

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19091

研究課題名（和文）翻訳後修飾チロシン硫酸化の定量解析を目指した硫酸化ペプチドの分泌合成法確立と応用

研究課題名（英文）Establishment of secretory synthesis method for sulfated peptides and its application to quantitative analysis of tyrosylprotein sulfation

研究代表者

黒木 勝久（KUROGI, Katsuhisa）

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20647036

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：翻訳後修飾の一つチロシン硫酸化の機能解析手段として重要な硫酸化ペプチドの新たな合成法の確立を目指し、プレビパチルスに加え、大腸菌を用いた合成法の検討並びに、LC-MSによる硫酸化ペプチドの定量解析手法の条件検討を行った。その結果、大腸菌で発現させた3種類の組換え酵素を活用した1-step硫酸化ペプチド合成に成功した。さらに、コレシストケニン硫酸体(CCK-S)やPSGL1やC4をモデルに硫酸化ペプチドにて分析法を検討した結果、MRM-IDAの手法による硫酸化ペプチドの定性・定量分析の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳後修飾の一つであるチロシン硫酸化は、タンパク質やペプチドの機能を制御し、発育制御や免疫応答のほか、様々な生体機能調節作用が報告されている。しかし、硫酸化タンパク質やペプチドの標準品などが存在しないこと、分析技術が確立していないことから、その生理機能解明は十分ではない。その本研究で確立した遺伝子組換え大腸菌を利用して、合成した硫酸ペプチドの機能解明に繋がり、その応用例として新たな感染治療薬開発が期待される。さらに、タンパク質の翻訳後修飾の硫酸化の定量・定性解析の実現は、硫酸化の機能解明とヒトの健康増進に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to establish a new synthetic method for sulfated peptides, a key tool for assessing the function of tyrosine sulfation, we investigated a synthetic method using *Brevibacillus* or *E. coli*. Additionally, the possibilities of quantitative analysis method using LC-MS for sulfated peptides was examined. As a result, a 1-step sulfated peptide synthesis utilizing three recombinant enzymes expressed in *E. coli* was successfully achieved. Furthermore, the analytical method for sulfated peptides using cholecystokenin sulfate (CCK-S), PSGL1, and C4 as models was investigated. Potential qualitative and quantitative analysis of sulfated peptides using MRM-IDA method was demonstrated.

研究分野：生物化学

キーワード：ペプチド 翻訳後修飾 チロシン硫酸化 大腸菌 プレビパチルス LC-MS

1. 研究開始当初の背景

チロシン硫酸化は、タンパク質の機能制御を担う翻訳後修飾であり、ペプチドの生理活性を制御する修飾反応である。しかし、翻訳後修飾の硫酸化を分析できる有効な技術がこれまで開発されてこなかったこともあり、その生理機能は十分には理解されていない。一方、チロシン硫酸化の低下は、免疫異常やリウマチ、成長遅延のほか、不妊の原因になることが報告されている。さらに、チロシン硫酸化はウイルス感染にも関与しており、社会問題化している新型コロナの感染リスクや重症化との関連性も指摘されている。チロシン硫酸化の生理機能解明のみならず、臨床診断への応用という点でもチロシン硫酸化の定量解析が求められている。現在の翻訳後修飾ペプチドの分析は質量分析を用いた手法が主流となりつつあり、新たな基質や機能性解明につながっている。そのため、硫酸化ペプチドの質量分析を用いた解析、特に定量解析技術の構築が期待されているが、LC-MSでの解析例は全くない。定量解析には内部標準としての硫酸化ペプチド標準品は必須であるが、有効な合成法は確立されていなかった。現在のペプチド合成の主流である Fmoc 固相合成による硫酸化チロシン含有ペプチドの合成は難しい。これは、Fmoc の脱保護の過程で硫酸基が脱離することに起因する。このほか、酵素反応合成法や硫酸化チロシン tRNA コドンを組み込んだ大腸菌による合成などが開発されたが、合成量の確保が困難であり実用化には程遠い現状であった。また、硫酸化ペプチドは、生理活性ペプチドとしても生理作用を示すことから、その機能解明と応用利用の為に、簡便で安価な合成法を確立することが求められていた。

2. 研究の目的

我々の研究グループは、先行研究にて、大腸菌を用いた低分子化合物の硫酸化代謝物の大量合成法を確立している。さらに、翻訳後修飾の硫酸化を触媒する酵素の大腸菌発現と精製、組換え酵素の活性測定に成功している。そこで、本研究では、遺伝組換え微生物、特にプレバチルスを用いた硫酸化ペプチドの分泌合成法を確立することを主目的とした。さらに、LC-MS を用いた硫酸化ペプチドの解析実現性を検討し、有効な分析・解析手法を見出すことを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

研究課題 : プレバチルスを用いた硫酸化ペプチド分泌菌の作製と硫酸化ペプチド合成法確立

基質ペプチドと硫酸転移酵素(TPST)の両方を組み込んだ硫酸化ペプチド分泌プレバチルスの作製を試みた。まず、基質ペプチドをプレバチルス菌体内で発現させるため、「分泌タグ His タグ 目的ペプチド」の遺伝子配列を組み込んだプラスミド(pNC-HisT/pNY326)を作製した。ペプチド分泌菌を作製後、収量および精製率を評価した。次に、酵素 (TPST)の発現プラスミド (pNC-HisT/pNI-His)を作製し、酵素の発現と酵素精製、活性確認を行った

代替研究手法 : 大腸菌体内でのペプチド硫酸化反応を活用した合成法確立

プレバチルスを用いて発現させた硫酸転移酵素(TPST)では全く酵素活性を得られなかったことから、代替手法 として、酵素活性が得られる分子シャペロン共発現(pGrO7)の大腸菌(Origami(DE)) を活用した、菌体内ペプチド硫酸化反応を活用した硫酸化ペプチド合成法を検討した。まず、TPST 発現大腸菌を基質ペプチドの DNA 部位を組み込んだ pET41a プラスミドにて形質転換させ、二重形質転換体を作製した。さらに、一つの発現ベクター上にて 2 種類の DNA を組み込んだ pETDuest-1 を作製し、発現誘導確認を行った。

代替研究手法 : 3 種類の遺伝子組換え酵素を発現する組換え大腸菌を活用した 1-step 硫酸化ペプチド合成法確立

大腸菌を用いた代替手法 として、菌体内でのペプチド硫酸体合成法を目指したが、成功しなかったため、代替手法 として、硫酸転移酵素(TPST)、基質ペプチド(PSGL1)、硫酸基供与体 PAPS 合成酵素(PAPSS)の 3 種類を単独で発現する大腸菌をそれぞれ培養し、組換えタンパク質を発現誘導後、大腸菌ライゼートを調製した。3 種類のライゼートを混ぜ合わせ、試験管内で酵素反応を行い、ペプチド(PSGL1)硫酸体の合成効率の最適条件と精製法を検討し

た。

研究課題 : 定量質量分析技術(MRM)による硫酸化ペプチドの定量解析法開発

四重極型質量分析計 Q-Trap5500 を用いて硫酸化ペプチドの定量解析のための条件を検討した。始めは、市販の硫酸化ペプチドであるコレシストケニンを用いて、カラム・流速・移動相・イオン化・トランジションなどの各項目を最適化し、合成できた硫酸化ペプチド(PSGL-1, C4)に関しては個別に条件を検討することで、MRM 測定に重要な感度と特異性を評価し、実サンプルでの定量解析を検討した。

4. 研究成果

研究課題 : プレバチルスを用いた硫酸化ペプチド分泌菌の作製と硫酸化ペプチド合成法確立

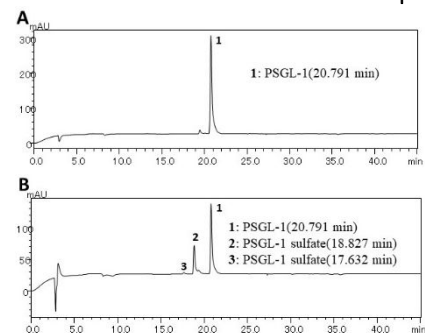
プレバチルスを用いた 3 種類の基質ペプチド(PSGL-1, C4, CCR5)の分泌発現系(pNC-HisT)を構築した。プレバチルスに形質転換したところ、CCR5 の形質転換体のみが得られた。得られた形質転換体を用いて、CCR5 ペプチドの分泌合成と精製を行った。MALDI-TOF-MS にて、精製ペプチドの質量を確認したところ、想定通りの分子量を有するペプチドを得ることが出来た。しかし、収量は 42 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ 培地となり、大腸菌 BL21 菌体を用いて作製したペプチドは 130 $\mu\text{g}/100\text{mL}$ 培地となり、大腸菌を用いた方が高い収量となった。基質ペプチドの分泌合成は基質の種類によっては形質転換体も得られないことが明らかになったことから、次に、プレバチルス菌体内での基質ペプチド発現系(pNY326)の構築を行った。PSGL-1 に関しては形質転換体を得ることが出来たが、C4 に関しては得ることが出来なかった。PSGL-1, C4, CCR5 とも大腸菌では、合成できるため、プレバチルスを用いた基質ペプチド合成の可否は配列に大きく依存することが明らかとなった。次に、pNC-His と pNY326 を用いて、TPST2 の分泌発現系と菌体内発現系構築を行った。両方の発現系で形質転換体を得ることはでき、酵素の精製にも成功したが、酵素活性を得ることが出来なかった。この結果から、プレバチルスを用いた硫酸化ペプチドおよびタンパク質の合成法確立のための前提条件である、活性型の硫酸化酵素を得ることが困難であることが明らかとなった。

代替研究手法 : 大腸菌体内でのペプチド硫酸化反応を活用した合成法確立

TPST 発現大腸菌(Origami(DE3):pGro7-pET15b-hTPST2)に基質ペプチドの DNA 部位を組み込んだ pET プラスミド(pET41a)を形質転換させ、2 重形質転換体を作製した。PSGL1 と C4 の 2 種類の基質ペプチドの 2 重形質転換体を用いて発現誘導確認を行ったところ、TPST2 酵素の発現を確認することが出来なかった。そこで、一つの発現ベクター上に 2 種類のマルチクローニングサイトを有する pETDuest-1 を使用して、2 重発現形質発現系を構築した。同様に、基質ペプチドの発現は確認できたが、TPST 酵素の発現を確認することはできなかった。IPTG 濃度や培養時間・温度などの発現誘導条件を検討したが、いずれも TPST の発現を確認することが出来ず、酵素と基質の 2 重発現菌体を用いた硫酸化プラスミドの合成法を確立することは困難であることが明らかとなった。現在も、マルチクローニングサイトの場所を変更するなど、検討を続けている。

代替研究手法 : 3 種類の遺伝子組換え酵素を発現する組換え大腸菌を活用した 1-step 硫酸化ペプチド合成法確立

硫酸転移酵素(TPST)、基質ペプチド(PSGL1)、硫酸基供与体 PAPS 合成酵素(PAPSS)の 3 種類を単独で発現する大腸菌ライゼートを用いて 1-step 硫酸化反応を検討した。この 1-step 硫酸化反応は、PAPSS が SO_4^{2-} と ATP を材料に PAPS を生み出し、その PAPS を用いて TPST が基質ペプチドに硫酸基を転移する 2 つの反応を一度に行う反応で、高価な PAPS 試薬を用いない安価な合成法である。酵素反応後は、グルタチオンセファロースゲルで GST-PSGL1 を精製し、トロンピンで GST タグを除去し、固相抽出にてペプチドのみを精製する方法である。本反応では、PSGL1 を基質ペプチドとして検討し



PSGL-1 sulfateのクロマトグラム

A: PSGL-1

B: ライゼートで硫酸化したPSGL-1

基質発現大腸菌の培地1Lあたり
1.6 mgのPSGL-1 sulfateを生成できる

図1. 合成したPSGL1硫酸体のHPLC解析

た。[³⁵S]SO₄²⁻を用いて、1-step 硫酸化反応の最適化を検討した結果、pHは6.5、Mn²⁺は5 mMで最適条件となることが明らかとなった。最適化条件で、1-step 硫酸化酵素反応を行い、基質ペプチドを精製後、HPLCにて硫酸化ペプチドの合成を確認し、合成量を計算した。その結果、1.6 mg/1 L 培地での硫酸化 PSGL1 を合成することに成功した(図 1)。次に、硫酸化ペプチドの精製法を検討するため、C18, SAX, MAX, C18-Ax, Ph, Phospholipid (TiO₂/ZrO₂), TiO₂, Amide カラムを検討した。検討には、PSGL1のほか、C4 および CCK 硫酸体を用いた。その結果、基質ペプチドの種類によって、最適なカラムは異なっていたが、C18, C18-AX, Ph, Phospholipid (TiO₂/ZrO₂)の4種類のカラムで精製できることが明らかになった。特に、担体にフェニル基が結合している Ph カラムでは全てのペプチドにおいて最も回収率が高い結果となった。また、PSGL1 に関しては、Phospholipid (TiO₂/ZrO₂) カラムが最も良い結果となり、硫酸化ペプチド特異的な精製が見込まれた。しかし、HPLCとMS解析の結果(図 2)、硫酸化ペプチド特異的な固相抽出カラムはなく、HPLC などによる更なる分画やより詳細な固相抽出の条件検討などが必要であることが明らかとなった。

研究課題 : 定量質量分析技術(MRM)による硫酸化ペプチドの定量解析法開発

市販の硫酸化ペプチドであるコレシストケニン硫酸体(CCK-S)を用いて、カラム・流速・移動相・イオン化・トランジションなどの各項目を検討した。特に、移動相溶媒は硫酸化ペプチドのイオン化に大きな影響を及ぼすため、詳細に検討した結果、positive mode、negative mode 共に 10mM 酢酸アンモニウム水溶液が最も高いピーク面積を示した。次に、CCK-S の MRM および MRM-IDA 分析に際し、重要なイオン源における DP, EP, CE, curtain gas, TEM, ISV などの条件の最適化に成功した。その結果、ISV(イオン化ボルテージ)は硫酸化されていない CCK を同様の結果となり、ISV を高く上げることによる硫酸基の脱離は小さく、標準的な 5500 程度が最適であった。トランジションリスト(親イオンと娘イオンの m/z)を作成後、標準品をもちて MRM-IDA を行った結果、positive mode、negative mode 両方の mode で分析できることが明らかになった(図 3)。

同様に、PSGL-1 と C4 の硫酸化ペプチドの MS 解析した結果、PSGL-1 は硫酸基が一つ結合した mono-sulfate だけが検出されたが、positive/negative 両方の mode で検出された。一方、C4 硫酸体は negative mode でしか検出されなかったが、硫酸基が2つ結合した di-sulfate も検出することができ(図 4)、複数の硫酸基を有する硫酸化ペプチドの解析が可能であることが明らかとなった。また、硫酸化ペプチド(PSGL-1,C4)の MRM 測定に重要な諸条件も検討し、MRM-IDA での解析が可能であることが判明した。

以上の結果をまとめると、菌体内での硫酸化ペプチドの合成は成功しなかったが、PAPS 合成酵素、TPST 酵素、基質の3種を発現する大腸菌のライゼートを用いた 1-step 硫酸化反応からの簡便な合成法と MS を用いた MRM-IDA による定性・定量解析の実行可能性を示すことができ、今後の翻訳後修飾としての硫酸化の機能解析につながる成果を得ることができた。

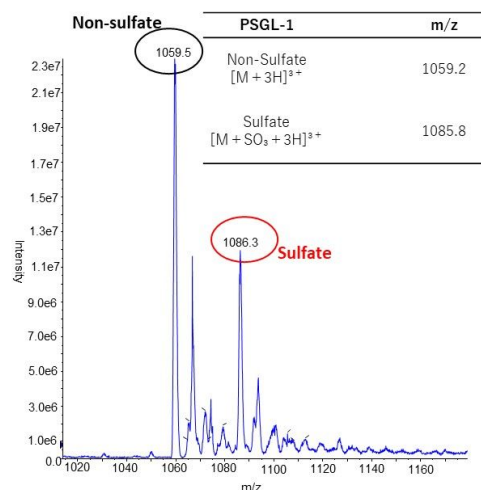


図 2. 精製した PSGL1 硫酸体の MS 解析

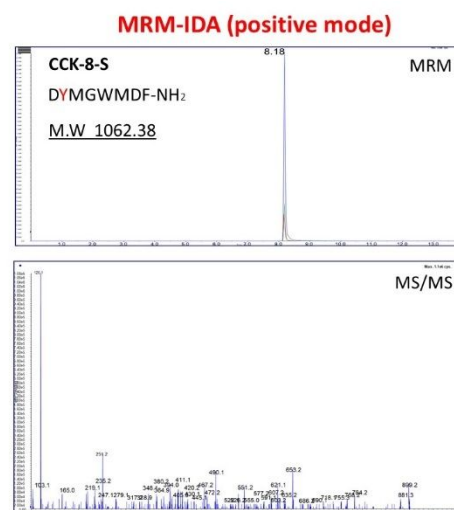


図 3. CCK8 硫酸体の MRM-IDA 解析

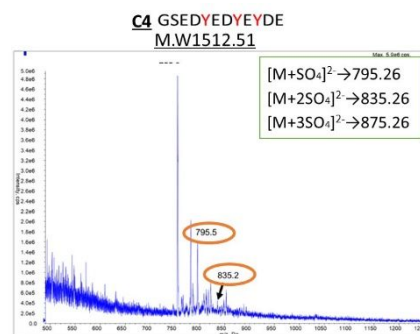


図 4. C4 硫酸体の MS 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kurogi Katsuhisa, Suiko Masahito, Sakakibara Yoichi	4. 巻 88
2. 論文標題 Evolution and multiple functions of sulfonation and cytosolic sulfotransferases across species	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 368 ~ 380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbae008	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒木勝久、出向みほ、遠藤順子、池田有輝、柳井健太郎、寺本岳大、角田佳充、水光正仁、榊原陽一
2. 発表標題 アンジオテンシン変換酵素2(ACE2)の硫酸化解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度東京大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 池田有輝、黒木勝久、榊原陽一、水光正仁、Ming-Cheh Liu
2. 発表標題 遺伝子組換え微生物を用いた硫酸化ペプチドの合成と精製法の検討
3. 学会等名 第29回日本生物工学会九州支部福岡大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 出向みほ、黒木勝久、寺本岳大、角田佳充、Ming-Cheh Liu、水光正仁、榊原陽一
2. 発表標題 アンジオテンシン変換酵素2のチロシン硫酸化に関する研究
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田 有輝, 黒木 勝久, 榊原 陽一
2. 発表標題 遺伝子組換え微生物を用いた硫酸化ペプチド合成法の検討
3. 学会等名 第75回 日本生物工学会大会 (2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池田有輝, 黒木勝久, Ming-Cheh Liu, 水光正仁, 榊原陽一
2. 発表標題 遺伝子組換え微生物を用いた硫酸化ペプチド合成法の検討
3. 学会等名 2022年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 出向みほ、黒木勝久、Ming-Cheh Liu、水光正仁、榊原陽一
2. 発表標題 新型コロナウイルス受容体アンジオテンシン変換酵素2 のチロシン硫酸 化
3. 学会等名 2022年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 出向みほ、黒木勝久、寺本岳大、角田佳充、Ming-Cheh Liu、水光正仁、榊原陽一
2. 発表標題 新型コロナウイルス受容体アンジオテンシン変換酵素2のチロシン硫酸化
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2022年大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木勝久, 奥田菜月, 上地珠代, 剣持 直哉, Ming-Cheh Liu, 榊原陽一, 水光 正仁
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ器官形成におけるタンパク質チロシン硫酸化の機能解明
3. 学会等名 第73回 日本生物工学会大会 (2021)
4. 発表年 2021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
研究分担者	榊原 陽一 (Sakakibara Yoichi) (90295197)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	
研究分担者	永濱 清子 (Kiyoko Nagahama) (10510456)	宮崎大学・農学部・特任助教 (17601)	

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
---------	---------