスペクトルのピークの化学シフトの変化から結合に関わる残基を同定し、すでにX線結晶構造解析によって明らかになっているフィブリラリンの構造(図1)にマッピングすることにより結合部位を明らかにする。同位体フィルタ-NOESYを測定し、ヤママリンとフィブリラリンの分子間の原子間距離の情報を収集する。分子間の距離情報を用いて構造計算を行い、複合体状態でのヤママリンの構造を決定する。以上の解析からヤママリン・フィブリラリン複合体構造を決定する。NMRによる解析結果を基に、ヤママリンおよびフィブリラリンのそれぞれにおいて結合に関与するアミノ酸残基に変異を導入し、上記と同様な相互作用解析を行うことで、複合体形成のより詳細な機構を明らかにする。これまでの実験結果から明らかになった知見を基に、より強く結合するヤママリンのデザインを検討および予備的な実験を行い、本研究後のさらなる研究の発展に向けた基盤を構築する。

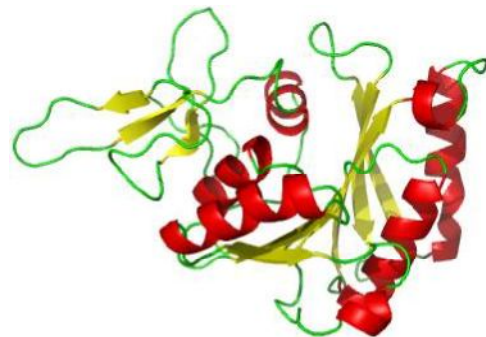


図1 ヒトフィブリラリンの結晶構造 (PDB ID: 2IPX)

4. 研究成果

NMR解析には大量の同位体ラベル化試料が必

要なため、NMR 解析で用いる蛋白質フィブリラリンの大量調製法の検討を行った。高等生物由来のフィブリラリンは、N 末端側にグリシン残基が多く存在しこの部分は特定の構造を取らないことが予想されるため、その部分を削除したコンストラクトを作製した。N 末端領域を除き、精製用の His タグおよびタグ切断のためのプロテアーゼ認識配列を付加した塩基配列を大腸菌発現用ベクターに組み込んだ。大腸菌発現系によるフィブリラリンの発現において発現量が少なく、一部が不溶性顆粒として沈殿してしまった。そのため培養および精製の条件検討を行った。培養温度を下げ、レアコドンカバーするロゼッタ株を用いることで発現量の増加が確認された。また、切断プロテアーゼを変えることで His タグ配列の分解が抑えられることがわかり、最終的にフィブリラリンのほとんどを可溶化状態で発現させることに成功した。また、フィブリラリンの配列中央部分を認識する抗体でウェスタンブロットを行ったところバンドを確認でき、フィブリラリンが発現および精製できていることがわかった (図 2)。

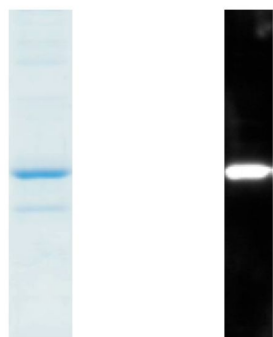


図 2 フィブリラリン試料の SDS-PAGE の CCB 染色 (左) およびウェスタンブロット (右)。

また、CD 測定による二次構造解析の結果は、このフィブリラリンが結晶構造と同じ二次構造を保持していることがわかり、正しくフォールドしたフィブリラリン試料の調製に成功したことを確認した (図 3)。

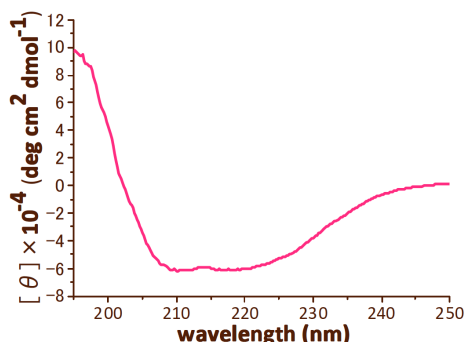


図 3 フィブリラリンの CD スペクトル

このフィブリラリンの発現・精製法を用いて、NMR 解析のための M9 最小培地での試料調製法を検討し、NMR 解析が可能な量のフィブリラリンを得るための条件 (培地の組成、IPTG 誘

導のタイミング、誘導後の培養温度等) を決定することができた。この条件で ^{15}N 安定同位体標識されたフィブリラリンの調製を行い、M9 最小培地 1L あたり約 8 mg と高収量でフィブリラリン試料を得ることに成功した。 ^{15}N 安定同位体標識化フィブリラリンの ^{15}N -HSQC を測定し、スペクトルのピーク同士の分離の程度をモニターしながら、解析可能なスペクトルを得るための試料および測定条件を検討した。測定温度や pH や塩濃度などの NMR 試料条件を検討したが、NMR 解析可能な安定性を持った試料の調製に至らなかった。現在、コンストラクトの設計も含め、さらなる検討を行っている。

実験によるヤママリリンとフィブリラリンの相互作用解析を行うことが困難であったため、コンピュータによる相互作用解析を検討した。上述したように、ヒトフィブリラリンはすでに結晶構造が決定されているため、この結晶構造とヤママリリンおよび類似体との相互作用解析を分子動力学およびドッキングシミュレーションのソフトウェアを用いて行った。ヤママリリンおよびその類似体の構造計算を分子動力学により行い、それぞれのペプチドにおいて形成しやすいコンフォメーションを見いだすことに成功した (図 4)。

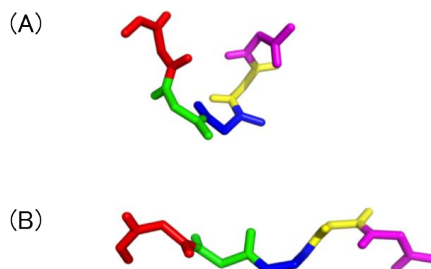


図 4 (A) ヤママリリンおよび (B) 類似体の分子動力学による構造解析

次にこの構造を用いて、フィブリラリンとのドッキングシミュレーションを行った。その結果、特定の構造のヤママリリンは有意にフィブリラリン中央のポケットに結合することが明らかになった。このポケットはメチル基転移酵素であるフィブリラリンの基質結合部位であり、ヤママリリンおよびその類似体はフィブリラリンへの基質の結合を阻害する可能性があることが示唆された (図 5)。

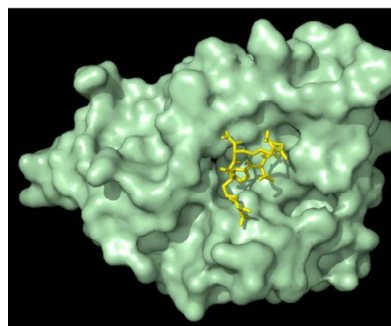


図 5 ドッキング計算によるヤママリリン-フィブリラリン複合体の予測

本研究では、実験による相互作用解析までには至らなかったが、正しくフォールドしたフィブリラリンの調製に成功したことは今後の解析を進める上で重要な成果であり、NMRで解析可能な試料条件を検討し、NMRによる相互作用解析を行うことで、本研究で得られたコンピュータ解析による結果と合わせて、ヤママリン-フィブリラリン複合体の詳細な機構を明らかにすることができると考えている。

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 5 件)

Kushibiki T., Kamiya M., Aizawa T., Kumaki Y., Kikukawa T., Mizuguchi M., Demura M., Kawabata S.-I., and Kawano K., Interaction between tachyplesin I, an antimicrobial peptide derived from horseshoe crab, and lipopolysaccharide., *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有り, 1844, , 2014, 527-534. DOI:10.1016/j.bbapap.2013.12.017

Shibasaki K., Shigemura H., Kikukawa T., Kamiya M., Aizawa T., Kawano K., Kamo N., and Demura M., Role of Thr218 in the Light-Driven Anion Pump Halorhodopsin from *Natronomonas pharaonis*., *Biochemistry*, 査読有り, 52, 2013, 9257-9268. DOI:10.1021/bi401295e

Asakura T., Suzuki Y., Nagano A., Knight D., Kamiya M., and Demura M., Synthesis and characterization of water-soluble silk peptides and recombinant silk protein containing polyalanine, the integrin binding site, and two glutamic acids at each terminal site as a possible candidate for use in bone repair materials., *Biomacromolecules*, 査読有り, 2013, 14, 3731-3741. DOI:10.1021/bm401118m

Tomisawa S., Hojo E., Umetsu Y., Ohki S., Kato Y., Miyazawa M., Mizuguchi M., Kamiya M., Kumaki Y., Kikukawa T., Kawano K., Demura M., and Aizawa T., Overexpression of an antimicrobial peptide derived from *C. elegans* using an aggregation-prone protein coexpression system., *AMB Express*, 査読有り, 2013, 3, 45-52. DOI:10.1186/2191-0855-3-45

Tomisawa S., Abe C., Kamiya M., Kikukawa T., Kawano K., Demura M., and Aizawa T., A new approach to detect

small peptides clearly and sensitively by Western blotting using a vacuum-assisted detection method., *Biophysics*, 査読有り, 2013, 9, 79-83. DOI:10.2142/biophysics.9.79

[学会発表](計 8 件)

阿部千春、中住太一、神谷昌克、菊川峰志、河野敬一、出村誠、相沢智康、Role of C-terminal Region of Cecropin P1 in the Interaction with Bacterial Membranes、第 50 回ペプチド討論会、2013.11.6-8、ホテル阪急エキスポパーク

大塚瞭、菊川峰志、神谷昌克、相沢智康、加茂直樹、出村誠、河野敬一、光駆動型 Cl⁻ポンプハロロドプシンの光反応サイクルにおける荷電性残基の役割、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013.6.12-14、とりぎん文化会館

高橋里佳、神谷昌克、相沢智康、熊木康裕、菊川峰志、出村誠、河野敬一、溶液 NMR 法を用いたジャガイモ由来抗菌ペプチド snakin-1 の立体構造解析、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013.6.12-14、とりぎん文化会館

日下部力、菊川峰志、神谷昌克、相沢智康、河野敬一、井原邦夫、加茂直樹、出村誠、ハロロドプシンの光反応サイクルに現れる膜電位依存性、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013.6.12-14、とりぎん文化会館

田巻初、江川文子、神谷昌克、菊川峰志、相沢智康、河野敬一、藤原敏道、出村誠、固体 NMR によるタンパク質の構造解析に向けた ¹³C-常磁性緩和促進の研究、第 52 回 NMR 討論会、2013.11.11-14、石川県立音楽堂

富澤聡、阿部千春、神谷昌克、菊川峰志、出村誠、河野敬一、相沢智康、吸引式反応システムを用いたウェスタンブロッティング法によるペプチドの高感度検出、日本生物物理学会第 51 回年会、2013.10.28-30、国立京都国際会議場

榎引崇弘、神谷昌克、相沢智康、熊木康裕、菊川峰志、出村誠、川畑俊一郎、河野敬一、カプトガニ由来抗菌ペプチド Tachyplesin I とキチン結合能に関する研究、日本生物物理学会第 51 回年会、2013.10.28-30、国立京都国際会議場

白美花、神谷昌克、中住太一、富澤聡、熊木康裕、菊川峰志、出村誠、河野敬一、相沢智康、Structural analysis of antimicrobial peptide CP1 with LPS by NMR、日本生物物理学会第 51 回年会、2013.10.28-30、国立京都国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 昌克 (KAMIYA, Masakatsu)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
助教
研究者番号：30399810