

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510265

研究課題名(和文)抗硫酸化モノクローナル抗体作成による硫酸化プロテオーム解析

研究課題名(英文)Preparation of monoclonal antibody against sulfated protein and its application to sulfo-proteomics studies

研究代表者

北川 幸己 (Kitagawa, Kouki)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：60093853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫化学的ツールとして抗硫酸化モノクローナル抗体の取得を目指したが、マウス免疫法では特異的な抗体は得られず、ファージディスプレイ法に手法を変えて研究を継続している。

タンパク質硫酸化に関与する2種の酵素(TPST-1、-2)の大腸菌での発現系を確立し、酵素活性をもつタンパクを取得した。ADYAE配列を基準とした合成ペプチドを用いて基質の構造情報を検討し、硫酸化に必要な最短基質としてXDY(X:任意のアミノ酸)配列モチーフを見出した。

長鎖の硫酸化ペプチドに対応できる合成法として、硫酸化チロシンを含むペプチドチオエステルの調製法を開発し、複数個の硫酸化チロシンを含むペプチドの化学合成に適用した。

研究成果の概要(英文)：We have aimed to obtain the monoclonal antibody against sulfated tyrosine as immuno-chemical tool applicable to the sulfo-proteomics studies; however specific antibody against sulfated proteins could not be raised by the conventional immunization protocol in mice due to the inherent instability of sulfate. Thus we changed the approach to the phage-display method and now fundamental studies are in progress.

We have established the expression system in E. coli for two enzymes (TPST-1 and -2) responsible for tyrosine sulfation in protein. Using obtained proteins having enzyme activity and synthetic peptides based on ADYAE sequence, we found out the XDY (X: various amino acids) motif as a minimal peptide substrate for sulfation. We have developed a preparation procedure for peptide thioester containing tyrosine sulfate residue, and using the Ag⁺-mediated thioester segment condensation, we obtained the long-chain peptides containing multiple tyrosine sulfate residues in high yields.

研究分野：ペプチド・タンパク質化学

キーワード：硫酸化タンパク質 モノクローナル抗体 ファージディスプレイ チロシン硫酸化酵素 基質配列モチーフ ペプチド合成 プロテオーム解析

1. 研究開始当初の背景

近年、炎症時における白血球のローリング現象や、HIV が宿主細胞に侵入する際の gp120 と細胞表面上のケモカイン受容体との結合などの生体反応にタンパク質中の硫酸化チロシン残基が関与していることが明らかにされ、タンパク質硫酸化はタンパク質-タンパク質相互作用に関わる重要な翻訳後修飾であることが改めて認識されている。一方ヒトゲノムのコンピューター解析によると分泌タンパク質の約 30% がチロシン硫酸化を受けていると予測されているが、実験的に硫酸化が確認されているタンパク質は、植物や細菌由来のものを含めても約 70 種に過ぎない。このギャップは硫酸化チロシンのもつ生来の不安定さのために、シーケンシングにより直接的に硫酸化チロシン残基を同定することができないこと、硫酸化タンパク質を特異的に検出するモノクローナル抗体等の免疫化学的な検出法が欠如していることによるものとされている。さらにプロテオーム解析で汎用される質量分析においても、硫酸化の修飾を受けたチロシンの検出及びタンパク質中の硫酸化部位の同定は困難である。加えて、遺伝子操作による硫酸化タンパク質の発現系が確立されていないこともタンパク質硫酸化の研究を展開する上で大きな障壁となっている。

冒頭に述べた幾つかの生体反応に関与する硫酸化タンパク質以外に、ガストリン、コレシストキニンといった硫酸化チロシンを含むペプチドホルモンが古くから知られているが、生理活性や機能に硫酸化チロシンが関与していることが明確になっている例は極めて少ない。多くの場合、タンパク質中の硫酸化の意義・機能は漠然としたままであるのが現状である。

著者は、化学合成で得られる硫酸化ペプチドは硫酸化修飾を受けたペプチド・タンパク質の機能評価や、それらが関与する生体分子間での相互作用を解析する上で重要なツールとなると考え、幾つかの硫酸化チロシン含有ペプチドの簡便な合成法を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、著者が蓄積してきた硫酸化ペプチドに関する化学合成のバックグラウンドを基盤に、硫酸化タンパク質の検出・同定に用いる免疫化学的な研究用ツールの開発を行い、硫酸化プロテオーム解析に展開することを目的とした。

同時にタンパク質硫酸化に関与する酵素 (TPST-1 及び TPST-2) の基質認識機構について詳細な解析を進めるとともに、硫酸化ペプチドの化学合成に関しても新しい方法論の開拓を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 硫酸化タンパク質に対するモノクロー

ナル抗体の作成

抗体作成に必要な抗原として、硫酸化チロシン分子のほか、硫酸化チロシン残基を含むオリゴペプチドを化学合成する。

合成硫酸化ペプチドを抗原として、マウス免疫法により抗体を得る。なお、マウス免疫法で硫酸化チロシンに特異的な抗体が得られない場合は、ヒト抗体ファージディスプレイ法を検討する。

マウス免疫法あるいはヒト抗体ファージディスプレイ法で得られる抗体をスクリーニングし、特異的な抗硫酸化ペプチド/タンパク質抗体を選抜する。

得られた特異的な抗体を用いて硫酸化タンパク質のスクリーニングを行う。新規の硫酸化タンパク質が得られた場合は、MALDI-TOFMS を駆使して硫酸化を受けるチロシン残基を同定する。

(2) チロシン硫酸化酵素の発現系の確立と合成ペプチドを用いたチロシン硫酸化部位の配列モチーフの解析

Tyrosylprotein sulfotransferase (TPST) はタンパク質中のチロシン硫酸化に関与する酵素であり、2 種のアイソザイム (TPST-1 及び TPST-2) が存在する。本研究では、大腸菌を宿主として用いた発現系を確立し、酵素活性を有する 2 種の recombinant タンパクを取得する。

硫酸化が起こることが知られている ADYAE 配列を基にした各種のアミノ酸置換及び欠損ペプチドを化学合成する。

各種の合成ペプチドを用いて、硫酸基ドナーである PAPS の存在下、TPST-1 あるいは TPST-2 を加えて硫酸化の進行を HPLC で追跡し、硫酸化に必要なペプチド構造に関して情報を収集する。

(3) 硫酸化ペプチドの化学合成に関する研究

硫酸化チロシンクラスターが存在する P-selectin glyco sulfopeptide ligand 1 (PSGL-1) の N 末端部 PSGL-1(43-55) の配列を基に、ペプチド鎖構築後にチオエステルへ導く手法を用いて、複数個の硫酸化チロシン残基を含むペプチドチオエステルを調製する。

1 残基の硫酸化チロシンを含むチオエステルセグメント PSGL-1(43-55) と PSGL-1(56-74) をモデルとしてセグメント縮合を行い、反応条件を設定する。

で設定した反応条件を用いて、2~3 残基の硫酸化チロシンを含むチオエステルセグメント PSGL-1(43-55) と PSGL-1(56-74) のセグメント縮合を行う。

4. 研究成果

以下の内容のテーマで本研究課題を実施した。

(1) 硫酸化タンパク質に対するモノクロー

ナル抗体の作成

抗体産生に必要な抗原として、硫酸化チロシン分子のほか、N末端にキャリアタンパクとの結合に用いる Cys を付した種々の硫酸化チロシン含有ペプチドの合成を行った。また、抗体をスクリーニングする際に、非硫酸化ペプチド抗体や配列に特異的な抗体を排除する必要があることから、同一配列を持つ非硫酸化体や D-アミノ酸で配列を構築したコントロール用ペプチドの合成も併せて行った。

で調製した硫酸化チロシン含有ペプチドを抗原とする抗体作成を業者に委託したが、得られた抗体は硫酸化ペプチドとともに非硫酸化ペプチドにも反応するものであった。これは硫酸エステルが化学的に不安定なことから、抗体作成過程での欠落が避けられないためと考えられる。このことからマウス免疫法では特異的な抗体が作成できないと判断し、ヒト抗体ファージディスプレイ法を検討することに方針を変更した。

ファージディスプレイ法において、アビジンビーズからのファージの選択と回収に用いるため、ピオチン化硫酸化ペプチドの合成を行った。

当初予定していたマウス免疫法でのモノクローナル抗体の取得ができなかったことから、ファージディスプレイ法で用いるペプチド性試薬の調製で研究期間は終了した。今後、ファージライブラリーとして scFv Tomlinson IJ Library を用いて研究を進める予定である。今後の研究展開として、アビジン-ピオチンシステムで固定化した抗原ペプチドに scFv ファージ抗体ライブラリーを反応させ、パニングを繰り返して抗原に結合性のあるファージを選択していく。得られた scFv フラグメント部位に相当する DNA を PCR で増幅後、抗体化発現ベクターに導入し、培養細胞に形質導入/発現させることで、抗体を得る予定である。

(2) チロシン硫酸化酵素の発現系の確立と合成ペプチドを用いたチロシン硫酸化部位の配列モチーフの解析

TPST-1 の Lumenal 領域 43-370 位に相当する遺伝子を含むプラスミドを大腸菌にトランスフォームした後、発現及び精製を行って酵素活性を持つ His-TPST-1 (43-370) を作製した。TPST-2 に関しても同様な遺伝子操作により、酵素活性を持つ His-TPST-2 (43-377) を取得した。

Tyr 残基を中心に、N末端 (-1, -2 位) に 2 残基及び C 末端 (+1, +2 位) に 2 残基をもつ ADYAE 配列を基準として、アミノ酸を欠損したものや他のアミノ酸で置換した 18 種類のペプチドを化学合成した。こうした各種のペプチドを用いて、硫酸基ドナーである PAPS の存在下、TPST-1 あ

るいは TPST-2 を加えて硫酸化の進行を HPLC で追跡した。一連の酵素反応の結果、硫酸化に必要なペプチド構造に関して以下のような知見を得た。

- TPSTs の基質認識には、少なくとも N 末端側に 2 残基のアミノ酸が必要であり、-1 位の Asp が必須であること。
- C 末端側のアミノ酸を欠損させたペプチドでも硫酸化が進行したことから、C 末端側のアミノ酸残基は基質認識に必ずしも必要でない可能性があること。
- C 末端側 +2 に酸性アミノ酸が存在すると硫酸化の進行が速くなり、特に Asp の場合に顕著であること。
- ADYAE 配列を基準にしたアナログに対しては、TPST-1 よりも TPST-2 の方が基質特異性は高いと判断されたこと。

これらの知見から、2 種の TPSTs の間で硫酸化が進行する基質ペプチドや配列の特徴に違いは見られなかったものの、最短基質ペプチドの配列として、-1 位に Asp を含む XDY (X: 任意のアミノ酸) モチーフを見出した。

(3) 硫酸化ペプチドの化学合成に関する研究

著者らは、簡便な硫酸化ペプチドの固相合成法とチオエステルセグメント縮合法を組み合わせた手法でコレシストキニン-58 の全化学合成を達成している。しかし、この手法をさらに一般的なものとして展開するには、硫酸化チロシンを含むペプチドチオエステルを効率的に調製する方法を確立する必要があった。そこで炎症時における白血球のローリングに参与する P-selectin glycosulfopeptide ligand 1 (PSGL-1) の N 末端部に存在する硫酸化チロシンクラスターをモデルとして合成研究を行い、以下の成果を得た。

硫酸化チロシンクラスターが存在する PSGL-1(43-55)の配列を基に、ペプチド鎖構築後にチオエステルへ導く手法を用いて、複数個の硫酸化チロシン残基を含むペプチドチオエステルを調製できることを示した。

1 残基の硫酸化チロシンを含むチオエステルセグメント PSGL-1(43-55)と PSGL-1(56-74)をモデルとしてセグメント縮合を行ったところ、1:1 のモル比ではチオエステルの加水分解物が相当量生成し、目的とする縮合生成物の収率を大きく低下させることが分かった。縮合反応の進行が緩やかなため、反応系中に存在する極微量の水分によって加水分解されると考えられた。そこで、PSGL-1(56-74)のモル比を 3~5 倍量に増やして速やかに縮合を進行させることを試みたところ、加水分解物の生成は顕著に抑制でき、縮合生成物の収率は 70~90%にまで改善した。

PSGL-1(43-55) disulfate、PSGL-1(43-55)

trisulfate との縮合においても、PSGL-1 (56-74)をモル比で5倍量用いることで、目的とする縮合生成物を良好な収率で得ることができた。

調製に困難を伴う硫酸化チオエステルセグメントに対し、大量調製が容易なセグメントを過剰量用いることは合理的なものであり、N末端部に硫酸化チロシン残基を含む長鎖の硫酸化ペプチドの化学合成に対応できる手法として確立することができた。

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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

頓所さやか、TPST によるチロシン硫酸化に必要な最短基質ペプチド鎖長の検討、第87回日本生化学会大会、2014年10月15日～10月18日、京都

頓所さやか、TPST によるチロシン硫酸化に最適な基質ペプチド配列の探索、日本薬学会第135年会、2015年3月25日～3月28日、神戸

市川友莉恵、チオエステル縮合法による複数個の硫酸化チロシン酸基を含むペプチドの合成、日本薬学会第135年会、2015年3月25日～3月28日、神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 幸己 (Kitagawa Kouki)

新潟薬科大学薬学部 教授

研究者番号：60093853

(2)研究分担者

浅田 真一 (Asada Shinichi)

新潟薬科大学薬学部 助教

研究者番号：50424883