

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号:34419

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2008~2011

課題番号:20510207

研究課題名(和文) プロペプチドの分子内シャペロン機能の解明と新規生理活性ペプチドの創作

研究課題名(英文) Role of pro-peptide region as an intra-molecular chaperone and its application

研究代表者

日高 雄二 (HIDAKA YUJI)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号:70212165

研究成果の概要(和文):本研究は、ペプチドホルモンの前駆体蛋白質の立体構造形成の意義を明らかにすること、プロ領域の分子内シャペロン機能を有効利用することを目的として行われた。題材として腸管水分調節ホルモン(ウログアニリン)の前駆体プロウログアニリンを用い、その結晶構造の解明、変異体の立体構造形成反応を追跡した。その結果、分子進化における生理活性構造の形成と進化・保持に関する重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文): Role of propeptide-region of peptide hormone as an intra-molecular chaperone was investigated to elucidate structure-function relationship of peptide hormone during its development. Folding and X-ray structural analyses of prourogunaylin revealed that intra-molecular chaperon plays a critical role for the maintenance of the local stability of the biologically active site related to the net stabilization of the precursor molecule during its development.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:生物分子科学

科研費の分科・細目:生物分子科学

キーワード:フォールディング、生理活性ペプチド、プロペプチド、前駆体、ウログアニリン、グアニル酸シクラーゼ、構造生物学、結晶構造

## 1. 研究開始当初の背景

ある種のペプチドホルモンは、それ自身で生理活性のある立体構造を形成することが困難であることが知られている。我々は、その原因として、それらペプチドホルモンが生体内で翻訳された直後の前駆体蛋白質中に存在するプロ領域が、分子内シャペロンとして、それらペプチドの正しい立体構造形成を促進することを見出していた。そこで、本研

究は、様々なペプチドホルモンの生理活性構造の構築に対するプロ領域の分子内シャペロンとしての役割・機能を明らかにすることを目標とし、それまでに我々が明らかにしたプロウログアニリンのX線結晶構造解析、及び、様々なペプチドホルモン前駆体蛋白質の立体構造解析を行うことにした。また、我々は、プロ領域がペプチドホルモンの生理活性を有する成熟体の立体構造を認識する性質

を利用し、プロ領域の生理活性認識部位に適合した立体構造を持つ人工ペプチドの作成に成功しており、更に、その人工生理活性ペプチドの立体構造形成機構の解明およびプロ領域結合部位を鋳型とした更なる新規生理活性ペプチドを創作するための基盤形成を行うことにした。

## 2. 研究の目的

生体は、進化の過程で有効なペプチドホルモンの活性発現構造を検索する際、成熟ホルモンのみの立体構造を考慮して受容体蛋白質との相互作用に有効な生理活性発現構造を持つアミノ酸配列を検索するのではなく、前駆体蛋白質中でのペプチドの立体構造を思考錯誤することで、より有効なアミノ酸配列を獲得したものと予想される。このことから、我々は、ペプチドホルモンのプロセッシングにおける前駆体蛋白質の立体構造形成は、最終的な生理活性発現構造の形成に密接な関係があると考えた。

そこで、ペプチドホルモンのプロセッシングにおける前駆体蛋白質の立体構造形成の意義を明らかにすることおよび前駆体蛋白質中のプロ領域の分子内シャペロン機能の有効利用を目的として本研究を行うことにした。

本研究の目的のためには、前駆体蛋白質中でプロ領域がどのように成熟体領域の立体構造形成を促進しているのかを明らかにする必要がある。そこで、1) プロウログアニリンの結晶構造解析を第一の目標とし、次に、2) プロオピオメラノコルチン、アルツハイマー前駆体蛋白質、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド前駆体、オレキシン前駆体などの立体構造解析を行い、プロペプチドの分子内シャペロン機能について解析することにした。また、得られた立体構造あるいは並行して立体構造データベースを用いることにより、3) プロペプチドの分子内シャペロン機能を利用した前駆体蛋白質レベルでの新規生理活性ペプチドのデザインを行うことにした。

## 3. 研究の方法

プロウログアニリンの立体構造解析およびプロ領域の分子内シャペロン機能を利用した新規生理活性ペプチドの構築について以下の方法により研究を行った。

1) プロウログアニリンの立体構造解析と分子内シャペロン機能の解明

既に、確立した大腸菌によるプロウログアニリンの高発現系および精製系を利用して試料を大量調製し、結晶化を行った。野生型プロウログアニリンに関して、既に良好な結晶を得ていたため、さらに高精度な反射を得るための結晶化条件の検索を行った。また、構造解析に必須な位相情報を得るため、セレンメチオニンをウログアニリンに導入した変異体を作成した。その結果、変異体は発現量が極端に低下したため、発現量を増加させるための培養条件あるいは精製系の検討、および結晶化条件の検索を行った。

また、分子内シャペロン機能解明のため、ウログアニリンのプロ領域および成熟体領域の全てにわたり部位特異的変異体を作成し、その立体構造形成を評価した。

2) プロ領域の分子内シャペロン機能を利用した新規生理活性ペプチドの構築

成熟体領域に遺伝子工学的にランダム変異あるいは *de novo* 変異を導入し、プロ領域によって立体構造が捕獲されるものをフォールディング実験により、選別した。本手法で得られた変異体は多種にわたり、それぞれの変異体の立体構造形成実験を行った。

3) 分子内シャペロン機能を持つプロペプチドの探索

我々は、これまでに様々なペプチドホルモンの前駆体蛋白質の一次構造を検討した結果、そのプロ領域に分子内シャペロン機能が予想されるものを幾つか見出した。

代表的な例として、ナトリウム利尿ペプチド (ANP)、プロオピメラニコルチン、プロヘプシジンが挙げられる。これらについて、ペプチドの化学合成および前駆体蛋白質の大腸菌からの発現系の構築を行い、それら前駆体の立体構造形成反応を追跡した。

## 4. 研究成果

我々は、プロ領域の分子内シャペロン機能を利用した新規生理活性ペプチドの創作および分子内シャペロン機能の役割について検討を行い、プロウログアニリンの結晶構造を明らかにした。それに伴い、プロウログアニリンのプロ領域のみならず成熟体の全ての領域について部位特異的変異体を作成し、それら変異前駆体蛋白質の立体構造形成反応を詳細に調査した。その結果、立体構造レベルで、以下の重要な知見を得た。

1) 分子内シャペロン機能を有するプロ領域と成熟ホルモンは相互に立体構造安定化を行っているが、その接触面はペプチドホルモンの生理活性部位とは必ずしも一致しない

2) 前駆体蛋白質の全分子の立体構造の安定化と成熟体の生理活性部位の局所的な安定化に密接な関係がある

3) 分子進化の抑制部位が存在する (進化抑制因子)

いずれも、研究開始当初には予想しなかった情報であり、ペプチドホルモンが、分子進化において、高い生理活性・機能を有するにいたった経路を研究する上で、貴重な情報である。特に、分子進化を抑制する部位の情報は、これまで世界で例がなく、この部位が生理活性発現構造の進化の上で、どのような意味を持つのか興味もたれる。

また、当初の目的である人工生理活性ペプチドの創作に対し、得られた人工ペプチドの立体構造形成機構について明らかにすることができた。これは、野生型の立体構造形成とは少し異なった機構で進行するものと予想された。

さらに、様々なペプチドホルモン前駆体蛋白質の立体構造形成について検討した結果、特に、ANP の立体構造形成に前駆体の特定の部位が関与していることが示唆された。今後、更なる検討を必要とする。

#### 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 28 件)

- 1) Masaki Okumura, Shigeru Shimamoto, and Yuji Hidaka (責任者), Chemical Method to Investigate Peptide and Protein Folding, *FEBS Journal* (2012) in press. 査読有
- 2) Masatoshi Saiki, Yuji Hidaka, Masayuki Nara, and Hisayuki Morii, Stem-forming regions that are essential for the amyloidogenesis of prion proteins, *Biochemistry*, 51, 1566-1576 (2012) 査読有
- 3) Yu-ichiro Yoshida, Masaki Okumura, Shigeru Shimamoto, Kyohei Hasegawa, Hiroshi Yamaguchi, and Yuji Hidaka (責任者), Cooperative Communication between the Mature and the Pro-Peptide Region in Prouroguanylin during Folding, *Peptide Science*, 2011, 193-196 (2012) 査読有
- 4) Masaki Okumura, Yu-ichiro Yoshida, Takuma Maekawa, Kumiko Sumi, Hiroshi Yamaguchi, and Yuji Hidaka (責任者), Folding Analysis of Prouroguanylin via Specific Intermediates Using Protein Disulfide Isomerase, *Peptide Science*, 2011, 227-228 (2012) 査読有
- 5) Tadafumi Konogami, Kenji Watanabe, Shigeru Shimamoto, Ajoy Basak, and Yuji Hidaka (責任者), High Level Expression of Proopiomelanocortin Using an Artificial Gene in *E. Coli* Cells, *Peptide Science*, 2011, 367-368 (2012) 査読有
- 6) Yu-ichiro Yoshida, Masaki Okumura, Hiroshi Yamaguchi, and Yuji Hidaka (責任者), Role of Leu66 in the Folding of Uroguanylin Assisted by the Pro-peptide Region. *Peptide Science*, 2010, 163-163 (2011) 査読有
- 7) Masaki Okumura, Masatoshi Saiki, Hiroshi Yamaguchi, and Yuji Hidaka (責任者), Acceleration of Disulfide-Coupled Protein Folding Using Glutathione Derivatives, *FEBS Journal*, 278, 1137-1144 (2011) 査読有
- 8) Yuji Hidaka (責任者), Ko-ichi Kontani, Rina Taniguchi, Masatoshi Saiki, Sayoko Yokoi, Kenji Yukuhiro, Hiroshi Yamaguchi, and Mitsuhiro Miyazawa, Fiber Formation of a Synthetic Spider Peptide Derived from *Nephila Clavata*, *Biopolymers*, 96, 222-227 (2011) 査読有
- 9) Yuji Hidaka (責任者), Kouich Kon-tani, Masatoshi Saiki, Sayoko Yokoi, Rina Taniguchi, Hiroshi Yamaguchi, Kenji Yukuhiro, and Mitsuhiro Miyazawa, Fiber Formation of a Synthetic Peptide Derived from Spider Dragline Silk of *Nephila.clavata* *Peptide Science*, 2009, 113-114 (2010) 査読有
- 10) Kenji Watanabe, Yohei Hosokawa, Len Ito, Ajoy Basak, Hiroshi Yamaguchi, and Yuji Hidaka (責任者), Expression and Purification of Selenomethionyl Proopiomelanocortin, *Peptide Science*, 2009, 421-422 (2010) 査読有
- 11) Hironori Konishi, Masaki Okumura, Masatoshi Saiki, Hiroshi Yamaguchi, and Yuji Hidaka (責任者), Folding Analyses of Gly or Ala mutants to evaluate the intra-molecular chaperone. *Peptide Science*, 2009, 25-28 (2010) 査読有
- 12) Atsushi Matsuoka, Tomoaki Yamashita, Ami Arai, Len Ito, Masaki Okumura, Hiroshi Yamaguchi, Michio Niinobe, and Yuji Hidaka (責任者), Characterization of the Extracellular Domain of the Human Amyloid Precursor Protein, *Peptide Science*, 2009, 427-430 (2010) 査読有
- 13) Masaki Okumura, Hironori Konishi, Yuhei Yamazaki, Hiroshi Yamaguchi, and Yuji Hidaka (責任者), Thermodynamic Analysis of the Propeptide-mediated Folding of de novo-designed Disulfide Hybrid Protein, *Peptide Science*, 2009, 203-206 (2010) 査読有
- 14) Nobuyuki Fukushima, Daisuke Furuta, Yuji Hidaka, Ryutaro Moriyama, and Toshifumi Tsujiuchi, Post-translational Modifications of Tubulin in the Nervous System, *Journal of Neurochemistry*, 109, 683-693 (2009) 査読有
- 15) Masatoshi Saiki, Mayumi Watase, Hironori

Matsubayashi, and Yuji Hidaka (責任者), Recognition of the N-Terminal Histone H2A and H4 Peptides by Peptidylarginine Deiminase IV, *Protein and Peptide Letters*, 16, 1012-1016 (2009) 査読有

- 16) Len Ito, Yuji Hidaka (責任者), Masaki Okumura, Hironori Konishi, Adermann Knut, and Hiroshi Yamaguchi, Crystallization and Preliminary X-ray Structural Studies of Human Prouroguanylin, *Acta Crystallogr. Sect F Struct Biol Cryst Commun.*, 64(8), 771-772 (2008) 査読有

他、10 報 (査読有)、2 報 (査読無)

[学会発表] (計 41 件)

- 1) Yuji Hidaka, Acceleration of disulfide-coupled protein folding by positively charged glutathione derivative, 2012年2月26日, San Diego (USA)
- 2) Yuji Hidaka, Role of Leu66 in the Folding of Uroguanylin-assisted by Intra-molecular Chaperone, 2012年2月26日, San Diego (USA)
- 3) Yuji Hidaka, High Level Expression of Proopiomelanocortin in E. Coli Cells using Optimized Codons, 2012年2月26日, San Diego (USA)
- 4) Yuji Hidaka, Folding Mechanism of a Precursor Protein of A Peptide Hormone Mediated by an Intra-molecular Chaperone, 2012年2月26日, San Diego (USA)
- 5) Yuji Hidaka, Folding Analysis of Prouroguanylin via Specific Intermediates Using Protein Disulfide Isomerase, 2011年9月27日, 札幌
- 6) Yuji Hidaka, Cooperative Communication between the Mature and the Pro-Peptide Region in Prouroguanylin during Folding 2011年9月28日, 札幌
- 7) Yuji Hidaka, High Level Expression of Proopiomelanocortin Using an Artificial Gene in E. Coli Cells 2011年9月28日, 札幌
- 8) Yuji Hidaka, Heparin-Induced Conformational Changes in the Extracellular Domain of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein, 5<sup>th</sup> International Peptide Symposium, 2010年12月5日, 京都
- 9) Yuji Hidaka, Role of Leu66 in the Folding of Uroguanylin Assisted by the Pro-peptide Region, 5<sup>th</sup> International Peptide Symposium, 2010年12月5日, 京都
- 10) Yuji Hidaka, Oxidative Folding of Prouroguanylin, 5<sup>th</sup> International Peptide Symposium,

2010年12月5日, 京都

- 11) Yuji Hidaka, Fiber Formation of Peptide Fragments Derived from Spider Dragline Silk Protein, 5<sup>th</sup> International Peptide Symposium, 2010年12月5日, 京都

他 30 件 (全て代表者)

[図書] (計 1 件)

「グルタチオン誘導体を用いたジスルフィド結合含有タンパク質の立体構造形成の祖奥新」奥村正樹、日高雄二、(株)メディカルドゥ、最新ペプチド合成技術とその創薬への応用、P192-198, 2012 年 (共著)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ジスルフィド結合交換反応を利用した蛋白質の立体構造形成促進試薬

発明者: 日高雄二

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2010-270195

出願年月日: 平成 22 年 12 月 3 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

日高 雄二 (HIDAKA YUJI)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号: 70212165

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

山口 宏 (YAMAGUCHI HIROSHI)

関西学院大学・理工学部・教授

研究者番号: 10252719