

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05113

研究課題名(和文) プロテアーゼの逆反応を利用したタンパク質逆スプライシング反応法の確立

研究課題名(英文) Development of reverse-protein splicing method using proteases

研究代表者

片山 秀和 (Katayama, Hidekazu)

東海大学・工学部・准教授

研究者番号：30580857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、プロテアーゼの逆反応とペプチド縮合反応を組み合わせることによって、タンパク質スプライシングの逆反応(タンパク質逆スプライシング反応、RPS反応)を化学的に行うことができるかを検証した。その結果、リシルエンドペプチダーゼを用いた場合、高濃度のエチレングリコールを含む溶媒中で、低収率ながらRPS反応が進行することが見出された。また、非タンパク質性アミノ酸を含むペプチドも、挿入配列として認識されることが明らかとなったことから、RPS反応がポリペプチドの部位特異的な化学修飾法の一つになりうる可能性が示されたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有機化学的にRPS反応を行った例は、これまでに報告されていないことから、世界初の実施例であると考えられる。この方法を利用すれば、将来的に組換えタンパク質の部位特異的なアミノ酸配列変換などに利用できるものと期待される。また、非タンパク質性の化学構造も挿入可能であったことから、蛍光団の挿入などの部位特異的な化学修飾にも応用可能であり、新たなタンパク質化学修飾法として生化学分野、ケミカルバイオロジー分野への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Protein splicing is found in nature, although its reverse reaction has not yet been developed. In this project, we tried to develop reverse-protein splicing (RPS) reaction using a protease as catalyst. When using lysyl endopeptidase (LEP) as the catalyst, RPS reaction proceeded in ethylene glycol aqueous solution, but the yield of desired product was low. The peptide with non-proteinogenic amino acid was also acted as an insert in this reaction. This is the first case for one-pot chemical RPS reaction, and it might be useful for the regioselective chemical modification of polypeptides.

研究分野：化学

キーワード：タンパク質逆スプライシング プロテアーゼ ネイティブケミカルライゲーシオン

1. 研究開始当初の背景

遺伝子が転写されて mRNA となると、タンパク質のアミノ酸配列情報をもたないイントロン部位が除去されてエキソン部分のみがつながる「スプライシング」が起きる。タンパク質においても、ある特定の配列（インテイン）を有する時に、インテインの N 末端側と C 末端側に結合した配列がつながる「タンパク質スプライシング」が起きることが知られている。

タンパク質スプライシングの逆反応を有機化学的に起こすことができれば、種々のタンパク質、特に非タンパク質性アミノ酸を有する構造を有するタンパク質の調製に非常に有用であると期待されるが、そのような反応は報告が無かった。

2. 研究目的

本研究課題では、タンパク質スプライシングの逆反応を一つの反応容器内で完結させる新たな手法を開発することを最終的な目標としている。この反応には、タンパク質の切断とタンパク質の縮合という2つの相反する反応を行う必要がある。切断にはタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）が有用であり、一方でプロテアーゼの逆反応によるタンパク質の結合反応（逆プロテオリシス反応）も報告されていることから、プロテアーゼを触媒として、ネイティブケミカルライゲーション(NCL)を組み合わせた図 1 に示す反応機構を考案した。本研究では、この反応が実際に起きることを示すとともに、種々のタンパク質の調製への有用性を検証することを目的とした。

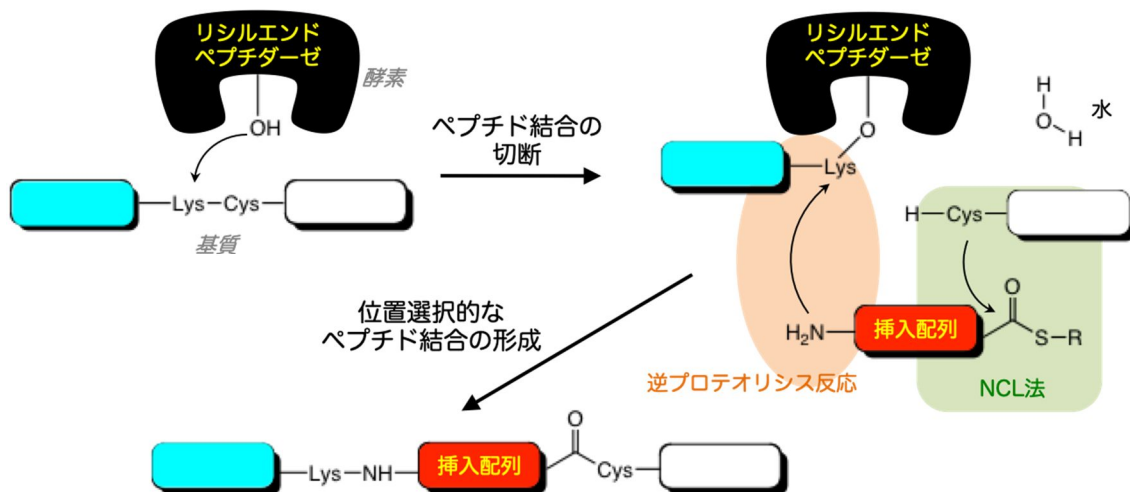


図 1. プロテアーゼによるタンパク質逆スプライシング反応の概略。

3. 研究の方法

(1) プロテアーゼによる反応と NCL の反応条件の検討

プロテアーゼとして、リシルエンドペプチダーゼ(LEP)を用いた。リジンを含む短鎖ペプチドを基質、グリシルグリシンをアクセプターとして、基質ペプチドがグリシルグリシンと連結されるかどうかを指標として、種々の溶媒で反応を試みた。溶媒としては、種々のイオン液体と MOPS 緩衝液(pH 7.4)の混合液、ならびにエチレングリコールと MOPS 緩衝液(pH 7.4)の混合液を用いた。反応の進行は、逆相 HPLC によって確認した。

PRS が進行する溶媒を確認した後、同じ溶媒中で NCL 反応が進行するかどうかを確認する目的で、短鎖ペプチド同士を NCL 反応で縮合を試みた。その際、反応促進剤として 4-メルカプトフェニル酢酸(MPAA)を加えた緩衝液を用いた。

(2) 短鎖ペプチドをモデルとしたタンパク質逆スプライシング反応の検討

(1)の検討をもとに、ヒト B-タイプナトリウム利尿ペプチド(BNP)の部分配列(1-15)をモデル配列として PRS 反応を行なった。基質となる(1-3)-(10-15)ペプチド、および挿入配列となる(4-9)ペプチドをそれぞれペプチド固相合成法により調製した。その際、(4-9)ペプチドの C 末端は、NCL 反応に用いることができるよう、3-メルカプトプロピオン酸(MPA)とのチオエステルとして調製した。これらの 2 つのペプチドを、MPAA を含む MOPS 緩衝液(pH 7.4)とエチレングリコールの 1:9 混合液に溶解し、LEP を添加して 37 °C で 24 時間反応させた。生成物の確認は、逆相 HPLC および質量分析で行なった。(4-9)ペプチドの C 末端を MPAA とのチオエステルとして調製したものを挿入配列とした場合でも、同様の反応を行った。また、この反応の一般性を確認するために、脂質結合タンパク質 Saposin C の部分配列をモデルとして、上述の条件で PRS 反応を行った。

(3) PRS 反応の基質特異性の検討

PRS 反応の基質特異性を確認するために、BNP(1-15)をモデルとして、(4-9)ペプチドの配列を様々に変えて、PRS 反応を行なった。挿入配列には、Thr⁴を Gly または Pro に変更したペプチド、Gly⁹を Val に変更したペプチド、および Met⁵を 2-(アミノメチル)フェニル酢酸に置換したペプチドをそれぞれ調製し、反応を行なった。生成物の確認は、逆相 HPLC および質量分析で行なった。

4. 研究成果

(1) プロテアーゼによる反応と NCL の反応条件の検討

プロテアーゼによるタンパク質の加水分解では、水が必須である。一方、タンパク質逆スプライシング(PRS)反応においては、加水分解を抑制するため、溶媒中の水を可能な限り除去する必要がある。脂質分解酵素であるリパーゼがイオン液体中で酵素活性を示すとの報告があったことから、申請書当初の

計画では、PRS 反応にイオン液体を溶媒として用いることを計画した。そこで、プロテアーゼとしてリシルエンドペプチダーゼ(LEP)を用いてイオン液体中での挙動を解析した。

リジンを含む短鎖ペプチドを基質、グリシルグリシンをアクセプターとして、基質ペプチドがグリシルグリシンと連結されるかどうかを指標として、種々のイオン液体で反応を試みた。しかし、検討したイオン液体すべてで、目的とする生成物は検出されなかった。そこで、溶媒に MOPS 緩衝液(pH 7.4)を少しずつ加えていったところ、イオン液体の終濃度約 50%のところでは基質ペプチドの分解が確認された。しかし、この条件では目的とする生成物は検出できず、PRS 反応を行うのにイオン液体を単独で使用するのとは適切ではないと考えられた。

そこで、水以外の有機溶媒を検討することとした。タンパク質のフォールディングを保持するのに有用と考えられるエチレングリコールまたはグリセリンを、イオン液体を含む水溶液に様々な濃度で添加し、反応を試みた。その結果、比較的粘性が低いエチレングリコールが水の代替溶媒として適切である可能性が見出されたため、水/エチレングリコール/イオン液体の濃度比を様々に変更しながら反応を検討した。目的とするグリシルグリシン連結生成物の生成量を基準として条件を精査したところ、イオン液体は酵素反応効率を低下させるという結果が見出され、90%エチレングリコール水溶液が LEP の酵素活性を維持しつつ水の量を最少にできると判断した。

PRS 反応のもう一つの鍵となる NCL 反応が、90%エチレングリコールを含む緩衝液中で進行するのかを確認した。短鎖のモデルペプチドを基質として、反応促進剤として 4-メルカプトフェニル酢酸(MPAA)を含む緩衝液を加えた溶媒系で、NCL 反応を試みたところ、通常の緩衝液中よりも反応が遅いものの、目立った副反応も無く目的とする生成物が検出された。このことから、90%エチレングリコールを含む緩衝液が、PRS 反応の溶媒として適切であると考えられた。

(2) 短鎖ペプチドをモデルとしたタンパク質逆スプライシング反応の検討

上記の検討を踏まえて、PRS 反応を実際に行うこととした。モデル配列としてヒト B-タイプナトリウム利尿ペプチド(BNP)の部分配列(1-15)を用いることとし、そのうち(4-9)セグメントを挿入配列として反応を行うこととした。(1-3)-(10-15)ペプチド、および(4-9)ペプチドをそれぞれペプチド固相合成法により調製した。その際、(4-9)ペプチドの C 末端は、NCL 反応に用いることができるよう、3-メルカプトプロピオン酸(MPA)とのチオエステルとして調製した。これらの 2 つのペプチドを、MPAA を含む MOPS 緩衝液(pH 7.4)とエチレングリコールの 1:9 混合液に溶解し、LEP を添加して 37 °C で 24 時間反応させた。その結果、低収率ながら、目的とする BNP(1-15)ペプチドが生成していることが確認された。

これは、PRS 反応を一段階の反応で行った初めての例であると考えられる。

一方、NCL 反応の進行を容易にするために(4-9)ペプチドの C 末端を MPAA とのチオエステルとして調製し同様の反応を行ったところ、目的とするペプチドとは異なる生成物がほぼ定量的に得られた。この生成物は、質量分析において BNP(1-15)ペプチドと同じ値を与えたが、逆相 HPLC においてまったく異なる溶出時間であったことから、基質とした(1-3)-(10-15)ペプチド中の Cys 残基側鎖と(4-9)ペプチドチオエステルとの間でチオエステル交換反応が進行した生成物であり、Cys 残基側鎖で分岐したペプチドによる立体障害により、LEP による分解がまったく進行しなかったために生じたと考えられた。

この反応の一般性を確認するために、まったく異なるアミノ酸配列を有するペプチドで同様の反応を試みた。モデルとして、脂質結合タンパク質 Saposin C の部分配列を用いた。ペプチドとペプチドチオエステルをそれぞれ調製し、前述の反応条件で PRS 反応を行ったところ、やはり低収率ながら目的とするペプチドの生成を確認することができた。

(3) PRS 反応の基質特異性の検討

ここで開発した PRS 反応の基質特異性を確認するために、BNP(1-15)をモデルとして、(4-9)ペプチドの配列を様々に変えることとし、まず Thr⁴ を Gly や Pro に変更して反応を行った。Gly に変えたときには収率が低下した。LEP は、Lys-Xaa という配列を認識して加水分解する酵素だが、Gly⁴ で収率が低下したのは生成物に含まれる Lys-Gly という配列が LEP によって分解される速度が、もとの Lys-Thr 配列よりも速いためだと考えられる。一方、Pro に変えたときは目的とする生成物が確認できなかった。LEP の基質として、Lys-Xaa の Xaa 部位が Pro だと分解しないことから、その逆反応を進めるにあたり N 末端が Pro であるペプチドは挿入配列として LEP に認識されなかったためと考えられる。

次に NCL 反応で連結する部位として適切な配列を検討するために、Gly⁹ を Val に置換した挿入ペプチドを用意し、同様に PRS 反応を行なった。その結果、NCL 反応が非常に遅く、目的とする生成物はほとんど検出されなかった。C 末端が Val のペプチドで NCL 反応を行うと、反応速度が遅いことが知られていることから、この結果は、ここで利用した反応条件で PRS 反応を行う場合、NCL 反応が非常に遅く、目的とする生成物が得にくいことを示唆するものと考えられる。

天然タンパク質には存在しない構造を挿入することが可能かどうかを検証するために、Met⁵ を 2-(アミノメチル)フェニル酢酸に置換して PRS 反応を行った。その結果、Met⁵ のときとほぼ同じ反応効率で目的とする生成物を確認することができたことから、LEP による PRS 反応では、挿入配列の N 末端が通常のアミノ酸であれば基質となりうると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katayama Hidekazu, Mizuno Ryo, Mita Masatoshi	4. 巻 83
2. 論文標題 A novel approach for preparing disulfide-rich peptide-KLH conjugate applicable to the antibody production	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1791 ~ 1799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1618696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katayama Hidekazu, Nagasawa Hiromichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Chemical synthesis of N glycosylated insulin like androgenic gland factor from the freshwater prawn <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/psc.3215	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katayama Hidekazu, Nagata Koji	4. 巻 27
2. 論文標題 Application of 2,2 dipyridyl disulfide mediated thiazolidine ring opening reaction to glycoprotein synthesis: Total chemical synthesis of evasin 3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/psc.3290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 片山秀和、長澤寛道
2. 発表標題 Chemical synthesis of insulin-like androgenic gland factor from the freshwater prawn <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山秀和、永田宏次
2. 発表標題 新規のチアゾリジン開環反応を利用した糖タンパク質Evasin-3の化学合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidekazu Katayama
2. 発表標題 Application of the novel thiazolidine ring opening reaction to glycoprotein synthesis
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山秀和、水野涼、三田雅敏
2. 発表標題 マヒトデ由来リラキシン様ペプチドに対する抗体作製に向けた誘導体の合成研究
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山秀和、豊田賢治、田中陽菜、大平剛
2. 発表標題 Chemical synthesis of insulin-like androgenic gland factor from the crayfish <i>Procambarus clarkii</i>
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------