

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13901
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2015
課題番号：26810088
研究課題名(和文) シス테인リッチタンパク質の合成研究

研究課題名(英文) Synthetic study of cysteine rich proteins

研究代表者
大石 俊輔(Oishi, Shunsuke)

名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・助教

研究者番号：80707795
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の受粉に必要な役割を持つ花粉管誘引タンパク質LUREの化学合成に取り組んだ。合成はFmoc固相ペプチド合成法によって合成した2つのペプチド断片をKAHAペプチドライゲーション反応で連結することで達成した。この時、反応系中に還元剤(TCEP)を加えることで効率良くらいゲーション反応が進行することを見出した。さらに、シス테인リッチタンパク質の部分構造を環状ペプチドに組み込むことで、元のタンパク質の生物活性を再現することに成功した。環状ペプチドはKAHAペプチド環化反応によって合成した。

研究成果の概要(英文)：We synthesized LURE pollen tube attracting proteins, which plays an important role in plant reproduction. The synthesis was accomplished by KAHA peptide ligation reaction of two peptide segments obtained by Fmoc solid phase peptide synthesis. We found that the ligation reaction proceed efficiently by addition of reducing agent (TCEP). We also synthesized cyclic peptides having partial sequence of LURE proteins and the cyclic peptides exhibited the same biological activity as the parent LURE proteins.

研究分野：有機合成化学、ケミカルバイオロジー、タンパク質化学

キーワード：有機合成化学 タンパク質の化学合成 ケミカルバイオロジー 植物化学 環状ペプチド 生理活性中分子

1. 研究開始当初の背景

システインリッチタンパク質 (CRP) は、ウイルスから真核生物まで多くの生物が持つ、システインに富んだ分泌性の低分子 (~20kDa) タンパク質の総称であり、抗菌作用、神経毒性、脂質輸送、植物ホルモンなど様々な機能を持つタンパク質が存在する。アミノ酸配列の約 10% がシステイン残基という興味深い特徴を持つが、この構造的特徴のため CRP の構造や機能の解明は容易ではない。CRP の機能の発現にはジスルフィド結合の形成が極めて重要であることが知られているが、CRP は複数のシステイン残基を持つため可能なジスルフィド結合の組合せは数多く存在する。生体内では適切な翻訳後修飾により活性型の CRP が選択的に形成されるが、大腸菌などで発現された組換えタンパク質は本来されるべき翻訳後修飾を受けない。そのため組換え CRP は適切なジスルフィド結合を持たず不活性である。また精製段階では分子間ジスルフィド結合の形成による生成物の不溶化も問題となる。すなわち、現在、標準的なタンパク質の合成法として用いられている組換え遺伝子の発現では活性型の CRP を得ることは困難である。CRP の構造を制御し、その機能を分子レベルで解明するために化学合成の力が必要不可欠である。

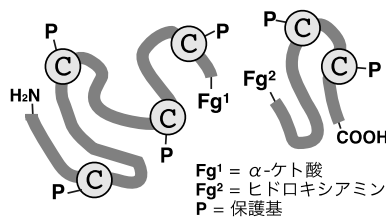
申請者らの研究グループではタンパク質の新たな化学合成法として KAHA ライゲーション反応を開発していた (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *46*, 6021. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 513.)。本反応では、ペプチドの C 末端 α -ケト酸と N 末端ヒドロキシルアミンが官能基選択的に反応しアミド基を形成することで、より分子量の大きなタンパク質が得られる。本反応は官能基選択性が極めて高く、水中で無保護のペプチド鎖に対しても適応可能である。申請者らのグループでは、本反応を用い、それまでに 150 残基程度のタンパク質の合成に成功していた。

2. 研究の目的

本研究では CRP のなかでも花粉管誘引因子 LURE と植物ペプチド群 EPFL ファミリーを標的とし、以下の点を明らかにすることを目的とした (図 1)。

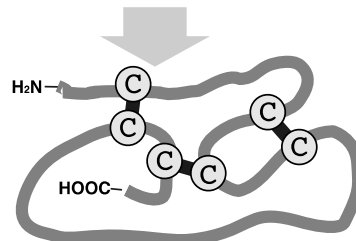
(1) KAHA ライゲーションのシステインに対する共存性の向上

システインの側鎖官能基であるチオール基は、アミンやアルコールなどの他のアミノ酸側鎖官能基と比べ、高い求核性や酸化のされやすさなど特徴的な化学的性質を持つ。この特異な性質は多くのタンパク質の性質の鍵となる一方で、タンパク質の取り扱いを複雑にする。予備的な結果から全配列の 1-2% のシステインを含むタンパク質に対しても KAHA ライゲーションが進行することが明らかになっている。約 10% のシステインを含む CRP に対しても本反応は原理的には適用可能であると考えられるが、収率の低下や精製段階での不溶化など問題も予想される。これを解決するため、還元剤の添加など反応条



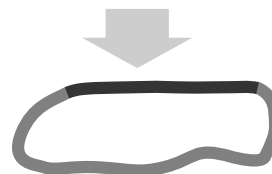
化学合成

- 構造の精密な制御
(選択的ジスルフィド結合形成)
- KAHA ライゲーションの適用範囲拡大



システインリッチタンパク質 (CRP)

- 抗菌作用、脂質輸送、神経毒、植物ホルモンなど多様な機能
- 高いシステイン含有量 約 10% (天然での平均存在率: 約 2%)
- 全ゲノムの 2-3% を占める
- 50-100 残基 (5-10kDa)



機能性タンパク質

- 構造の改変、単純化
- 活性、安定性の向上

図 1. 本研究の目的

件の改良を行い KAHA ライゲーションの適用範囲を広げる。

(2) 花粉管誘因タンパク質 LURE の合成と三次元構造の解明

LURE は 2009 年に東山らによって *Torenia fournieri* から花粉管誘因物質として同定された CRP であり、植物の生殖において種の識別を担う重要な物質である (*Nature* 2009, 458, 357.)。その生物活性にはジスルフィド結合の形成が必須であることが明らかとなっているものの、システイン同士の組み合わせや活性型 LURE の三次元構造は未知である。本研究ではジスルフィド結合を選択的に形成することで活性型 LURE のジスルフィド結合の組み合わせを明らかにする。その後、各種構造解析により合成した活性型 LURE の三次元構造を解明、さらに活性部位の特定を行う。

(3) 機能未知の植物ペプチド群 EPFL ファミリーの合成

シロイヌナズナには 750 もの CRP をコードする遺伝子が存在し、複数のサブファミリーに分類されている (*Plant J.* 2007, 51, 262.)。遺伝子解析から 9 個の CRP で構成される

EPFL ファミリーが見つかったが、そのメンバーのいくつかは分泌されることで葉の表皮細胞の発生様式を制御することが知られている(J. Plant Res. 2010, 123, 275)。しかしながら、そのほかのメンバーの機能については明らかになっていない。EPFL ファミリーの機能の解明には、対応する遺伝子のノックアウトの他に、EPFL ファミリーの網羅的合成、およびそれらを植物に直接投与する方法が有効であると予想できる。本研究では EPFL の化学合成と植物科学者との共同研究により、その機能の解明を目指す。

(4) 構造の改変による機能性タンパク質の開発

CRP の構造を改変し、安定性や活性を向上させ、新規機能性タンパク質を創成する。具体的には LURE の構造改変により効率的な植物の品種改良を可能とする新規タンパク質や、EPFL や類似の植物シグナル因子の構造改変により植物の成長を促進するタンパク質の創出を目指す。活性部位の構造のみを取り出すことで安価かつ様々な植物種に対して汎用性の高い機能性タンパク質が開発できると考えられる。

3. 研究の方法

(1)システインリッチタンパク質の化学合成
 活性型 LURE は 6 つのシステイン残基からなる 3 つのジスルフィド結合を持つが、その組み合わせは明らかになっていない。3 つのジスルフィド結合の可能なシステインの組み合わせは 15 通りである。まずは活性型 LURE の質量分析の結果から示唆された情報をもとに候補を絞ったうえで、LURE の合成を行う。システイン残基に対し選択的な脱保護が可能で保護基を用い、単一組成の LURE を化学合成する(図 2)。アセタミドメチル基 (Ac) や t-ブチル基 (t-Bu) などペプチド固相合成に適用可能かつ選択的な脱保護が可能でチオールに対する保護基はすでに報告例が多くあるため、実現の可能性は高いと考えられる。また多数のシステイン共存下での KAHA ライゲーションは TCEP、ジアルキルジスルフィドなどの還元剤の添加や反応温度、溶媒など

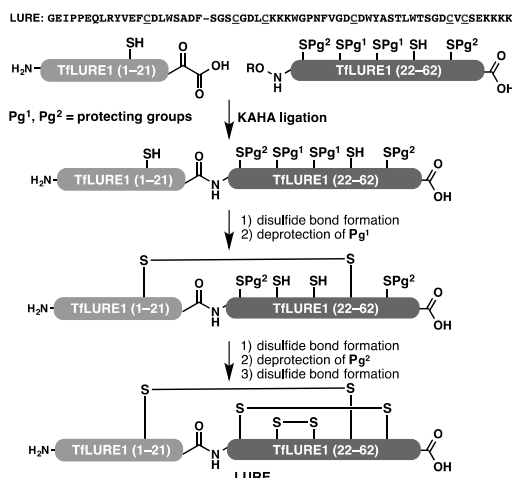


図2. KAHAライゲーションと選択的ジスルフィド結合形成によるLUREの合成

反応条件を最適化することで達成可能であると予想している。その後、合成し得られた化合物に対し生物活性試験を行い、それぞれの生物活性を比較することで、活性型 LURE のシステイン残基の組み合わせを決定する。生物活性試験は名古屋大学 WPI-ITbM の東山哲也教授のグループとの共同研究により行う。

(2)機能性ペプチドの創出

いくつかの CRP では、タンパク質中のループ構造が生物活性を担うことが報告されている。CRP のループ構造を取り出し、環状化することで最小ユニットによって生物活性を再現する。ペプチド鎖の環化は分子内 KAHA ライゲーションによって行う。また結合部に Spacer を組み込み、環構造の空間的余裕や柔軟性を確保することで生物活性の向上も期待できる。環状ペプチドは鎖状ペプチドに比べ安定性が高いため、in vivo 生物試験や医薬品開発など幅広い応用が期待できる。また生体内や周辺環境への残留が問題となる場合には、結合部の結合様式を変更し安定性を低下することで環境中への残留を抑えることも可能である

4. 研究成果

(1)花粉管誘引タンパク質 TFLURE1 の全合成
 62 アミノ酸残基からなる TFLURE1 タンパク質をペプチド断片 1、LURE(1-21)とペプチド断片 2(22-62)を KAHA ペプチドライゲーション反応で連結することにより達成した。

ペプチド断片 1 は担体にアセタール保護された α -ケトエステルを導入し、続いて Fmoc ペプチド固相合成を行うことで行った。TFA を用いた固相からの切り出しと逆相 HPLC を用いた精製によって C 末端に α -ケトカルボン酸を持つペプチド断片 1 を得た。ペプチド断片 2 は Fmoc ペプチド固相合成を行った後、末端に Boc-oxaproline を導入し、固相からの切り出しと逆相 HPLC による精製を経て N 末端にヒドロキシアミンを持つペプチド断片 2 を得た。

ペプチド断片 1 と 2 を、シュウ酸を添加した水/NMP 混合溶媒中に溶解し、50°C に加熱することで KAHA ライゲーション反応が進行し TFLURE1 タンパク質が得られた。この時、システイン残基による副反応を防ぐため還元剤である TCEP を添加することで精製物が効率よく得られることを見出した(図 3)。

得られた化学合成 TFLURE1 タンパク質はリフォールディング条件に付したのち、Torenia fournieri の花粉管を用いた花粉管誘引アッセイにより生物活性を評価した。結果として、

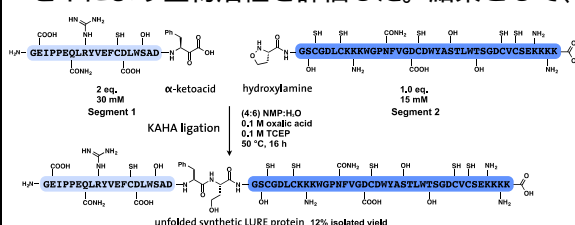


図3. KAHAライゲーションによるLUREの合成

化学合成によって得られた化学合成 TfLURE1 タンパク質は、遺伝子組換えによって得られた組換えタンパク質と同等の活性を持つことが示された。

(2) TcLURE1 タンパク質の化学合成

Torenia fournieri の近縁種である Torenia concolour の LURE タンパク質、TcLURE1 の合成に取り組んだ。TfLURE1 と TcLURE1 のアミノ酸配列は相同性が高く、8 個のアミノ酸残基が異なるだけである。そのため、TcLURE1 の合成も TfLURE1 と同じ方法によって達成することができた。同様にリフォールディング操作の後、活性評価により、TcLURE も Torenia concolour の花粉管に対し、組換えタンパク質と同様の活性を示すことが明らかとなった。

(3) LURE キメラタンパク質の合成

TfLURE1 と TcLURE1 は異なる植物種に由来しほぼ同様のアミノ酸配列を持つが、その活性は由来する植物種に特異的である。すなわち、配列が非常に似ているにもかかわらず、それぞれの植物種は 2 つのタンパク質を識別することができる。このアミノ酸配列の違いと認識の関係を調査するため、キメラタンパク質の合成を行った (図 4)。

TfLURE1 のペプチド断片 1 と TcLURE1 のペプチド断片 2 を連結することにより、キメラタンパク質 Tf-TcLURE1 を得た。同様に TcLURE1 のペプチド断片 1 と TfLURE1 のペプチド断片 2 の連結により Tc-TfLURE1 を得た。これらの生物活性試験から、LURE1 タンパク質のペプチド断片 2 の部分、すなわち C 末端側がタンパク質の認識に重要であることが明らかとなった。

さらに、認識を担うアミノ酸残基を特定するために LURE1 タンパク質の誘導体の合成を行った。これらのタンパク質の生物活性の評価は現在進行中である。

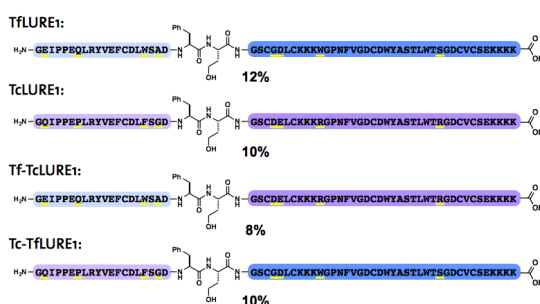


図4. KAHAライゲーションによるキメラLUREタンパク質の合成

(4) 機能性環状ペプチドの創出

LURE1 タンパク質の部分構造(12 アミノ酸残基)を取り出し、環状ペプチドとした。環状ペプチドの合成は C 末端に α -ケトカルボン酸、N 末端にオキサプロリンを導入したペプチドを KAHA ペプチド環化反応によって合成した。

さらにバイオアッセイにより、部分構造からなる環状ペプチドも元の LURE タンパク質と同等の生物活性を持つことが明らかとなった。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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

大石 俊輔 (OISHI, Shunsuke)

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任助教
研究者番号：80707795

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：