

平成21年 5月22日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2003～2008

課題番号：15083204

研究課題名（和文）ライゲーションケミストリーの展開に基づく膜蛋白質合成法の開発

研究課題名（英文）Development of a method for membrane protein synthesis based on ligation chemistry

研究代表者

相本 三郎 (AIMOTO SABURO)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：80029967

研究成果の概要：

ライゲーションケミストリーの開発を中心課題とし、膜蛋白質の合成法に関する総合的研究を行った。また、本研究の過程で得られた知見を元に、膜貫通ドメインを有するペプチドや蛋白質の合成を行い、FGFR3、ErbB2/Neu などの受容体型チロシンキナーゼや、アミロイド前駆体蛋白質の膜貫通部位の構造解析を行った。また、四回膜貫通型蛋白質の化学合成に世界で始めて成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2003年度	8,000,000	0	8,000,000
2004年度	16,000,000	0	16,000,000
2005年度	15,500,000	0	15,500,000
2006年度	15,500,000	0	15,500,000
2007年度	16,000,000	0	16,000,000
2008年度	16,000,000	0	16,000,000
総計	87,000,000	0	87,000,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物物理学

キーワード：膜蛋白質、化学合成、ライゲーション法、補助基、ペプチドチオエステル、溶解性

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の研究の多くは生物学的手法で調製された蛋白質を用いて行われていたが、膜蛋白質の調製は生物学的手法を用いても困難を極め、そのため、膜蛋白質が重要な機能を果たしているにもかかわらず、その研究は困難を極めていた。一方、化学的方法による蛋白質の調製法は、近年著しく進歩し、分子量1万を超す可溶性蛋白質の合成がルーチン化さ

れようとしていた。このようなことから、膜蛋白質の合成へのチャレンジが始まり、申請者らは世界に先駆けて2回膜貫通型蛋白質の全合成に成功していた。また、申請者らは多数の安定同位体標識した膜貫通ドメインを合成し、共同研究者と固体NMRや偏光IRを用いて膜内における膜貫通ドメインの立体構造や相互作用の構造化学的解析を行っていた。その結果、原子座標レベルで膜貫通ドメイン

間の相互作用の詳細を解明することに成功していた。有機化学と構造生物学分野の研究者の協力は情報伝達におけるソフトな相互作用メカニズムの解明に大きく貢献するものと期待されていた。

2. 研究の目的

膜蛋白質同士あるいは膜蛋白質とリガンドとの相互作用の実体を固体および溶液 NMR、X線結晶構造解析などにより解析することを念頭に置き、これらの研究に必要な高純度の膜蛋白質を合成する一般的な方法を開発し、これらの研究を推進するために必要な膜貫通ドメインを有する蛋白質の合成を実施することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

構造研究や相互作用の解析に最適な安定同位体標識膜蛋白質を調製するため、化学合成したペプチドのみならず、生物学的に発現させたペプチド断片も蛋白質合成用のブロックとして用いることができるハイブリッド型合成法を開発する。すなわち、膜蛋白質の物性を考慮し、側鎖の官能基を保護しない状態でペプチド主鎖同士を縮合できる化学選択的縮合反応の開発を基軸として、生物学的に調製された蛋白質断片の合成ブロックへの変換反応の開発、膜蛋白質合成において最大の難関となっている合成ブロックの精製法の開発を有機化学的手法に立脚して実施する。

4. 研究成果

(1) 新規ライゲーション法ならびにペプチドチオエステル合成法の開発

① 拡張型ライゲーション反应用光反応性補助基の開発：図 1 に示す、ライゲーション反応後、光照射によりペプチド鎖から除去される 2-mercapto-1-(2-nitrophenyl)ethyl 基 **1**、およびこの補助基を骨格としてもち、1,2-アミノエタンチオールをチアゾリジン環として保護した新規の補助基 **2** を開発した。後者の補助基は、拡張型ライゲーション法によりペプチド鎖を順次伸張させることができるといった優れた性質をもっている。

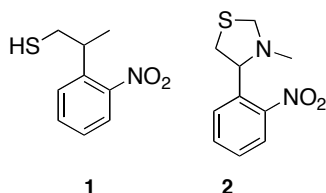
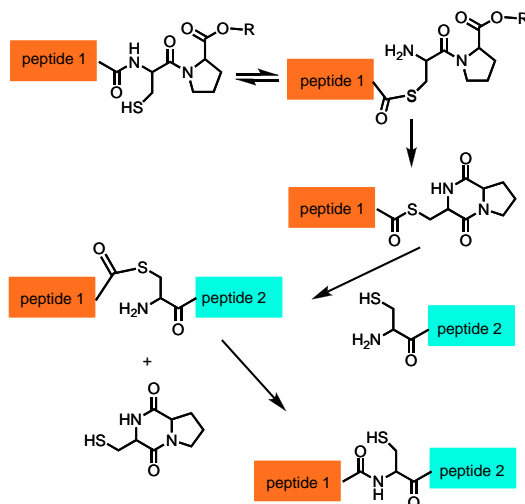


図 1 光照射により除去できる補助

② *N-S* アシル基転位反応を利用したライゲーション法の開発：Cys-Pro ester (CPE) 基を

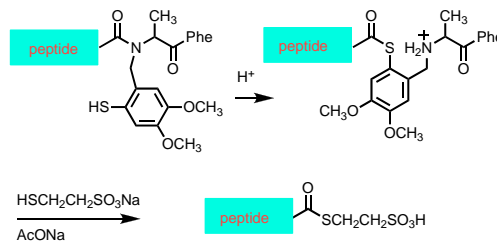
C 末端に有するペプチドを合成ブロックとするペプチド合成法を開発した。本合成ブロックは、*N-S* アシル基転位反応とそれに引き続くジケトピペラジン形成反応を経て、反応溶液内で自発的に安定なペプチドチオエステルを生成し、N 末端にシステイン残基を有するペプチドと反応し、長鎖ペプチドを与える。(式 1) 本反応の詳細な解析を行うとともに



式 1 ペプチド CPE を用いたペプチド鎖の縮合

縮合反応の至適条件を確立した。

③ *N-S* アシル基転位反応を利用したペプチドチオエステル調製法の開発：拡張型ライゲーション反應用の補助基として開発した 4,5-ジメトキシ-2-メルカプトベンジル基が、弱酸性条件下で、これが結合したペプチド結合を *N-S* アシル基転位反応によりラセミ化を伴うことなくチオエステル結合へと変換することを見出した。変換反応を詳細に解析し、リン酸化アミノ酸やトリプトファン側鎖、Asp-Pro 結合を分解させることなく、効率よくペプチドチオエステルを得る条件を確立した。(式 2)



式 2 *N-S* アシル基転位反応を利用したペプチドチオエステル調製法

(2) 膜蛋白質精製法の開発

膜蛋白質や膜貫通部位をもつペプチドは、

強い会合性や分離用担体への非特異的吸着のため、逆相 HPLC での精製は極めて困難である。これは膜蛋白質関連ペプチドの合成上極めて深刻な問題であった。そこで、新規なペプチド精製法の開発に取り組んだ。その結果、以下の精製用タグ **1** あるいは **2** をペプチドのN-末端に導入することにより、逆相 HPLC での精製が困難であった膜蛋白質を精製することができるようになった。

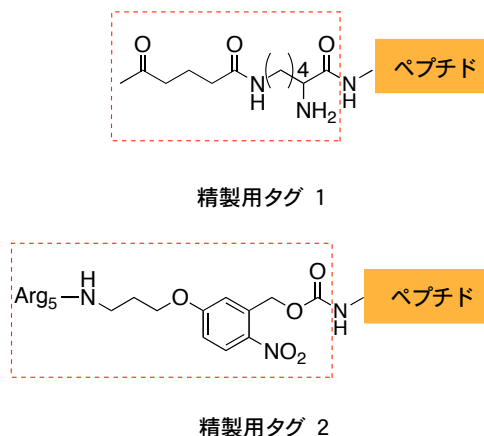


図2 開発した精製用タグ

(3) 膜蛋白質の合成化学的研究

本研究を通して得られた知見を基に、一回の膜貫通型ペプチド、二回膜貫通型蛋白質の合成を実施した。さらに、4回膜貫通型蛋白質である電位依存性プロトンチャネル (VSOP/Hv) のイオンチャネル機能発現部位である VSOP (78-222) の化学合成に取り組み、チオエステル法を用いて合成に成功した。化学合成品による膜蛋白質の構造形成、イオン透過機構の解明の研究基盤ができた。(図3)

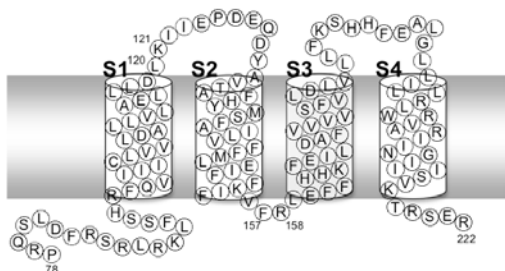


図3 チオエステル法により合成した電位依存性プロトンチャネル(78-222)

(4) 合成膜蛋白質を用いた構造生物学的研究

① 受容体型チロシンキナーゼ活性化メカニズムの解明：チロシンキナーゼの活性化メカニズムの解明を目的として、FGFR3 ならびに Neu の膜貫通部位の構造ならびに膜近傍部位の膜との相互作用の解析を合成ペプチドを用いて行った。その結果、FGFR3 WT と

FGFR3 (G380R) では、膜貫通部位のヘリックスダイマーの接触面および膜近傍部位が大きく変化していることを明らかにした。

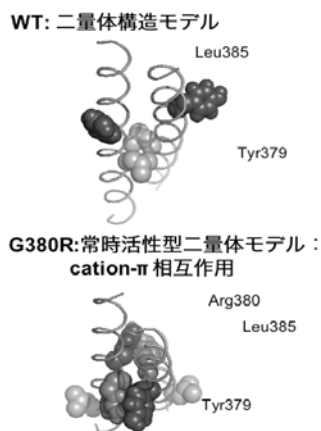


図3 FGFR3 野生型と FGFR3 (G380R) の二量体会合面の解析

② アミロイド前駆体蛋白質のプロセッシング機構の解明：安定同位体標識した一連のアミロイド前駆体蛋白質の膜貫通・膜近傍ドメインを合成し、それを用いて、アミロイド前駆体蛋白質がセクレターゼによって順次加水分解されていく機構を解明することに成功した。(図4)

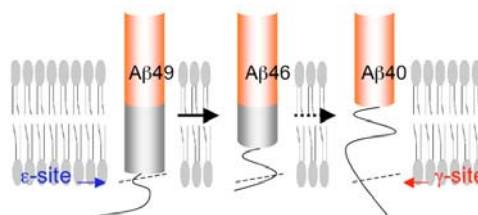


図4 アミロイド前駆体蛋白質の膜貫通ドメインがセクレターゼによって順次加水分解を受けると、ヘリックス構造がほどけさらに加水分解を受ける

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 32 件)

- ① T. Kawakami, S. Aimoto, The use of a cysteinyl prolyl ester (CPE) autoactivating unit in peptide ligation reactions. *Tetrahedron*, 65, 3871-3877 (2009) 査読 有
- ② T. Hara, A. Tainosho, K. Nakamura, T. Sato, T. Kawakami, S. Aimoto, Peptide purification by affinity chromatography based on α -ketoacyl group chemistry, *J. Peptide Sci.*, 15, 369-376 (2009) 査読 有
- ③ T. Sato, T.-C. Tang, G. Reubins, J.Z. Fei, T. Fujimoto, P. Kienlen-Campard, S. N. Constantinescu, J.-N. Octave, S. Aimoto, S. O.

Smith, Structure of the transmembrane dimer of the amyloid precursor protein: Implications for proteolysis by g-secretase, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106, 1421-1426 (2009) 査読 有

④ T. Kawakami, S. Aimoto, Peptide Ligation Using the Cysteinyl Prolyl Ester (CPE) Activating Unit at the Carboxy Terminus, *Chem. Lett.*, 36, 76-77 (2007) 査読 有

⑤ K. Nakamura, M. Sumida, T. Kawakami, T. Vorherr, S. Aimoto, Generation of an S-Peptide via an N-S Acyl Shift Reaction in TFA Solution. *Bull Chem Soc. Jpn.*, 79, 1773-1780 (2006) 査読 有

⑥ T. Sato, P. Kienlen-Campard, M. Ahmed, W. Liu, H. Li, J. I. Elliott, S. Aimoto, S. N. Constantinescu, J. N. Octave, S. O. Smith, Inhibitors of amyloid toxicity based on beta-sheet packing of A β 40 and A β 42. *Biochemistry*, 45, 5503-16 (2006) 査読 有

⑦ T. Kawakami, M. Sumida, K. Nakamura, T. Vorherr, S. Aimoto, Peptide Thioester Preparation Based on an N-S Acyl Shift Reaction Mediated by a Thiol Ligation Auxiliary. *Tetrahedron Lett.*, 46, 8805-8807 (2005) 査読 有

⑧ T. Sato, Y. Saito, S. Aimoto, Synthesis of the C-terminal Region of Opioid Receptor Like 1 in an SDS Micelle by the Native Chemical Ligation: Effect of Thiol Additive and SDS Concentration on Ligation Efficiency, *J. Peptide Sci.* 11: 410-416 (2005) 査読 有

⑨ T. Kawakami, M. Tsuchiya, K. Nakamura, S. Aimoto, Sequential Peptide Chemical Ligation by the Thioester Method and Extended Chemical Ligation. *Tetrahedron Lett.*, 46, 5533-5536 (2005) 査読 有

⑩ T. Sato, Y. Saito, S. Aimoto, Synthesis of the C-terminal Region of Opioid Receptor Like 1 in an SDS Micelle by the Native Chemical Ligation: Effect of Thiol Additive and SDS Concentration on Ligation Efficiency, *J. Peptide Sci.* 11, 410-416 (2005) 査読 有

[学会発表] (計 39 件)

① 赤井優一、ネイティブケミカルライゲーション法とチオエステル法の併用を可能にするチオール保護基としてのメチルチオ基の利用、第45回ペプチド討論会、平成20年10月30日、東京

② 中村健一郎、電位依存性プロトンチャネル (VSOP) (121-222)の合成、第45回ペプチド討論会、平成20年10月30日、東京

③ 田結莊明、アミノオキシ基とイソチオシアネート基の選択的化学反应とそれに続くエドマン分解を利用したペプチドの精製、第45回ペプチド討論会、平成20年10月29日、東京

④ 原 利明、 α -ケトアシル基の形成と切断を鍵反応とするペプチド精製法の開発、日本化学会第88春季年会、平成20年3月27日、東京

⑤ Toru Kawakami, Peptide thioester preparation and peptide ligation using cysteinyl prolyl ester (CPE) autoactivating unit, 30th European Peptide Symposium, 平成20年9月1日、ヘルシンキ

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: ペプチドエステルを用いたライゲーション法、およびチオエステル化合物の製造方法

発明者: 川上徹、相本三郎

権利者: 発明者、大阪大学、大阪産業振興機構

種類: 特許願

番号: 特願 2005-3000947

出願年月日: 2005年10月

国内外の別: 国内

名称: ペプチドエステル試薬、およびそのライゲーションまたチオエステル化合物の製造のための使用

発明者: 相本三郎、川上徹

権利者: 発明者、大阪大学、大阪産業振興機構

種類: 特許願

番号: PCT/JP2006/320392

出願年月日: 2006年10月

国内外の別: PTC

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/organic/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相本 三郎 (AIMOTO SABURO)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号: 80029967

(2) 研究分担者

川上 徹 (KAWAKAMI TORU)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号: 70273711

(3) 研究分担者

佐藤 毅 (SATO TAKESHI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号: 90403013