

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500546

研究課題名(和文) 特異的金属識別機能を備えたペプチドアレイの開発と医学応用

研究課題名(英文) Development of the peptide array which can distinguish metals, and its medical application

研究代表者

平岡 和佳子(Hiraoka, Wakako)

明治大学・理工学部・教授

研究者番号：00212168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドと金属イオンの結合は、タンパク質の自己組織化のきっかけとなる出来事の一つであり、さらには酵素反応の活性中心としても重要な機能を持っている。本研究においては、金属識別能を持つペプチドアレイの作成を目的とし、金属結合ペプチド配列を作成し、自己組織化のメカニズムと金属選択能の検出をおこなった。試料にはプリオンの金属結合部位を含むペプチドを各種用意した。分析方法としては、紫外可視吸収・蛍光分光法、円二色性偏光散乱分光法(CD)、電子スピン共鳴法(ESR)、電位差滴定法により自己組織化の判定と構造の解明を実施し、これらの配列を持つペプチドアレイの可能性とその医学的な応用性について明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Clarifying the mechanism of binding of peptides to various metals leads to development of self-organization and medical application. Binding of protein to metal is important as a function of active center of enzyme reactions and also may result in the misfolding of neurodegenerative protein. To elucidate the mechanism of metal recognition of peptide toward the development of new peptide array, we investigated the short peptides of human prion protein (PrP) that bind to divalent metal ions and the stability of these bound structure. UV, CD and ESR spectra indicated two kinds of coordination modes for the binding of peptide-Cu. By potentiometric titration, competitive binding of other divalent metal ions, such as Co, Ni, Zn, and Mn, to peptide-Cu revealed that these metal ions were substitute for Cu. Variation of a amino-acid sequence of peptide affected the quantity of each metal substituted.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料

キーワード：機能性ペプチド 金属認識 CD ESR 相互作用 自己組織化

### 1. 研究開始当初の背景

生体分子の自己組織化や分子認識は、生物の最も魅力的な機能のひとつであり、その機能解明は生物学のみならず、工学・医学に大きな進展をもたらすと考えられている。本研究では、これらの機能の中心として働くタンパク質に着目し、酵素活性中心として機能する短鎖ペプチド分子と金属が結合することで生まれる自己組織化能と、それらがもたらす生理的機能発現を実現し、医学・工学的応用へと広く発展させることを目的としている。金属を認識するペプチドは、結合による自己組織化をもたらす、それらを利用したペプチドアレイの開発は、工学的応用や各種神経疾患の疾病モデルとしても有用である。またペプチドアレイによる生理活性機能の発現は、微量検出やバイオリアクター用のツールとして新たな医療応用技術の作出につながるため、機能性ペプチドの可能性を広げるものとしてその開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

金属を特異的に認識するペプチドアレイの開発のため、金属とペプチドとの自己組織化のメカニズムの解明を試み、ペプチドによる、金属の識別性の解明と検出を試みた。

次にこの自己組織化ペプチドを用い、疾患のモデル化を試みた。タンパク変性が原因とされる神経変性性疾患の治療薬物のスクリーニングには、full-length のタンパク質に比べ、ペプチド鎖を利用することで、コストも少なく、簡便な利用が可能で、コストも少ない治療薬物の開発に寄与できる。

さらに金属ペプチドの生体機能発現として、金属ペプチドと各種レドックス関連分子との反応性を調査することで、レドックス調整因子としての可能性を検討した。

### 3. 研究の方法

**ペプチド鎖のデザイン：**金属と結合するペプチドのデザイン、および酵素活性部位データベースよりペプチド鎖を抽出した。ペプチド構造やタンパク質の生理的な構造変化の解析のため、一部には、部位特異的 ESR スピンラベルを導入した。ラベル剤としてマレイミド、M TSSL などをペプチド内に導入し、それらの分子内配向等を CHARMM 19 force field エネルギー最小化計算法等で決定した。

**病的自己組織化ペプチドのコントロール・および疾患モデル化：**アミロイド・プリオン等の金属依存性ペプチド自己組織化モデルを作成し、自己組織化の程度、分子機構、構造について紫外可視吸収・蛍光分光法、円二色性偏光散乱分光法(CD)、電子スピン共鳴法(ESR)により分析を行った。あわせて、電位差滴定法による自己組織化の判定の可能性について検討を行った。

**生理的自己組織化ペプチドの機能発現：**酵素活性部位ペプチド金属複合体を作成

し、酸化還元電位、レドックス機能について、電位差測定法、ESR スピントラッピング法による分析方法を検討した。

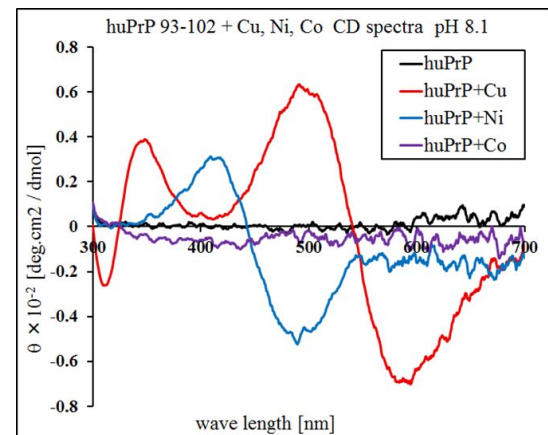
### 4. 研究成果

**ペプチド鎖のデザインと作成：**ヒトプリオン huPrP のアミノ酸配列の中からオクタリピート領域(PHGGGWGQ)、H<sup>96</sup>またはH<sup>111</sup>を含んだ配列のペプチド断片を各種用意した。本研究で扱うペプチドの合成はライフテクノロジーズジャパンに委託し、純度は全て 80%以上とした。

|                 | G <sup>95</sup> | G <sup>95</sup> | T <sup>96</sup> | H <sup>96</sup> | S | Q | W | N | K | P | S | K <sup>104</sup> | P <sup>105</sup> | K | T | N | M | K <sup>111</sup> | H | M | A | G <sup>114</sup> |   |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|------------------|------------------|---|---|---|---|------------------|---|---|---|------------------|---|
| huPrP 93-102    | G               | G               | T               | H               | S | Q | W | N | K | P |   |                  |                  |   |   |   |   |                  |   |   |   |                  |   |
| huPrP 95-104    |                 |                 | T               | H               | S | Q | W | N | K | P | S | K                |                  |   |   |   |   |                  |   |   |   |                  |   |
| huPrP 105-114   |                 |                 |                 |                 |   |   |   |   |   |   |   |                  |                  |   | P | K | T | N                | M | K | H | M                | A |
| huPrP 95-102    |                 |                 | T               | H               | S | Q | W | N | K | P |   |                  |                  |   |   |   |   |                  |   |   |   |                  |   |
| huPrP G93A/G94A | A               | A               | T               | H               | S | Q | W | N | K | P |   |                  |                  |   |   |   |   |                  |   |   |   |                  |   |

### 二価金属イオンとヒトプリオンペプチドとの結合性：

実験にはペプチド試料としてオクタリピート、huPrP 93-102, huPrP 95-104, huPrP 105-114 を使用した。濃度 500uM の各ペプチドに CuSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub> をそれぞれ 1 モル当量になるように加え、50 mM HEPES pH 8.1 中における吸光スペクトルおよび CD スペクトルを測定した。



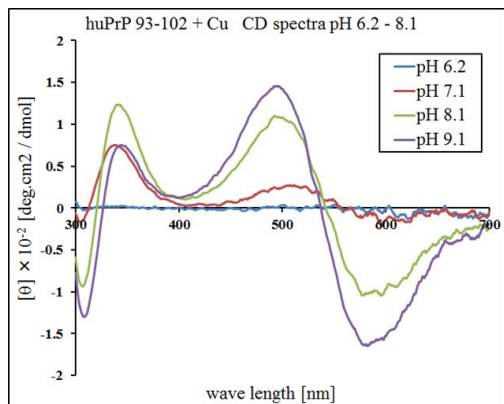
各ペプチド CD スペクトルの可視領域において金属結合による特徴的な吸収が得られた。huPrP 93-102 では、Cu<sup>2+</sup>が結合することによって 350 nm と 500 nm 付近に正のバンド、600 nm 付近に負の吸収が確認された。これらは、スペクトルのピークの特徴から金属錯体形成による d-d 遷移によって生じたものであると考えられる。また、huPrP 93-102 では Ni<sup>2+</sup>との結合によって 400 nm に負のピーク、500 nm に正のピークを持つスペクトルが得られた。huPrP 95-104 では、Cu<sup>2+</sup>の結合によって 400 nm に負のピークが、600 nm に正のピークを持つ CD スペクトルが得られた。同様に huPrP 105-114 は Cu<sup>2+</sup>との結合でのみ特徴的なスペクトルが現れた。huPrP 93-102 と huPrP 95-104 ではアミノ酸配列の 2 残基の有無により測定結果に大きな違いが生じた。また、各ペプチドによ

って全く異なる CD スペクトルが得られたことから、それぞれが異なる形状の錯体を形成していることが示された。

Cu<sup>2+</sup>以外の金属イオンとの反応では、特徴的な CD スペクトルを得ることはできなかった。そこで、Cu<sup>2+</sup>を結合させたペプチドに他の二価金属イオン Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>を競合結合させ Cu<sup>2+</sup>結合によって現れる CD スペクトルの変化を調べたところ、各金属イオンが Cu<sup>2+</sup>と置換することによってペプチドに結合することが確認された。この置換の程度は、金属イオンの種類とペプチド配列の違いによって、大きく変化したことから、金属の選択結合性を評価することに成功した。

#### pH 変化によるペプチドの構造変化：

オクタリピート, huPrP 93-102, huPrP 95-104, huPrP 105-114, 500uM の各ペプチドに CuSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub> をそれぞれ 1 モル当量加え, 50 mM HEPES, pH 6.1 ~ 8.1 における可視吸光スペクトルおよび CD スペクトルを測定した。



各ペプチドにおいて pH の変化に伴う CD スペクトルおよび可視吸光スペクトルの変化が確認された。huPrP 93-102 と Cu<sup>2+</sup>の結合による CD 吸収は pH 6.2 でほぼ消失した。また, 500 nm と 600 nm のピークは pH 9.1 で最大であった。huPrP 105-114 では, pH の変化に伴って huPrP 105-114 と Cu<sup>2+</sup>の錯体状態が変化したことが認められた。

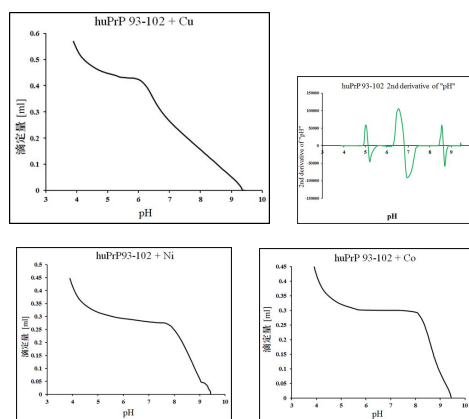
これらのことから, pH の変化はペプチドと金属イオンとの親和性に影響を与えることが実証された。またペプチドの配列によって親和性と共に関与する錯体の形状も変化することが確認された。

**電位差滴定実験によるペプチド金属自己組織化の検出：** pH を変化させることによる電気伝導度の変化を調べることでペプチドと金属イオンの結合状態の検出を試みるために, ガラス電極法を用い電位差滴定実験によって Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>とヒトプリオンペプチドの結合性を調べた。

huPrP 93-102 に CuSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub> を加えたことによって, 滴定曲線に変化が生じた。金属を含まない試料では, pH 6.8 と pH 5.1 付近に一次微分のピークが確認できる。これはヒスチジンのイミダゾール基の H<sup>+</sup>放

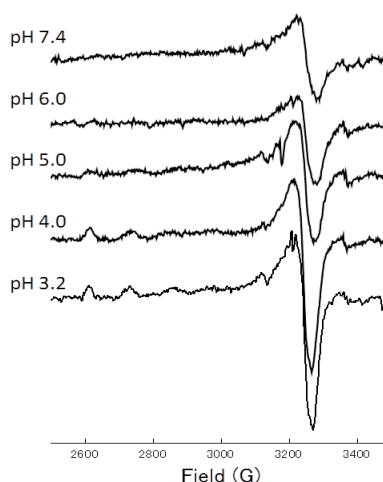
出 (pK<sub>a</sub> = 6.04) によるものであると考えられる。また, pH 8.7 付近にあるピークはアミノ基の H<sup>+</sup>放出が影響していると考えられる。一方, 含金属ペプチドは, pH 9.0 付近に小さなピークを持っているが, pH 5 - pH 8 の範囲におけるピークは 1 つしか確認できなかった。これはイミダゾール基の H<sup>+</sup>放出が十分に起きないことに起因すると推定される。このことから, huPrP 93-102 と金属イオンの結合においてヒスチジンのイミダゾール基の一部が配位子となった可能性が示唆された。以上の結果より, 電位差滴定法を用いることで, ペプチドと金属との結合を推定できる可能性が示された。

#### プリオン銅結合錯体における構造の解明

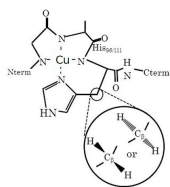


スピンラベル剤である MTSSL および, マレイミドを各ペプチドに結合させ, そののち HPLC による精製に成功した。今後, これらのラベル化ペプチドを用い, 各種金属との反応による構造変化を検討していく予定である。

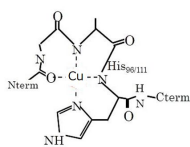
さらに, 上記 huPrP(93-114) + Cu<sup>2+</sup>錯体における ESR スペクトルの pH 依存性を確認した。この結果から, この構造スペクトルは, 報告されている銅錯体の 1 - 3 までの成分を示す可能性があることが明らかとなった。



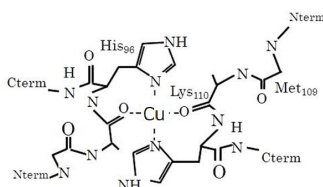
ペプチド銅イオン錯体の ESR スペクトル pH 依存性



Component 1



Component 2



Component 3

予想されるペプチド銅イオン錯体の構造

### その他、現在検討中の研究

ペプチド金属錯体における生理活性機能の導出については、未だ成功に至っていない。酸化還元電位、レドックス機能について、現在、電位差測定法、ESR スピントラッピング法による検出方法の同定を行っており、今後研究を継続していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4件)

1. Risa Fuji and Wakako Hiraoka. Antineoplastic effect of MHz ultrasound to leukemia cells, Proceedings of Symposium on Ultrasonic Electronics, Vol. 34 (2013) pp.351-352.
2. Wakako Hiraoka and Aska Kato. Effect of the interaction between IP6 and ROS on cell proliferation and cell differentiation. *Free Radical Biology & Medicine*, 53, supplement 2, S148, (2012).
3. Wakako Hiraoka, Hiroyuki Kato and Aska Kato. Crucial role of reactive oxygen intermediates in 1- $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and phorbol 12-myristate 13-acetate-induced monocytic differentiation of myeloid leukemia PLB-985 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 53, supplement 1, S164 (2012).
4. Asuka Kato and Wakako Hiraoka. Inositol hexaphosphate and its apatite cements-induced ROS generation and their biological effects on human cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, S145, (2011).

〔学会発表〕(計 7件)

1. 八木正浩、岩間和也、平岡和佳子、オクタリピートプリオンペプチドと金属イオンの競合結合、第3回日本生物物理学会関東支部会、中野区、2014/3/6 - 2014/3/7.
2. 八木正浩、岩間和也、恩田治人、平岡

和佳子、オクタリピート領域を持つプリオンペプチドにおける金属イオンとの競合結合性、京都、第51回日本生物物理学会総会 2013/9/25 - 2014/9/27.

3. 岩間和也、今木貴仁、八木正浩、平岡和佳子、プリオンペプチドの金属配位モード、京都、第51回日本生物物理学会総会 2013/9/25 - 2013/9/27.

4. 岩間和也、今木貴仁、八木正浩、平岡和佳子、プリオンペプチドの金属配位モード、京都、第51回日本生物物理学会総会 2013/9/25 - 2013/9/27.

5. 今木貴仁、岩間和也、平岡和佳子、プリオンペプチドの金属配位モード、京都、第51回日本生物物理学会総会 2013/9/25 - 2013/9/27.

6. 岩間和也、八木正浩、恩田治人、平岡和佳子 Conformational mode in metal binding human prion protein. SEST 2013, 大宮、2013/10/24-10/26.

7. 岩間和也、今木貴仁、八木正浩、平岡和佳子、Metal binding induces conformational change in prion peptide. SEST 2012, 札幌、2012/11/1-11/3.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

平岡和佳子 (HIRAOKA WAKAKO)

明治大学・大学院基礎理工学研究科・教授  
研究者番号：00212168