

## 1. 研究実施計画

課題名：脳機能材料開発のためのミニ蛋白質の創製法に関する研究

研究機関名：独立行政法人 産業技術総合研究所

任期付研究員氏名：上垣 浩一

### ①研究の意義・目的・必要性

脳神経細胞工学の確立のためには、細胞の機能を自在に調節できる分子を創製する必要がある。実際の細胞で機能を調節している分子は主として蛋白質であるが、蛋白質はアミノ酸数200個以上の巨大分子であり、人工設計・化学合成は困難である。そこで、本研究では、蛋白質より短いポリマーであり、設計・合成が可能なペプチド（一般にアミノ酸数40個以下）を用いて脳神経系で機能する新規機能性分子を創製するための基盤技術を開発することを目的とする。

### ②研究の概要

構造安定化要因の少ないペプチドではその構造は一般的に不安定である場合が多く、ペプチドに設計した機能をもたせる際の大きな妨げの一つとなっている。ペプチドの構造を安定化するためには、より長鎖のペプチドを合成し、安定化要因の数を多くする必要があるが、現在の合成技術では精々30残基程度のペプチドしか合成できず新しい合成法の開発が必要となる。本研究では、ミニ蛋白質とも言うべき、より長鎖のペプチド（40-200残基）を合成できる新しい技術開発を行っている。また、新規機能性分子創製のためには鋳型となるモデルペプチドの構造を知る必要がある。そこでモデルペプチドとして遺伝子の発現制御にかかわり、これまでに知られている最小単位で標的遺伝子を分子認識できるペプチドの構造機能相関の解析を行い、新規機能性分子のデザインの鋳型としての可能性を探っていく。

### ③研究目標

#### （1）ミニ蛋白質の創製技術の開発：

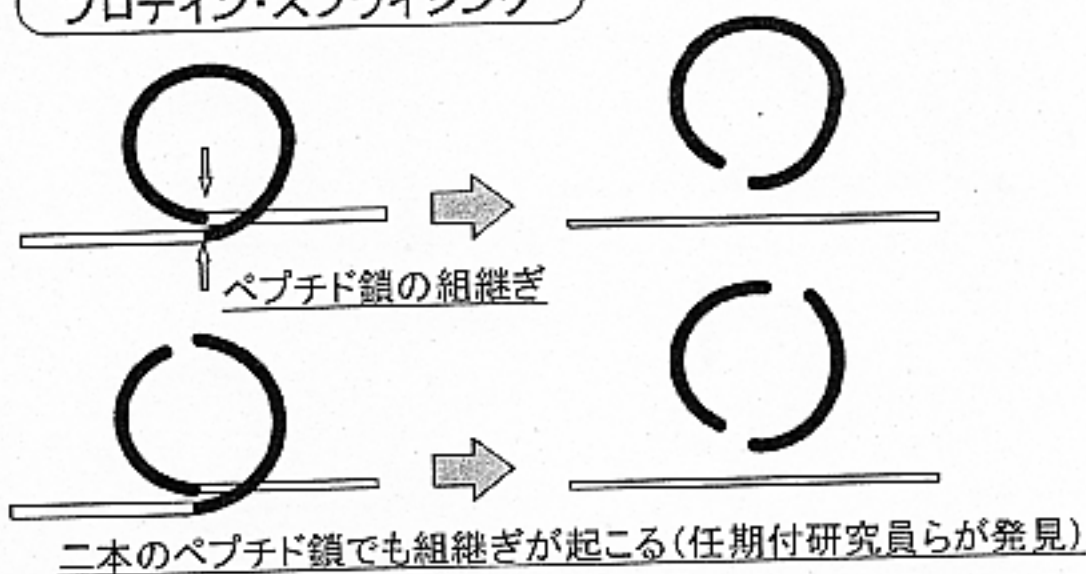
蛋白質の組継ぎ反応（プロテイン・スプライシング）を利用した長鎖ペプチド（ミニ蛋白質）の合成法を開発する。

#### （2）脳機能材料の開発：

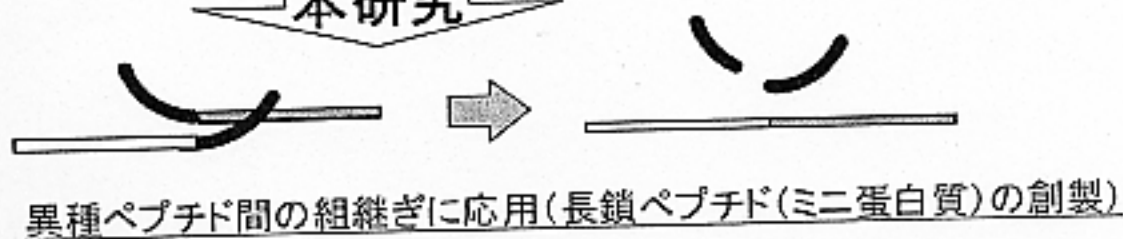
遺伝子調節蛋白質の精密構造解析を通じて得られた構造情報を元に、遺伝子調節機能をもつミニ蛋白質を創製・材料化し、脳神経系の機能を調節できる新規材料の開発を行う。

④ポンチ絵 (研究概要)

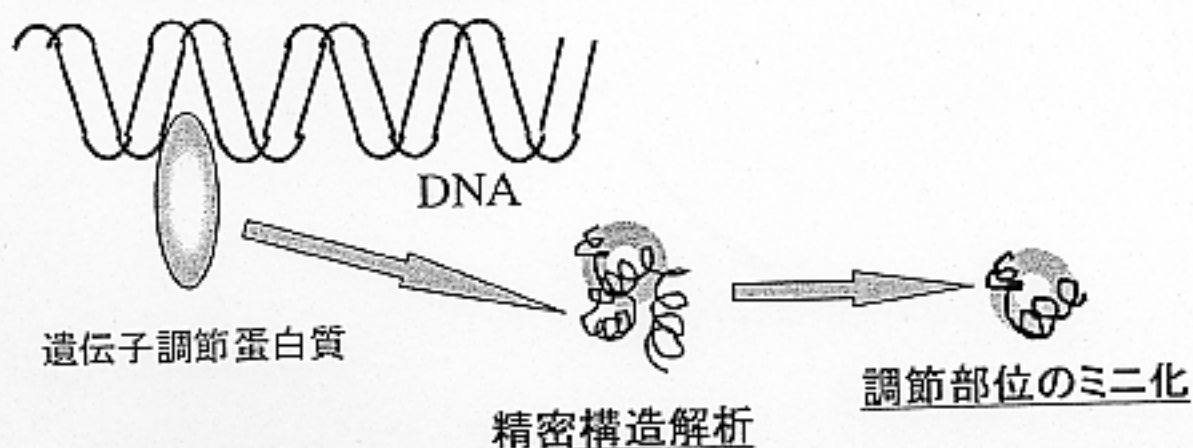
プロテイン・スプライシング



本研究



遺伝子調節蛋白質のミニ化



## 2. 研究成果の概要

### ①研究成果

蛋白質より短いポリマーであり、設計・合成が可能なペプチドを用いて、脳神経系で細胞の機能を自在に調節できる分子を創製するための基盤技術として、ペプチドの構造安定化を中心に研究を行った。構造安定化要因の少ないペプチドの構造は一般的に不安定である場合が多く、機能材料として用いる際の大きな妨げの一つとなっている。そこで以下のように、従来のペプチドよりも鎖長が長く安定な分子(ミニ蛋白質)を創製する技術を開発するとともに、脳神経系で機能しているペプチドの安定化・高機能化を行った。

#### 1) ミニ蛋白質創製技術の開発:

##### ・蛋白質機能部位の抽出と精密構造解析:

Caspase-activated DNase (CAD) は細胞死 (アポトーシス) の最終段階において染色体 DNA を切断する蛋白質である。この CAD 蛋白質の機能制御ドメインを 87 アミノ酸のミニ蛋白質として抽出することに成功した。本ミニ蛋白質について、多核多次元核磁気共鳴法 (NMR) を用いて世界屈指の精度で立体構造解析を行い、この分子が  $\alpha/\beta$  構造を取ることを明らかにした。さらに阻害蛋白質との複合体解析を行うことにより、相互作用が主に静電的であることを原子レベルで明らかにした。この成果は細胞死を特徴づける染色体の分解機構に対して初めての原子レベルでの知見を与えた。

##### ・長鎖ペプチドの合成法の開発:

蛋白質組継ぎ反応 (プロテインスプライシング) は一本のペプチド鎖が自己触媒的に切断、再結合される非常にユニークな反応である。大阪大学蛋白質研究所との共同研究により、この組み継ぎ反応が 2 本のペプチド鎖からも起こることを見だし、ミニ蛋白質の合成法として有用であることを見いだした。また、この組み継ぎ反応を利用し蛋白質の部分安定同位体ラベリングに成功した。この成果を、これまで NMR 解析が不可能であった高分子量蛋白質に適用することにより、ペプチド鎖に沿った N 端部分、C 端部分から別々に NMR 信号を取り出せる画期的方法であり、脳神経系で働いている高分子量の蛋白質について、溶液の状態で立体構造を解析できることが期待できる。

・ペプチドの安定な立体構造の予測法の開発：

欧州分子生物学研究所(EMBL)との共同研究により、蛋白質・ペプチドの立体構造の中で最も重要な $\alpha$ ヘリックス構造の安定性を予測するプログラムの開発を行った。これまで、各アミノ酸の蛋白質・ペプチド中での $\alpha$ ヘリックス構造のとりやすさは $\alpha$ ヘリックス中のどこにそのアミノ酸が存在するかに無関係と仮定されてきた。しかし、ペプチドを用いてグリシン、バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニンなどの非極性アミノ酸について調べたところ、位置依存的であることを見いだした。この結果は構造予測法の開発に大きく貢献するものである。

2) 脳機能材料開発：

・脳機能ペプチドの構造安定化：

高次脳機能に関与している神経ペプチドYの $\alpha$ ヘリックス両端にシステイン残基を導入し、二本のヘリックスをS-S結合で架橋することにより、立体構造を高度に安定化させた分子の作成に成功した。また、その分子を用いて作用機構の解析を行った結果、生理機能の発現に必要な立体構造が従来のモデルと異なることを見いだした。

・脳機能ペプチドの高機能化：

カルモジュリン依存性リン酸化酵素 II は神経伝達物質の生合成、神経伝達物質の放出、記憶などの高次脳機能に関与していることが示唆されている。本酵素を特異的に阻害するペプチドを既に見いだしていた旭川医科大学との共同研究により、網羅的に作成したペプチドを用いて、機能を発揮するのに必要な最小単位を明らかにした。最終的に、従来のものと比較して阻害活性が10倍上昇した高機能分子を得ることに成功した。本ペプチドは特許化し、(株)ペプチド研究所より市販されている。

②波及効果、発展方向、改善点等

・波及効果、発展方向：

脳機能材料とは、切れた神経をつなぐ働きをもつ神経修復材料など、神経再生・維持さらには人工神経のための機能材料の総称をいう。当該任期付研究員が所属する研究ユニットでは、脳機能材料の開発を目指して新規機能性分子の探索を行っており、既に神経突起を伸ばす機能をもつ蛋白質などを見いだしている。しかし、これらは、分子量が大きく生体内での分解性も高いことから、材料化に結びつけるためには、安定で化学合成のできるミニ蛋白質化が必要である。その点で、当該任期付研究員が開発した、ミニ蛋白質創製技術及び脳機能ペプチドの構造安定化技術は即戦力として大きな効果がある。高齢化社会を迎えるに当たり、アルツハイマーなどに見られる高次脳機能の傷害がクローズアップされてきているなかで、脳機能材料の開発は重要な研究課題であるため、本研究の成果は大きな波及効果をもつと考

えられる。

また、ゲノム解析の急速な進展により、既知の蛋白質と類似しない未知の蛋白質のアミノ酸配列の情報が増大している。しかし、その蛋白質がどのような立体構造をとり、どのような機能をもつのかを予測することは現状では困難である。本研究で得られたペプチドの立体構造の予測法に関する成果はこれらの問題点を克服するための重要な技術、知見を与える方向に発展することが期待される。

#### ・改善点

本研究で開発した技術は、個々の蛋白質・ペプチドに対してテーラーメイド的に対応する段階であり、どのような蛋白質・ペプチドに対しても用いることのできるような汎用的なものとなっていない。今後、蛋白質・ペプチドの構造安定化を考えるためには、より汎用的な技術としていく必要がある。