

機関番号：17201  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008-2010  
 課題番号：20550154  
 研究課題名（和文）ヘテロ二量体受容体の発現する多様な生物活性を識別する膜貫通ペプチドダイマーの開発  
 研究課題名（英文）Synthesis of Transmembrane Peptides Discriminate Multiple Biological activities from Heterodetic Dimeric Receptors  
 研究代表者  
 兒玉 浩明 (Hiroaki Kodama)  
 佐賀大学・工学系研究科・教授  
 研究者番号：80205418

研究成果の概要（和文）：好中球活性化ペプチドの二量体アナログの開発を目的に、受容体の2つのサブタイプに選択的なアゴニスト及びアンタゴニストの二量体を合成した。合成した二量体アゴニストは、2つのペプチド間の距離が短いほど高い生物活性を示した。また、ヘテロ膜貫通ペプチドとして、3つの FPR サブタイプの第4膜貫通ドメインをヘテロに架橋した。好中球の活性酸素放出能で評価したところ、活性酸素産生をプライミングすることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Dimeric agonists and antagonists specific for the subtypes of human neutrophil receptors were synthesized by solid phase method. The activities of dimers exhibited cross-linker length dependences. Hetero-transmembrane peptides were also prepared and were showed priming activities for human neutrophils.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：シグナル伝達、生体分子、生理活性、活性酸素、ダイマー

#### 1. 研究開始当初の背景

GTP 結合タンパク質と結合して情報を伝達する7回膜貫通型受容体は、他の受容体と比べ、伝達する情報の種類やタンパク質の数からみて膨大なファミリーを形成しているが機能構造は未解明のままであった。これらのレセプターは一般的に複数のタンパク質が会合して機能を調節していると考えられているが、作動薬・拮抗薬の結合と受容体会合の関連は明らかになっていない。この膜貫通部ペプチドを化学合成し、fMLP 受容体活性化を評価した。得られた膜ドメインをヒト好中球と相互作用（受容体タンパク質の会合）

した後、アゴニストペプチドにより受容体を活性化させたところ、第4膜貫通ドメインを投与した場合のみ、アゴニスト単独投与よりも著しく高い活性酸素放出作用が発現された。受容体会合が活性化に必須な場合、膜ドメインペプチドの添加は受容体会合を妨げると考えられるため、受容体の不活性化を引き起こされると予想していた。全く異なる結果を与えた今回の研究から、FPR 受容体は、会合することなしに活性を調節している、あるいは膜ドメインペプチドの添加が異なる受容体タンパク質会合を起こし、受容体活性を増強した、膜ドメインが偶然受容体のリガ

ンド結合部位と相互作用し、シグナル伝達もしくは受容体のアップレギュレーション誘導したことが考えられた。

## 2. 研究の目的

これまでに好中球遊走ペプチドの二量体アナログの合成と受容体タンパク質の二量体構造を調節する膜貫通ペプチドの合成とそれぞれの生物活性研究を行ってきた。その中で、膜タンパク質の機能を調節できる7回膜貫通型受容体の膜貫通領域由来ペプチドの開発に成功した。これは好中球に投与することで好中球の生物活性を飛躍的に増強できる優れたペプチドであった。

今回、これらの成功をふまえ、好中球機能を増強する膜貫通ペプチドの二量体、及びアゴニスト・アンタゴニストの二量体ペプチドを化学合成し、これらの機能調節を調べた。特に以下の2点を検討した。

- (1)二量体膜貫通ペプチドによる受容体タンパク質会合の調節と生物活性への影響
- (2)二量体アゴニスト・アンタゴニストと二量化受容体との二量化相互作用の解明

## 3. 研究の方法

本研究は以下の3つの実験系によって実施された。すなわち、架橋剤の開発、ペプチドのデザインと化学合成、生理活性評価である。架橋剤の開発では、目的とする二量体ペプチドの溶解と生物活性を考慮した架橋剤の開発をおこなった。ペプチドのデザインと化学合成では、二量体アゴニストとアンタゴニストの合成、及び、受容体タンパク質膜貫通ドメインの二量体をおこなった。生理活性評価では、ヒト好中球における二量体ペプチドの生理活性について、架橋鎖長依存性及び受容体サブタイプ選択制の評価、及び、受容体膜貫通ペプチドの受容体会合に及ぼす効果を検討した。

ホルミルペプチド受容体のアゴニスト及びアンタゴニストの二量体では、架橋剤の選択は生理活性だけでなく溶解度に大きな影響を与える。今回は水溶性で且つ生体膜との相互作用の容易な架橋剤を新規に開発した。今回母体となる遊走ペプチドアゴニスト・アンタゴニストには、ヒト好中球に存在する受容体サブタイプを選択できるそれぞれ2つのペプチドを用いた。具体的に FPR1 サブタイプに選択的なアゴニスト fMLP と FPRL2 サブタイプ選択的なアゴニスト WKYMVM、アンタゴニストにはそれぞれ、Boc-FLFLF と WRW4 である。受容体膜貫通ペプチドの開発では、fMLP 受容体の膜貫通部ペプチドをホモもしくはヘテロに二量化したペプチドを化学合成し、fMLP 受容体活性化を評価した。膜貫通領域の推定は疎水親水プロットにより行った。膜ドメインのアレンジメントを保つため、C 末端

領域に親水性タグを付加した。各サブタイプの膜貫通ペプチドペプチド合成は、迅速かつ高効率な固相合成法を利用した。一般に膜貫通ペプチドは、疎水性かつ嵩高いアミノ酸から構成されているため、反応性に乏しく、また、ペプチドの伸長に伴い、ペプチド同士の会合性のため、合成が困難である。

生理活性は、ヒト好中球及び分化させたヒト白血球細胞 HL-60 での cytochrome C 法による活性酸素生成、ボイデンチャンパーによる遊走活性、Fura-2 を用いた細胞内カルシウム濃度変化について評価した。

## 4. 研究成果

ヒト白血球の主成分である好中球に対する遊走ペプチドの二量体アナログの開発を目的に、アゴニスト・アンタゴニストの二量体を合成した。WKYMVM の二量体 (Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-(Gly)<sub>n</sub>-Cys)<sub>2</sub> (n=0-3) においては、2つのペプチド間の距離が短いほど高い細胞内カルシウム濃度変化を引き起こした。また、二量化したペプチドが FPR2 サブタイプ選択性を保持していることも確認された。

一方、アンタゴニスト二量体としては、代表的アゴニスト Boc-FLFLF と WRW4 のそれぞれのジスルフィド架橋二量体の合成をおこなった。その結果、Boc-FLFLF のダイマーは、架橋鎖長に依存して生物活性が変化し、特に架橋鎖長の最も短いペプチドで最大活性を示した。さらに、アンタゴニスト Boc-MLP と相当するアゴニスト fMLP の至適鎖長を比較したところ、アゴニストとアンタゴニストで異なっていることがわかった。このことからアゴニストとアンタゴニストの結合様式が異なることが示唆された。

さらにヘテロ受容体タンパク質構築を検討した。今回、ヘテロに二量化した受容体間の相互作用を検討する目的で、ヘテロ膜貫通ペプチドの開発をおこなった。ヒト好中球の活性酸素放出能で評価したところ、二量体処理のない細胞と比較して約2倍の活性酸素を放出することを見いだした。

## 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 13 件)

1. S. Osada, S. Sano, M. Ueyama, Y. Chuman, H. Kodama, and K. Sakaguchi, Flioroalkene modification of mercaptoacetamide-based histone deacetylase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 605-611 (2010) 査読付

2. Y. Saito, T. Owaki, T. Matsunaga, M. Saze, S. Miura, M. Maeda, M. Eguchi, R. Tanaka, J. Taira,

H. Kodama, S. Goto, Y. Niitsu, H. Terada, and F. Fukai, Apoptotic death of hematopoietic tumor cells through potentiated and sustained adhesion to fibronectin via VLA-4, *J. Biol. Chem.*, **285**, 7006-7015 (2010) 査読付

3. J. Taira, S. Osada, R. Hayashi, T. Ueda, M. Jelokhani-Niaraki, H. Aoyagi, and H. Kodama, Trans-Bilayer Ion Conduction by Proline Containing Cyclic Hexapeptides and Effects of Amino Acid Substitutions for The Ion Conducting Properties, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **83**, 683-688 (2010) 査読付

4. J. Taira, Y. Kida, H. Yamaguchi, K. Kuwano, Y. Higashimoto, and H. Kodama, Modifications on amphiphilicity and cationicity of unnatural amino acid containing peptides for improvement of antimicrobial activity against pathogenic bacteria, *J. Pept. Sci.*, **16**, 607-612 (2010) 査読付

5. J. Taira, M. Shibue, S. Osada, and H. Kodama, Peptaibol derived helix-kink motif facilitates channel forming of the artificial  $\alpha$ -aminoisobutyric acid rich helices, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **16**, 277-282 (2010) 査読付

6. Y. Shiki, M. Onai, D. Sugiyama, S. Osada, I. Fujita, and H. Kodama, Synthesis and Biological Activity of Cyclic Peptide, Hymenamides Analogs, *Peptides*, 323-324, (2009) 査読付

7. D. Sugiyama, R. Hayashi, S. Osada, Y. Hamasaki, I. Fujita, and H. Kodama, Synthesis and Biological Activity of Transmembrane Peptides Derived from FPR Family Receptors, *Peptides*, 331-332 (2009) 査読付

8. M. Onai, D. Sugiyama, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki, and H. Kodama, Synthesis and Priming Activities of Cyclic Peptides, Hymenamides, *Peptide Science 2008*, 239-242 (2009) 査読付

9. D. Sugiyama, Y. Hirakawa, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki, and H. Kodama, Synthesis and Biological Activity of Dimeric Chemotactic Peptide Antagonist, *Peptide Science 2008*, 253-256 (2009) 査読付

10. R. Tanaka, T. Owaki, S. Kamiya, T. Matsunaga, H. Kodama, R. Hayashi, T. Abe, Y. P. Harada, M. Shimonaka, H. Yajima, H. Terada, and F. Fukai, VLA-5-mediated adhesion to fibronectin accelerates hemin-stimulated erythroid differentiation of K562 cells through induction of VLA-4 expression, *J. Biol. Chem.*,

**284**, 19817-19825 (2009) 査読付

11. J. Taira, S. Furukawa, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, and H. Kodama, Modifications of Hydrophobic Value and Hydrophobic Moment Value of Cationic Model Peptides for Conversion of Peptide-Membrane Interactions, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **81**, 733-739 (2008) 査読付

12. D. Sugiyama, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki, and H. Kodama, Synthesis and Biological Activity of Synthetic Peptide MMK-1 Analogs, *Peptide Science 2007*, 269-272 (2008) 査読付

13. T. Naito, S. Miura, Y. Saito, T. Owaki, R. Hayashi, J. Taira, H. Kodama, M. Ueki, H. Sugimoto, and F. Fukai, Antiadhesive Sites Present in the Fibronectin Type III-Like Repeats of Human Plasma Fibronectin, *Peptide Science 2007*, 325-328 (2008) 査読付

[学会発表] (計 20 件)

1. R. Yamaguchi, D. Sugiyama, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki, H. Kodama, Synthesis and biological activities of dimeric formyl peptide antagonists, 2010 PacificChem, Hawaii Convention Center (Honolulu, HI, U.S.A.) December, 15-20, 2010

2. 北島健貴、山口 遼、新町洋文、長田聡史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、ヒト好中球遊走ペプチドアンタゴニストの構造活性相関、2010年日本化学会西日本大会、熊本大学(熊本) 2010年11月6日

3. 内村恵梨子、山口 遼、新町洋文、長田聡史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、ヒト好中球受容体 FPR2 選択的ペプチドの二量体の合成と生物活性、2010年日本化学会西日本大会、熊本大学(熊本) 2010年11月6日

4. 山口 遼、杉山大輔、宮崎真佐也、新町洋文、長田聡史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、ヒトホルミルペプチド受容体上のペプチド結合部位の検索、2010年日本化学会西日本大会、熊本大学(熊本) 2010年11月6日

5. 赤尾千穂・平河雄喜・山口遼・新町洋文・杉山大輔・長田聡史・藤田一郎・浜崎雄平・兒玉浩明、ホルミルペプチド受容体サブタイプ選択的ペプチドの二量化と生物活性、第47回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場(北九州)、2010年7月10日

6. 山口遼・新町洋文・長田聡史・藤田一郎・

浜崎雄平・兒玉浩明、ヒト白血病細胞 HL-60 のホルミルペプチド受容体サブタイプの検索、第 47 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場（北九州）、2010 年 7 月 10 日

7. 赤尾千穂、平河雄喜、杉山大輔、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、二量化 FPRL1 選択的アンタゴニストの合成と生物活性、日本化学会第 90 春季年会、近畿大学本部キャンパス（東大阪）2010 年 3 月 26-29 日

8. 杉山大輔、平河雄喜、新町洋文、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、ホルミルペプチド受容体に作用する二量化アンタゴニストの合成とヒト好中球での生物活性、日本化学会第 90 春季年会、近畿大学本部キャンパス（東大阪）2010 年 3 月 26-29 日

9. 平河雄喜、杉山大輔、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、FPR アンタゴニストダイマーの生物活性における鎖長依存性、日本化学会西日本大会 2009、愛媛大学（松山）2009 年 11 月 7-8 日

10. 杉山大輔、平河雄喜、新町洋文、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、二量化遊走アンタゴニストの受容体サブタイプ選択性、第 46 回ペプチド討論会、北九州国際会議場（北九州）2009 年 11 月 4-6 日

11. 平河雄喜、杉山大輔、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、高活性二量化アンタゴニストの受容体選択性、第 46 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場（北九州）2009 年 7 月 5 日

12. 杉山大輔、平河雄喜、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、二量化アンタゴニストの合成とその作用様式、第 46 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場（北九州）2009 年 7 月 5 日

13. 平河雄喜、杉山大輔、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、Boc-Phe-(D-Leu-Phe)<sub>2</sub> の二量化と生物活性、日本化学会第 89 春季年会、日本大学船橋キャンパス（千葉）2009 年 3 月 27-30 日

14. 杉山大輔、平河雄喜、長田聰史、浜崎雄平、藤田一郎、兒玉浩明、fMLP アンタゴニストの二量化とヒト好中球での生物活性、日本化学会第 89 春季年会、日本大学船橋キャンパス（千葉）2009 年 3 月 27-30 日

15. 杉山大輔、平河雄喜、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、ホルミルペプチドアンタゴニスト Boc-Met-Leu-Phe 二量体の合

成と性質、2008 日本化学会西日本大会、長崎大学（長崎）2008 年 11 月 15-16 日

16. 杉山大輔、平河雄喜、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、二量化遊走ペプチドアンタゴニストの合成と生物活性、第 45 回ペプチド討論会、タワーホール船堀（東京）2008 年 10 月 29-31 日

17. D. Sugiyama, S. Osada, R. Hayashi, H. Yamaguchi, M. Jelokhani-Niaraki, I. Fujita and H. Kodama, Transmembrane Peptides are Useful Tools for Study of Membrane Proteins Function, 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis, Sapporo, Japan, August 26-29, 2008

18. D. Sugiyama, S. Osada, I. Fujita, Y. Hamasaki and H. Kodama, Neutrophil Priming with Transmembrane Peptides Derived from Formyl Peptide Receptor Subtypes, 22nd Annual Symposium of The Protein Society, San Diego, CA, U. S. A, July 19-23, 2008

19. 平河雄喜、柴田大介、杉山大輔、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、FPR アンタゴニスト二量体の合成と生物活性、第 45 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場（北九州）2008 年 7 月 5 日

20. 杉山大輔、柴田大介、長田聰史、藤田一郎、浜崎雄平、兒玉浩明、二量化ホルミルペプチドアンタゴニストの合成と生物活性、日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会、学術総合センター（東京）2008 年 5 月 19-20 日

#### 〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：抗癌剤の活性増強剤

発明者：深井文雄、兒玉浩明、松永卓也

権利者：東京理科大学、佐賀大学、宮崎大学

種類：特許

番号：特願 2011-054475

取得年月日：2011 年 3 月 11 日

国内外の別：国内

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

兒玉 浩明 (KODAMA HIROAKI)

佐賀大学・工学系研究科・教授

研究者番号：80205418

##### (2) 研究分担者

長田 聡史 (OSADA SATOSHI)

佐賀大学・工学系研究科・准教授

研究者番号：50284609