

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651242

研究課題名 (和文) 脂質膜を反応場とするジスルフィドリッチペプチド合成法の確立

研究課題名 (英文) Folding of cysteine-rich peptides on phospholipid membrane

研究代表者

原 利明 (HARA, Toshiaki)

大阪大学・理学 (系) 研究科 (研究院) ・特任講師 (常勤)

研究者番号：90528233

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要 (和文) : リン脂質膜を反応の場として用い、ジスルフィド結合を豊富に含むペプチドの酸化的フォールディング反応の開発とその解析に取り組んだ。まず、化学合成法によりシステインリッチペプチドを調製し、様々なリン脂質組成の脂質膜を用い反応を試みた。グリセロリン脂質が良好な結果を与えた一方、スフィンゴミエリンなどアミド結合を含む脂質では低収率であった。また、逆相HPLCのペプチドの保持時間から反応結果の予測が可能であることを見いだした。次に、ジスルフィド結合の形成過程を酵素消化と質量分析により解析し、従来の溶相反応とは異なる中間体を検出し、脂質膜上での反応ではユニークな反応経路を経ることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we developed a new protocol for the oxidative folding reaction of cysteine-rich peptides in a phospholipid membrane: "membrane induced folding reaction". We investigated the effect of the phospholipid composition and pH of the reaction on the folding yield and purity of cysteine-knot peptides including beta defensins, conotoxins, and other peptides. The best yield was obtained in the presence of glycerophospholipid membrane with negative charge without adding any redox reagents. The phospholipid membranes for the folding reaction can be a general method for peptide and protein engineering.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生体分子科学

キーワード：脂質膜 ペプチド化学

1. 研究開始当初の背景

ジスルフィド結合を豊富に含むペプチドは、その構造と活性の多様性から、新規医薬品のシーズや基礎研究のツールとして注目され、その化学合成や生理機能の解明に大きな努力が払われている。近年の分子生物学とペプチド化学合成法の進歩により、システインを多く含む還元型タンパク質・ペプチドの調製は可能となっている。

しかし、その還元型を正しいジスルフィド結合を持った酸化型へフォールディングさせる条件を見いだすことは容易ではなく、研究・開発の大きなボトルネックとなっている。システインを多く含む還元型タンパク質・ペプチドのフォールディング反応条件の最適化には様々な因子(緩衝溶液や塩の種類、pH、塩濃度、酸化還元電位を調製する添加剤、溶存酸素、有機溶媒の有無、温度、ペプチドの濃度など)を考慮し、それらを厳密に制御する必要がある。この条件設定は依然として経験に基づく時間のかかるスクリーニングに頼っており、タンパク質結晶化の条件検討とよく似ている。その結果、アミノ酸配列に高い相同性を持つペプチド同士であっても全く異なったフォールディング条件が報告され、各論のみで一般論を欠いているのが現状である。

したがって、構造機能の研究に必要なサンプルの簡便な調製方法を確立することは重要な課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、脂質膜を反応場として用い、ジスルフィド結合を豊富に含むペプチドの新たな原理に基づくフォールディング反応の開発に取り組む。脂質膜の構造または物性とフォールディング反応の相関関係が明らかになれば、ペプチドの物性に基づき、反応に適切な脂質膜の選択が可能となるだろう。反応条件の選択に役立つ一般則を見だし、スクリーニングによらないフォールディング反応の指針の確立を目指した。

従来技術では合成が困難であった複雑な架橋構造および修飾を有するジスルフィドリッチペプチドを、高純度、高収率、簡易操作で得ることを可能とする、実用的な調製方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

まず、化学合成法により還元型のジスルフィドリッチペプチドとしてコノトキシン類とヒトディフェンシン類の計8種を調製した。そして、反応収率を評価基準として、酸化的フォールディング反応における各種組成からなる脂質膜の効果を評価した。反応溶液のpH、グルタチオンなど酸化還元剤の効果もあわせて検討した。フォールディング反応に影響を与える膜構造とペプチド構造の

相関関係について考察をおこなった。

次に、反応中間体を単離し、酵素消化と質量分析法により脂質膜上での反応経路の解析に取り組んだ。そして、得られた知見に基づき複雑なジスルフィドリッチペプチドの合成を実施し、開発した反応の有効性を検証した。

4. 研究成果

上記実験により、以下の4点を明らかにした。

- (1) 様々なリン脂質組成の脂質膜をもちい酸化反応を試みた結果、頭部に負電荷を持つグリセロリン脂質を含む膜が良好な結果を与えた。一方、スフィンゴミエリンなどアミド結合を含む脂質および中性脂質膜では低収率であった。膜の多重性、直径による効果は見られなかった。また、大腸菌由来の抽出脂質でもフォールディング反応は進行し、生体内における脂質誘導性の反応の存在を示唆するデータをして興味深い結果を得た。
- (2) グルタチオン、システインなどからなる酸化還元剤を用いずに反応をおこなうことができた。反応条件の選択の幅が広がり、コストの削減にも繋がると考えられる。
- (3) リン脂質膜の添加により収率の向上が見られるペプチドは、フォールディングにより逆相 HPLC の保持時間が大きくなる傾向にあった。このことは、逆相 HPLC の保持時間から反応結果の予測が可能であることを意味している。実用面で有用な指標を見いだしたと考えている。
- (4) ジスルフィド結合の形成過程を酵素消化と質量分析により解析し、溶液中のフォールディング反応とは異なる中間体を検出し、脂質膜上での反応ではユニークな反応経路を経ることが示唆された。
- (5) 蛍光標識サンプルの調製に成功した。蛍光色素を導入した還元型ペプチドであっても、非修飾体と同じ条件でフォールディング反応をおこなえた。
- (6) 分子間にジスルフィド結合を持つペプチドである酸化型ヒトインスリンの効率的な合成は達成できなかった。

本研究結果は「脂質膜上での化学反応」という新コンセプトの提案と検証を実施したもとして、学会発表などで高い評価を頂いた。一方、今後の課題は *in vivo* におけるフォールディング反応-脂質膜の関連の解明、および、より複雑なジスルフィド架橋様式の実現であると考えている。

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 4 件)

1. Pawan, K. J., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S., Sakagami, Y., Aimoto, S., and Kakimoto, T., Differential Effects of Peptides Stomagen, EPF1, and EPF2 on Activation of the MAP Kinase MPK6 and the SPCH Protein Level. *Plant Cell Physiol.* **2013**, *54*, 1253-1262. (査読：有)
2. Hirose, M., Sugiyama, S., Ishida, H., Niiyama, M., Matsuoka, D., Hara, T., Mizohata, E., Murakami, S., Inoue, T., Matsuoka, S. and Murata, M., Structure of the human heart fatty acid-binding protein in complex with the fluorescent probe 1-anilinonaphthalene-8-sulphonic acid. *Journal of Synchrotron Radiation*, **2013**, *20*, 923-928. (査読：有)
3. Huang, Y.; Hara, T.; Murata M., Purification of Transmembrane Peptides using RP-HPLC., Ed. Teshima T. and Nishiushi Y. *Peptides Science 2013*, in press. (査読：有)
4. Hara, T.; Purwati, E.M.; Wada, A.; Hasegawa, M.; Murata, M.; Aimoto, S., Folding of cysteine-rich peptides on phospholipid membranes., *Peptides Science 2013*, in press. (査読：有)

〔学会発表〕 (計 7 件)

1. Huang, Y.; Hara, T.; Murata M., Purification of Transmembrane Peptides using RP-HPLC., 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium & 50th Japanese Peptide Symposium. 平成25年11月6-8日 大阪ポスター発表
2. Hara, T.; Purwati, E.M.; Wada, A.; Hasegawa, M.; Murata, M.; Aimoto, S. "Folding of cysteine-rich peptides on phospholipid membranes." 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium & 50th Japanese Peptide Symposium. 平成25年11月6-8日 大阪ポスター発表
3. 廣瀬未果・松岡茂・石田英子・松岳大輔・原利明・溝端栄一・村上聡・井上豪・村田道雄・杉山成、ヒト心筋型脂肪酸結合タンパク質 FABP3 と蛍光プローブ 1-anilinonaphthalene-8-sulphonic acid の複合体結晶構造解析、日本結晶学会平成25年度年会、平成25年10月12-13

日 熊本 ポスター発表

4. Mika Hirose, Shigeru Sugiyama, Hanako Ishida, Daisuke Matsuoka, Toshiaki Hara, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Shigeru Matsuoka, Michio Murata. Structure of the human muscle fatty acid-binding protein complexed with competitive inhibitor. The International Conference on Structural Genomics 2013 (ICSG2013) 第7回国際構造ゲノム会議 平成25年7月29日-8月1日 北海道(札幌) ポスター発表
5. Hanako Ishida, Shigeru Sugiyama, Mika Hirose, Sebastien Lethu, Hikaru Ano, Fuminori Sato, Daisuke Matsuoka, Toshiaki Hara, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Shigeru Matsuoka, Michio Murata. Novel fatty acid analogues for the understanding of lipid-protein interactions. The International Conference on Structural Genomics 2013 (ICSG2013) 第7回国際構造ゲノム会議 平成25年7月29日-8月1日 北海道(札幌) ポスター発表
6. 原 利明、エイ ス マラス プルワティ、和田 昭裕、長谷川 慎、村田 道雄、相本 三郎、システインリッチペプチドの脂質膜上での酸化的フォールディング反応、第13回日本蛋白質科学会年会、平成24年6月12日 - 6月14日 鳥取、ポスター発表
7. Shigeru Sugiyama, Hanako Ishida, Daisuke Matsuoka, Toshiaki Hara, Eiichi Mizohata, Tsuyoshi Inoue, Shigeru Matsuoka, Michio Murata. Structure of the human muscle fatty acid-binding protein complexed with Hydrophobic ligand. 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology (第4回回折構造生物国際シンポジウム2013) 平成25年5月26-29日 ポスター発表

〔図書〕 (計 1 件)

1. 原 利明「化学合成ペプチド・タンパク質の調製と結晶構造解析」、杉山成 編『タンパク質結晶の最前線』第II編、シーエムシー出版 (2013) pp.42-48.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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

原 利明 (HARA Toshiaki)
大阪大学・理学研究科・特任講師（常勤）

研究者番号：90528233

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：