

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19710182

研究課題名（和文） 生理活性糖脂質分子を特異的に認識する新規合成プローブの創製

研究課題名（英文） Development of Novel Chemical Probes for Bioactive Glycolipids

研究代表者 櫻井 香里（SAKURAI KAORI）

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・特任准教授

研究者番号： 50447512

研究成果の概要：

糖脂質分子は、細胞膜中で局所的に自己集合構造を形成し、細胞間相互作用、細胞内シグナリング等の様々な細胞プロセスに関与するが、その制御機構は未解明である。本研究においては、細胞膜中の糖脂質を特異的に検出する化学プローブの作成に向けて、プローブとして有用な構造特性及び糖脂質との結合特性を有する分子の評価を目的とした。モデル系標的糖脂質分子に対して、基盤構造として利用するペプチドシーケンスの構造特性と結合特性について解析した。この結果、糖脂質に対して結合活性と結合作用によって二次構造変化を示す構造特性を有する新規のペプチドシーケンスが見出された。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,100,000 | 0 | 2,100,000 |
| 2008 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 390,000 | 3,790,000 |

研究分野：複合領域

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：生理活性物質・糖脂質・分子認識

1. 研究開始当初の背景

糖脂質は、細胞膜上にマイクロドメインと称されるナノメートルサイズの局在構造を形成し、細胞間相互作用、細胞内シグナリング、 β -アミロイド形成の促進等の様々な細胞プロセスに関与することが近年示唆されている。このような糖脂質分子の集合は、細胞膜上の特定地点に膜タンパク質を未知の機構で濃縮させ、エンドサイトーシス、シグナ

ル伝達、ウイルスの細胞侵入などの多様な分子過程の反応場としての役割を果たしている可能性が挙げられている。どのようなメカニズムによって、また、どのようなサイズの糖脂質の集合構造の形成が制御されているかは明らかではない。

糖脂質分子の集合体において、最小活性構造単位やタンパク質との作用機構に関する分子レベルの知見を得ることが、細胞機能の

基盤的理解を深める上で最重要課題である。一方で糖脂質集合構造の膜中での挙動の直接観測操作は、分子集合体が過渡的な分子種であるために、効果的な方法が現在確立していない。

マイクロドメインにおける糖脂質の役割の解明には、糖脂質動態の解析ツールが新たに必要である。特に、望みの脂質超分子を特異的に認識し、それらの機能操作や挙動可視化を可能にする新たなプローブの開発されれば有用である。

2. 研究の目的

細胞表面及び細胞内の脂質分子の検出する従来の方法としては、抗体や脂質分子を特異的に認識する微生物由来の毒素などタンパク質試薬がある。しかし、脂質分子の標識に用いられるこれらのタンパク質試薬は、分子サイズが大きいため細胞表面の構造を乱すことや、脂質分子の集合を誘起するため、必ずしも最適な方法ではないことが問題となっている。

そこで本研究においては、分子サイズが比較的小さく、また化学修飾による機能化が可能であるペプチドを基盤構造として選び、プローブとして望ましい構造特性の評価を目的とした。プローブ分子が糖脂質との結合特性を有し、かつその結合複合体が特異的な構造を形成すると、細胞膜中の糖脂質を特異的に検出する際に有効であると考えた。

3. 研究の方法

ペプチド分子は、多くの場合遊離状態では安定二次構造をもたないが、分子認識を通して特定の安定化構造が得られる。この構造特性に着目し、ペプチドの構造変化を、集合構造形成特性をもつ糖脂質分子の検出原理とすることを検討することとした。

目的の化学プローブの基盤構造としては、既知の糖脂質 GM1 結合活性型ペプチド分子群を選び、これら及びレトロインバーソアナ

ログをペプチド合成法によって調達した(図1)。

レトロインバーソアナログは、D-アミノ酸で構成され、親ペプチドに対してシークエンスが反転したペプチドミミックである。レトロインバーソアナログと親ペプチドの構造と比べると、ペプチド側鎖の空間配置が類似しており、しばしば機能も類似する。ここでは、望みの構造特性をもつペプチドシークエンスを得るための簡便な方法として利用した。

モデル系標的分子として、マイクロドメインの代表的な構成要素とされている糖脂質 GM1 をとりあげた。GM1 はアミロイド形成の促進作用や、バクテリアの侵入のレセプターとしての役割が既知である。

ペプチド分子について、GM1 との相互作用により誘起される二次構造変化を CD スペクトル測定により評価した。

GM1 に対するペプチド分子の結合活性を評価するために、GM1 と GM1 の検出試薬である chorela toxin subunit B との相互作用の阻害活性を指標とした ELISA 法を用いた。

- 1:AcNH-VWRL LAPFSNRLLP-CONH₂
(L-peptide)
- 2:AcNH-VWRL LAAAFSNRLLA-CONH₂
(L-peptide)
- 3:AcNH-GWWYKGRARPVSAVACONH₂
(L-peptide)
- 4:AcNH-DFRRLPGAFWQLRQP-CONH₂
(L-peptide)
- 5:AcNH-PLLRNSFPPALLRWV-CONH₂
(D-peptide)
- 6:AcNH-ALLRNSFAAALLRWV-CONH₂
(D-peptide)
- 7:AcNH-AVASVPRARGKYWWGCONH₂
(D-peptide)
- 8:AcNH-PQRLQWFAGPLRRFD-CONH₂
(D-peptide)

図1. 本研究で GM1 結合活性を評価したペプチド分子

4. 研究成果

CD スペクトルを用いたペプチドの二次構造解析の結果より、遊離状態のペプチド分子は 1-8 の全てにおいて特定のコンホメーションを形成していないことが確認された。一方、糖脂質 GM1 投与下においては、一組のペプチド分子及びそのレトロインバーソアナログ(2、6)について特に顕著な CD スペクトルの誘起が認められた(図 2)。この結果より、GM1 との相互作用によって、これらのペプチド分子はランダムコイル状から α -ヘリックス状に二次構造変化を起こすことが示された。これに対して、他の既知の GM1 結合型ペプチドである 1、3、4 及びそのレトロインバーソアナログ(5、7、8)においては、GM1 存在下で顕著なコンホメーション変化は観察されなかった。これらのペプチド分子は標的分子 GM1 依存的に二次構造変化を起こすことから、その相互作用は induced-fit メカニズムを介することが示唆された。

ELISA 法による活性評価においては、別の一組のペプチド レトロインバーソアナログ(1、5)が、糖脂質に対して弱い結合活性を示した。一方では意外なことに、CD 解析から GM1 との相互作用が示唆されたペプチド分子 2 及び 6 においては、結合活性が検出されなかった。また他の GM1 結合型ペプチド 3、4 を含めた四種のペプチド分子についても GM1 結合活性は認められなかった。この結果から、アッセイ方法の差異によって GM1 結合型ペプチド(1、4)における見かけの活性が異なることが示唆された。

本研究では迅速に多数のペプチド分子について活性評価を行うため、ハイスループットアッセイが可能である ELISA 法を採用した。一方 ELISA 法では GM1 は固相にランダムに吸着されており、密度などの分子の提示状態の制御が困難である。分子状態を制御し、細胞膜中での糖脂質の集合状態のモデルとなる系を作成することが今後の課題である。

GM1 に対して、induced-fit 機構により相互作用することが示唆されたペプチドシーケンスについては、蛍光ラベルを導入し、糖脂質存在下で誘起される構造変化を検出シグナルとカップルさせ、リガンド依存型検出プローブとしての応用を検討している。

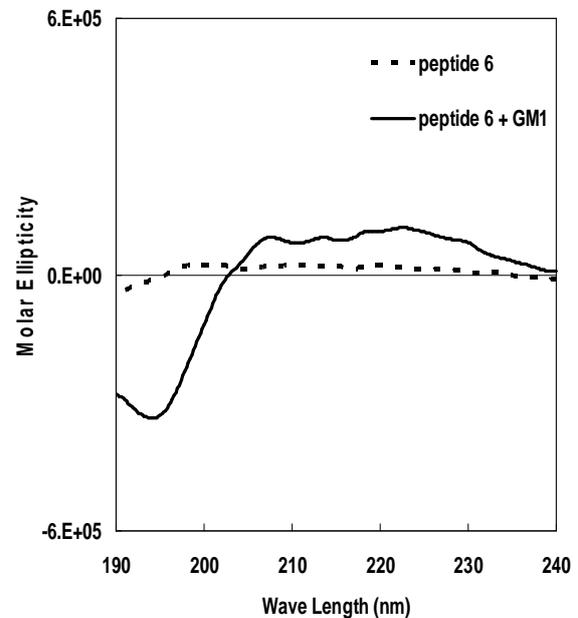
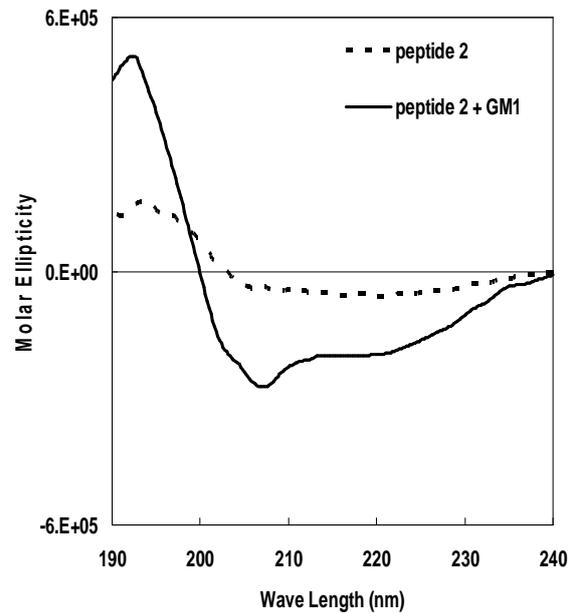


図 2. CD 測定によるペプチドシーケンス 2 及び 6 の二次構造解析。(—)PBS 溶液中ペプチド(25 μ M)の CD スペクトル。(---)100 μ M GM1 存在下でのペプチド(25 μ M)の CD スペクトル。

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)

査読有

Kaori Sakurai, David R. Liu

“DNA テンプレート有機合成法(DTS): 生命原理に学ぶ機能性分子創製・探索への新規アプローチ” 66,2008,590-604.

有機合成化学協会誌

〔学会発表〕(計 1件)

Kaori Sakurai,

“Development of Metabolically Stable α -Helical Peptide Inhibitors for Targeting p53-MDM2 Interface”

The Mona Symposium, Natural Products and Medicinal Chemistry, the 22nd Meeting, Mona, Jamaica

Janurary, 2008.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 香里 (SAKURAI KAORI)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院

特任准教授

研究者番号:50447512

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし