

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510310

研究課題名(和文)ペプチドホルモン前駆体蛋白質を標的とした分子進化と生理活性成熟化機構の解明

研究課題名(英文)Relationship between precursor folding and molecular evolution of a peptide hormone

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、分子進化において、ペプチドホルモンの生理活性構造が如何に保たれ、高い生理活性を獲得したのかを前駆体の立体構造形成との関連から開明することを目的とし、プロウログアニリンあるいはその他の種々の前駆体について、立体構造形成反応を調査した。その結果、i)成熟ペプチドホルモンの生理活性は前駆体の立体構造形成反応レベルで品質管理が行われていること、ii)分子進化を促進する立体構造部位が存在すること、iii)分子進化を抑制する立体構造部位が存在すること、iv)天然型の立体構造と異なる反応中間体を經由することにより、より高度な品質管理機構を発展させたことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To investigate how peptide hormones maintain/develop their biologically active conformation during molecular evolution, the folding of precursor proteins including prouroguanlylin were estimated in vitro. Our results indicated that i)the stability of the biologically active conformation of the mature region is strongly related to the correct folding of their precursor proteins, ii)precursor protein possesses a region to accelerate molecular evolution, iii)precursor protein possesses a region to inhibit molecular evolution, iv)correct folding of precursor protein requires mis-folded molecular species to establish the correct conformation of prouroguanlylin

研究分野：蛋白質・ペプチド科学

キーワード：シャペロン ジスルフィド結合 フォールディング ペプチドホルモン 前駆体 ウログアニリン

## 1. 研究開始当初の背景

一般に、天然に存在する生理活性ペプチドは、その立体構造と活性の相関において最も強い活性を示すアミノ酸配列を有している。これは、進化の過程において、生体の様々な思考錯誤の結果得られたものと考えられる。しかしながら、実際に、どのようにしてそのアミノ酸配列の取捨選択が行われ、活性発現に必須な立体構造が形成されたのかについては殆ど分かっていない。

我々は、本研究に先立ち、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結晶構造解析明らかにしてきた。また、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な変異体を作成し、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、i)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こと(進化促進因子)、ii)分子進化の抑制部位が存在すること(進化抑制因子)を見出した。そこで、これらの事象について、更に詳細に調べ、その機構および分子進化における意義を明らかにすることにした。

## 2. 研究の目的

本申請課題での研究目的は、前述の重要事項 i, ii について詳細に調べ、その機構および分子進化における意義を明らかにすることである。また、その機構に基づき、進化抑制因子の除去および分子進化を更に発展させた生理活性ペプチドのドラッグデザインを目指す。

多くのペプチドホルモンはプレプロホルモンとして発現し、プロセッシングにより生理活性ペプチドになる。一般に、ペプチドホルモンは、水溶液中では様々な立体構造をとり、受容体との相互作用の場において、決まった生理活性構造を取ると考えられている。しかし、実際には、生理活性ペプチドの立体構造は前駆体蛋白質の段階で形成される必要がある、少なくとも、それを含む前駆体蛋白質は「水に溶ける」必要がある。従って、その溶解性に影響し、分子を不安定化、即ち、不溶化させるような遺伝子変異は進化の過程で除外されたと推測できる。このことから、我々は、前駆体蛋白質の立体構造形成あるいは全分子構造の安定性・水溶性は、進化の過程における成熟ペプチドの生理活性成熟化と何らかの相関を有すると考えている。そこで、実際に、前駆体であるプロウログアニリンの全領域における変異体の立体構造形成を検討した結果、生理活性部位(機能部位)である-Asn-Val-Ala-の Asn 残基に Gly 置換を施したときのみ、正しい立体構造が形成されないことを明らかにした。結晶構造解析の結果、また、この Asn 残基は生理活性構造の形成・保持に重要なアミノ酸残基であるこ

とが明らかになった。このことから、生体は、生理活性構造を壊すような変異は、前駆体蛋白質の立体構造(形成)を不安定化することで、分子進化を制御したと推測している。そこで、我々は、この生理活性構造を形成する-Asn-Val-Ala-配列に着目し、その部位に様々な変異を導入した前駆体蛋白質の立体構造形成を評価し、同時に、それら変異体の結晶構造解析を行い、進化の過程において、分子の高機能化を促進した機構について明らかにする。

また、その成熟ペプチドの生理活性構造に引き続く-Thr-Gly-配列は分子内シャペロンとして機能するプロ領域と直接相互作用する部位である。この部位は、前駆体中では $\alpha$ -シート構造を形成しているが、成熟ペプチドでは II 型の $\alpha$ -ターンを形成している。この立体構造変化は、分子構造として劇的な変化である。特に、II 型の $\alpha$ -ターンは、Gly 残基だけが許される立体構造であることから、我々は、この Gly 残基による II 型の $\beta$ -ターン構造の保持が、ウログアニリンの分子進化を逆に抑制したものと推測している。即ち、ウログアニリンが、他のペプチドホルモンのように、独自で立体構造を形成できず、プロ領域の分子内シャペロン機能を必要としたのは、Gly 残基によって進化が抑制されたためと考える。そこで、本申請課題によって、この Gly 残基を II 型の $\beta$ -ターン構造を安定化できる非天然型のアミノ酸残基に変異させ、進化の抑制因子を除去した場合について検討する。それにより、分子進化の抑制因子の存在意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1) 進化促進部位の機能評価

X 線結晶構造解析の結果、成熟ホルモンの生理活性部位(-Asn-Val-Ala-)は $\beta$ -ターン構造を形成しており、Asn 残基の主鎖および側鎖カルボニル基により安定化されている。また、その部位の Gly 残基の変異は前駆体の立体構造形成を著しく阻害する。即ち、分子進化において、Asn 残基が生理活性構造の保持に必須であることを意味している。そこで、分子進化の生理活性部位の活性促進効果を評価するため、Asn 残基を様々なアミノ酸残基に変異した前駆体蛋白質を大腸菌遺伝子組換え法により調製し、その立体構造形成反応を調べた。

### 2) 分子進化抑制因子の機能評価

X 線結晶構造解析の結果、成熟ホルモンの C 末端領域の-Thr-Gly-はプロ領域の N 末端領域と相互作用し、 $\beta$ -シート構造を形成していることが分かっている。その部位は、生理活性ペプチドであるウログアニリンでは II 型の $\beta$ -ターン構造であり、それが生理活性構造に必要な。しかし、通常のアミノ酸残基では II 型の $\beta$ -ターン構造をとることができないために Gly が保存され、結果として分子進化が抑制されている。そこで、その部位に、

II 型の $\beta$ -ターン構造を形成できる種々の D-アミノ酸を導入した成熟ホルモンあるいは前駆体蛋白質を調製し、それらの立体構造形成及び構造安定性を評価した。非天然型ペプチドについては、化学合成により調製し、前駆体蛋白質については native chemical ligation 法により調製した。

### 3) 前駆体蛋白質の立体構造解析

本研究は、立体構造に基づく生理活性構造の分子進化を評価するものである。そこで、進化促進・制御部位である Asn 残基を側鎖官能基を持たない Ala 残基に変異した前駆体蛋白質の構造解析を行い、前駆体の立体構造レベルで Asn 残基の役割を明らかにすることにした。得られた種々の変異体について、NMR 法による立体構造解析を行った。

### 4) その他のペプチドホルモン前駆体蛋白質の生理活性構造の構築と分子進化

本研究で得られる概念を更に発展させ、様々なペプチドホルモンの分子進化を加速した人工ペプチドをデザインするためには、様々なペプチドホルモン前駆体に対する研究が必須である。我々は、数年来、様々なペプチドホルモン前駆体について、その発現系および立体構造解析を行ってきた。既に、ナトリウム利尿ペプチドを代表として、アルツハイマー病関連の $\beta$ -アミロイド前駆体など、数種類の前駆体蛋白質の発現系および大量精製系の構築に成功していた。そこで、プロウログアニリン以外のペプチドホルモン前駆体蛋白質についても、これまでの情報を考慮し、様々な変異体を作成して、X線小角散乱法による解析あるいは NMR 解析を行った。

## 4. 研究成果

我々は、これまでに、ペプチドホルモン前駆体の X 線結晶構造解析および部位特異的変異体の立体構造形成反応の詳細な分析から、ペプチドホルモン前駆体蛋白質の立体構造形成が、成熟体であるペプチドホルモンの局所的な生理活性部位の立体構造の安定化と直接関係することを明らかにした。これは、分子進化にとって重要な意味を持つ。そこで、本研究は、分子進化において、ペプチドホルモンの生理活性構造が如何に保たれ、高い生理活性を獲得したのかを明らかにすることを目的として行った。

### 1) 進化促進部位の機能評価

ウログアニリンの生理活性部位の熱力学的安定性と前駆体タンパク質の立体構造形成との相関を調べるため、生理活性に直さず関与しない部位への変異を施した様々な前駆体を調製し、それらの *in vitro* での立体構造及び構造形成反応を調査した。その結果、生理活性に直接影響しない部位への変異は前駆体の立体構造形成にほとんど影響しないことが分かった。また、これら変異体をヒト細胞を用いて細胞内立体構造形成を調べた場合も同様な結果となり、我々の提唱する仮説を支持するものであった。

即ち、分子進化に於いて、生理活性に直接影響しない部位への変異は立体構造形成に対して活性部位におけるそれよりも許容されることが分かった。しかし、生理活性(部位)に直接影響する変異は、前駆体の立体構造形成に顕著に影響することが分かった。このことは、最終的な生理活性構造を有する 3 次構造そのものだけでなく、その立体構造形成そのものにおいて、分子進化上、品質管理機構が働いていること示すものと考えられる。

### 2) 分子進化抑制因子の機能評価

化学ライゲーション法をにより遺伝子組換え体と化学合成ペプチドを融合することにより、前駆体中に D-アミノ酸を組み込んだタンパク質を得ることに成功した。そこで、様々な D-アミノ酸を分子内に導入して、それらの立体構造形成および遊離する成熟体の立体構造を評価した結果、それらは正しい立体構造形成を促進すること、即ち、D-アミノ酸置換により生理活性構造をより rigid なものにするに成功した。これは、前駆体に含まれた進化抑制因子の存在を証明するものであり、今後、なぜそのような気候が存在するのかを明らかにする必要がある。

### 3) 前駆体蛋白質の立体構造解析

進化促進・制御部位である Asn 残基を側鎖官能基を持たない Ala 残基に変異した前駆体蛋白質の NMR 法による立体構造解析および動力学による構造計算を行った。その結果、前駆体蛋白質中で、成熟体領域の立体構造はプロセッシング後よりも更に生理活性が強い立体構造を形成していることが分かった。これは、局部構造の部分的な熱力学的安定化と全構造の熱力学安定化との相関によって引き起こされるものであり、我々の提唱した説を支持する結果である。

### 4) その他のペプチドホルモン前駆体蛋白質の生理活性構造の構築と分子進化

様々なペプチドホルモンの前駆体を調製し、それらの立体構造形成を評価した結果、特に、ANP と POMC について興味深い知見が得られた。特に、POMC に関しては、これまで機能が不明であった joining ペプチドの生理活性を初めて見出した。また、pro-ANP が天然編成タンパク質として存在し、それ自身、他のタンパク質等との相互作用により、まったく異なる立体構造に安定化されることを見出した。これらの事項についても、更なる発展が期待される結果となった。

以上のように、本研究課題における当初の目的は、ほとんど達成することができた。さらに、本研究過程でえられた天然型とは異なる立体構造を持つ中間体において、局所的な 2 次構造の安定化が起こること、それが次の段階である、天然型への立体構造形成に必須であり、引き続いて 2 次構造変化を伴う天然型への構造移動が起きることを見出した。即ち、前駆体タンパク質は、その立体構造形成過程において、わざと別の立体構造を形成し、その後、2 次構造変化を伴って正しい立体構

造に移行している可能性を見出した。これは、タンパク質・ペプチドの生理活性を保つ上で、分子進化上、理にかなった高度な品質管理機構の存在を示唆するものである。本発見に基づき、現在、科学研究費の支援のもと、更なる研究の発展を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 23 件)

Inhibition of the functional interplay between ER oxidoreductin-1 $\alpha$  (Ero1 $\alpha$ ) and protein disulfide isomerase (PDI) by the endocrine disruptor bisphenol A Okumura, M., Hidaka, Y.(14 名 7 番目), *J. Biol. Chem.*, 289, 27004-27018 (2014) 査読有

Overview of the Regulation of Disulfide Bond Formation in Peptide and Protein Folding. Yuji Hidaka, *Current Protocols in Protein Science*, 76, 28.6.1-28.6.6 (2014) 査読有

Chemical Methods and Approaches to the Regioselective Formation of Multiple Disulfide Bond. Shimamoto, S., Hidaka, Y. (論文責任者, 4 名 4 番目), *Current Protocols in Protein Science*, 76, 28.8.1-28.8.28 (2014) 査読有

Disulfide-mediated Peptide and Protein Folding. Okumura, M., Shimamoto, S., Hidaka Y., *Current Protocols in Protein Science*, 76, 28.7.1-28.7.13 (2014) 査読有

Folding of Peptides and Proteins: Role of Disulfide Bonds, Recent Developments. Hidaka, Y. and Shimamoto, S., *BioMolecular Concepts*, 4(6), 597-604 (2013) 査読有

Effects of positively charged redox molecules on disulfide-coupled protein folding Okumura, M., Hidaka, Y.(7 名 7 番目), *FEBS Lett.*, 586(21), 3926-3930 (2012) 査読有

In vitro regulatory effect of epididymal serpin CRES on protease activity of Proprotein Convertase PC4/PCSK4. Mishra, P., Hidaka, Y. (6 名 4 番目), *Current Molecular Medicine*, 12, 1050-1067 (2012) 査読有

Disulfide-coupled protein folding: Looking back, Looking forward. Hidaka, Y., *FEBS J.*, 279(13), 2261-2261 (2012) 査読有

Chemical Method for investigating disulfide-coupled peptide and protein folding. Okumura, M., Shimamoto, S., Hidaka, Y., *FEBS J.*, 279(13), 2283-2295 (2012) 査読有

Stem-forming regions that are essential for the amyloidogenesis of prion proteins. Saiki, M., Hidaka, Y., Nara, M., Morii, H. *Biochemistry*, 51(8), 1566-1576 (2012) 査読有

他、査読有の論文 13 報

〔学会発表〕(計 64 件)

Yuji Hidaka, Folding analysis of major folding intermediate, mis-bridged disulfide isomer of prouroguanilin, 平成 27 年 11 月 16 から 18 日、第 52 回ペプチド討論会 (平塚中央公民館、

神奈川県、平塚市)

Yuji Hidaka,  $\alpha,\beta$ -structural shift of the mature region in a precursor protein regulated disulfide selectivity under kinetic control, 平成 27 年 11 月 16 から 18 日、第 52 回ペプチド討論会 (平塚中央公民館、神奈川県、平塚市)

Yuji Hidaka, Chemical regulation of disulfide-coupled folding of disulfide rich peptide, hepcidin and its precursor protein, 平成 27 年 2 月 7 から 12 日、the 59th Biophysical society annual meeting (Baltimore, USA)

Yuji Hidaka, Trapping mechanism of Bioactive conformation by intra-molecular chaperone, 第 51 回ペプチド討論会、平成 26 年 10 月 22 から 24 日 (徳島大学、徳島県、徳島市)

日高雄二, 分子内シャペロンによる生理活性構造のトラッピング機構、平成 26 年 6 月 25 から 27 日、第 14 回日本タンパク質科学会年会 (ワークピア横浜、神奈川県、横浜市)

Yuji Hidaka, Regulation of disulfide-coupled folding of de novo designed precursor protein, 平成 26 年 2 月 15 から 19 日、the 58th Biophysical society annual meeting (San Francisco, USA)

Yuji Hidaka, Regulation of disulfide-coupled folding of de novo designed precursor protein, 平成 26 年 2 月 15 から 19 日、the 58th Biophysical society annual meeting (San Francisco, USA)

Yuji Hidaka, Conformational change of ACTH/melanocortin precursor protein, 平成 26 年 2 月 15 から 19 日、the 58th Biophysical society annual meeting (San Francisco, USA)

Yuji Hidaka, pH-dependent conformational change of hepcidin and its precursor protein, pro-hepcidin, 平成 26 年 2 月 15 から 19 日、the 58th Biophysical society annual meeting (San Francisco, USA)

Yuji Hidaka, Regulation of disulfide-coupled protein folding by a positively charged redox agent, 平成 25 年 11 月 6 から 9 日、the 50th Japanese Peptide Symposium (ホテル阪急エキスポ、大阪府、吹田市)

Yuji Hidaka, pH-dependent conformational change of hepcidin and its precursor protein, 平成 25 年 11 月 6 から 9 日、the 50th Japanese Peptide Symposium (ホテル阪急エキスポ、大阪府、吹田市)

Yuji Hidaka, Regulation of disulfide-coupled folding of de novo designed precursor protein, 平成 25 年 11 月 6 から 9 日、the 50th Japanese Peptide Symposium (ホテル阪急エキスポ、大阪府、吹田市)

日高雄二(招待講演) 正電荷を有する酸化還元試薬によるジスルフィド結合含有タンパク質の立体構造形成反応の制御、平成 25 年 6 月 12 から 14 日、第 13 回日本タンパク質科学会年会 (とりぎん文化会館、鳥取県、鳥取市)

日高雄二, 分子内シャペロンの生理活性ペ

ペプチドのデザインへの応用と立体構造制御機構の解明、平成 25 年 6 月 12 から 14 日、第 13 回日本タンパク質科学会年会（とりぎん文化会館、鳥取県、鳥取市）

日高雄二、アミロイド前駆体タンパク質の可溶性細胞外領域 sAPP $\alpha$  の pH 依存的構造変化、平成 25 年 6 月 12 から 14 日、第 13 回日本タンパク質科学会年会（とりぎん文化会館、鳥取県、鳥取市）

日高雄二、分子内シャペロン制御によるペプチドの立体構造形成、平成 24 年 11 月 7 から 9 日、第 49 回ペプチド討論会（かごしま県民交流センター、鹿児島県、鹿児島市）

日高雄二、プロオピオメラノコルチンの構造解析、平成 24 年 11 月 7 から 9 日、第 49 回ペプチド討論会（かごしま県民交流センター、鹿児島県、鹿児島市）

日高雄二、アミロイド前駆体タンパク質の可溶性細胞外領域 sAPP $\beta$  の pH 依存的構造変化、平成 24 年 11 月 7 から 9 日、第 49 回ペプチド討論会（かごしま県民交流センター、鹿児島県、鹿児島市）

日高雄二、プロ領域によるジスルフィド結合含有ペプチドの立体構造形成制御機構、平成 24 年 6 月 20 から 22 日、第 12 回日本タンパク質科学会年会（名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市）

日高雄二、アミロイド前駆体タンパク質の可溶性細胞外領域 sAPP $\beta$  の pH 依存的構造変化、平成 24 年 6 月 20 から 22 日、第 12 回日本タンパク質科学会年会（名古屋国際会議場、愛知県、名古屋市）

他 学会発表 44 件

〔図書〕(計 1 件)

奥村正樹、日高雄二（メディカルドゥ）遺伝子医学 MOOK(2012) 307

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 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

なし

### (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

島本 茂 (SHIMAMOTO Shigeru)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号：00610487