

ペプチド工学的手法を用いたカルシウムチャネルモデルの構築

Construction of Calcium Channel Models by Peptide-Engineering

代表研究者

徳島大学薬学部附属医薬資源教育研究センター助教授 二木 史朗

Associate Professor, Institute for Medicinal Resources, The University of Tokushima, Shiroh FUTAKI

Peptide-engineering is one of the new research fields which constructs artificial functional molecules using synthetic peptides. We have applied this approach to construct calcium channel models with the hope to utilize them for the screening of calcium channel blockers. Here we report a new approach to tether transmembrane segments to create channel model proteins and its application to the construction of a voltage sensor (S4) model of the calcium channel. We have also prepared a H5-S5 hybrid protein which corresponds ion filter of the channel.

研究目的

カルシウムチャネルは生体内で血圧調節と密接な関係を持っており、このブロッカーは高血圧等の治療薬として有望である。これらの薬物の開発にはスクリーニングの過程が不可欠であるが、従来、スクリーニングには動物あるいは動物由来の細胞等を用いる方法が主として用いられてきていた。もし、これらに代わる人工的なチャネルモデルが構築できれば、個体差の少ない簡便で安定したスクリーニング系が構築可能となることが期待できる。また、動物を使う場合に比べ手間やコストの削減につながることも期待でき、さらに動物愛護の観点からも意義のあることである。

近年、合成ペプチドを用いて機能性の蛋

白質を構築する試み(ペプチド工学)が盛んに行われるようになってきた。著者らは化学合成したペプチドセグメントを選択的に架橋することにより、複数の異なるヘリックスから構成される分子量1万程度のヘリックス蛋白質構造が容易に構築できることをすでに報告している。本研究では、著者らの開発した方法により、カルシウムチャネルモデルの構築を行い、チャネル拮抗薬のスクリーニング系としての応用の可能性を探ることを目的とする。

研究経過とその成果

(1) L-型カルシウムチャネルの膜電位センサー領域(S4)モデルの構築

カルシウムチャネル中のS4セグメントは、

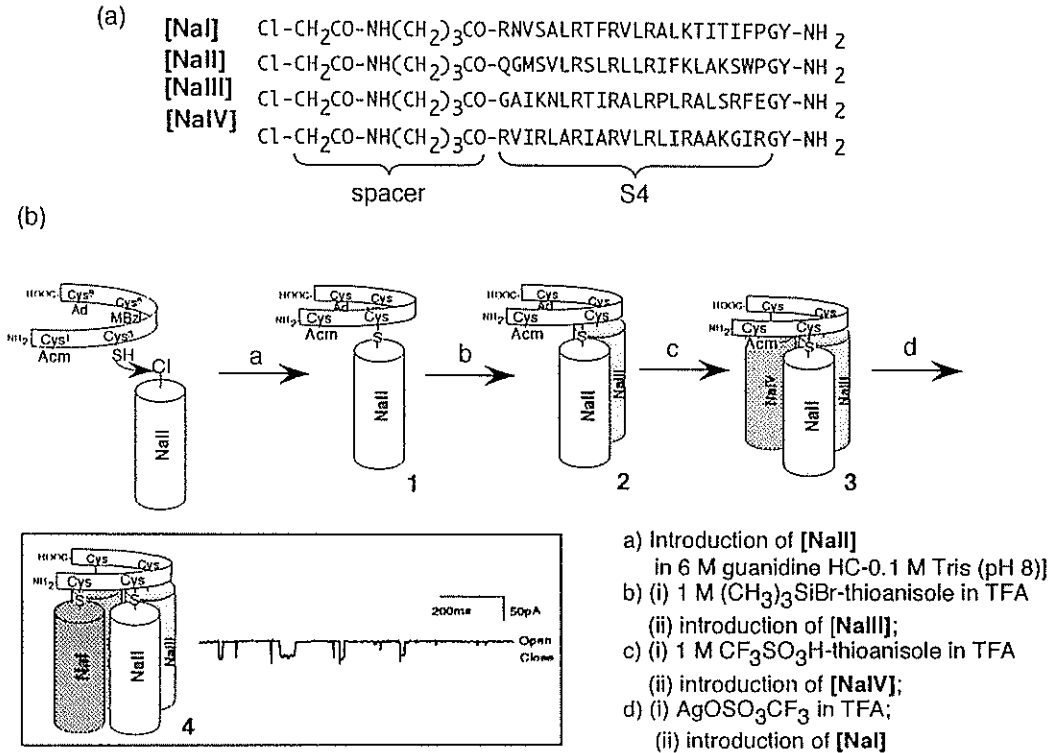


図1. 電位依存性ナトリウムチャンネルの膜電位センサー領域(S4)モデルの構築

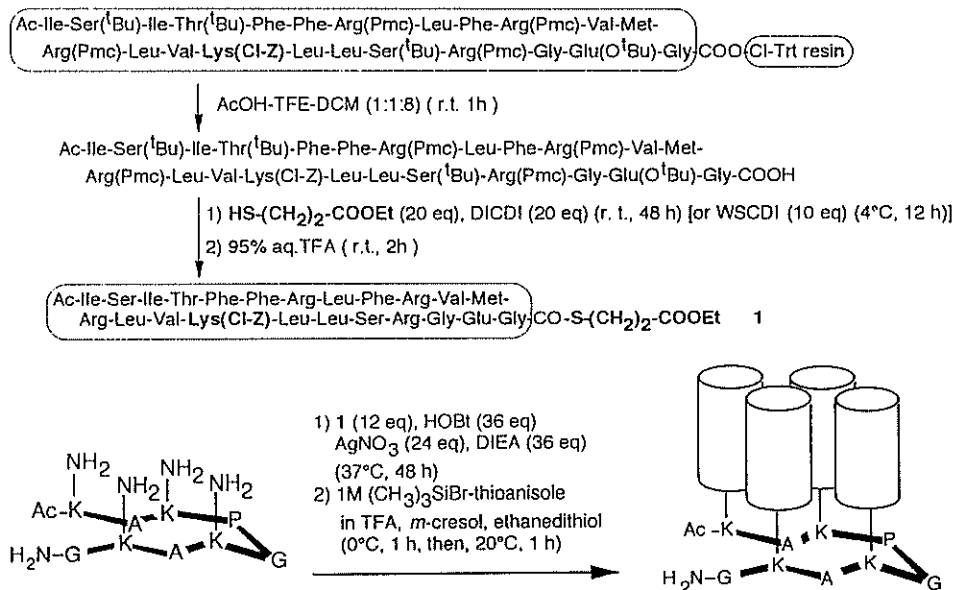


図2. Fmoc 法による新しいチオエステルセグメント調製法の開発とこれを用いた L-型カルシウムチャンネル膜電位センサー領域(S4)モデルの構築

膜電位の変化を感知しチャンネルを開口に導くセンサーとしての重要な働きを担っている。ここでは、著者らの開発した蛋白質構造構築法を用いて、カルシウムチャンネル中の4つのS4セグメントに対応するペプチドのアセンブリを行うことにした。この予備実験として、カルシウムチャンネルに比べて、点変異実験等によりチャンネル性質がより明らかになっている電位依存性ナトリウムチャンネルのS4に対応する4本のペプチドセグメントをアセンブルした蛋白質を構築し、脂質二重膜中に導入し、電気生理学的手法を用いてチャンネル活性を測定したところ、この蛋白質は整流性を示すチャンネルとして働き、我々のアプローチが有望であることが分かった(図1)。ついで、同様に電位依存性のL型カルシウムチャンネルのS4ペプチドを合成し、テンプレート上でアセンブリを行った。しかし、カルシウムチャンネルのこの領域のペプチドはテンプレートへの導入の際に必要な塩酸グアニジン溶液に対する溶解性が悪く、2つめのS4を導入した段階以降、合成を進めることは不可能であった。そこで、有機溶媒のDMSOを用いるチオエステル法でペプチドセグメントをテンプレートに導入するアプローチを試みることにした。

チオエステル縮合法は阪大の相本らにより開発された方法で、高純度の長鎖ペプチドの調製に非常に有用である。従来、この方法に使用するチオエステルセグメントはBoc固相合成法によってのみ調製されていたが、現在ではこの方法よりも扱いの容易なFmoc法がペプチド合成の主流になっている。そこで、著者らはFmoc法を用いてチオエステルセグメントを調製する新しい方法を開発し(図2)、これを用いてウサギ骨格筋由来のL型カルシウムチャンネルのリピート4

のS4に対応するペプチドセグメント4本からなる蛋白質が高純度で得られることがわかった。この蛋白質のチャンネル活性については現在検討中である。

(2) イオンフィルター領域(H5、SS2)モデルの構築

カルシウムチャンネルのS5とS6領域の間に存在するH5領域(SS2領域)は、チャンネルの入り口を取り囲むように細胞膜内に入り込んでおり、チャンネルを通過するイオンを選別するためのフィルターとして働いている。また、この部位はL型カルシウムチャンネルの特異的阻害剤であるジヒドロピリジンの結合部位とされており、チャンネルモデルのイオン選択性、薬物感受性を決定する上で極めて重要な部位である。ここでは、ウサギ心筋由来のL型カルシウムチャンネルのリピート3のH5(CaIIIH5)に対応するペプチドの両端に、著者らがヘリックス蛋白質構築に利用したシステインのピリジンスルフェニル(Pys)化による活性化法を用いて、リピート3のS5(CaIIIS5)に対応するペプチドを導入したCaIIIH5-CaIIIS5ハイブリッド蛋白質を構築した(図3)。予備実験の結果、この蛋白質は脂質二重膜中イオンチャンネルとして働くことがわかった。このイオン選択性等、活性の詳細については現在検討中である。

(3) その他

その他、S4-S3領域のハイブリッドペプチドの合成を試みたが、S3に対応するペプチドの溶解性の問題から、満足できる純度のペプチドが得られなかった。また、当初S6領域の活性検討を予定していたが、Montalらにより活性が見られなかった旨が報告されたので、活性検討は行わなかった。

CaIIH5:

NH₂-Cys-Gly-Glu-Asn-Ser-Lys-Phe-Asp-Phe-Asp-Asn-Val-Leu-Ala-Ala-Met-Met-Ala-Leu-Phe-Thr-Val-Ser-Thr-Phe-Glu-Gly-Trp-Pro-Glu-Leu-Leu-Tyr-Arg-Ser-Ile-Asp-Ser-His-Thr-Glu-Asp-Gly-Cys-CONH₂

CaIIIS5:

acetyl-Ile-Val-Ile-Val-Thr-Thr-Leu-Leu-Gln-Phe-Met-Phe-Ala-Ser-Ile-Gly-Val-Gln-Leu-Phe-Lys-Gly-Lys-Gly-Cys-CONH₂

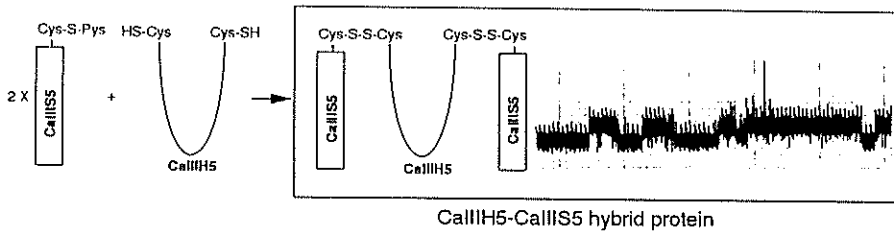


図3. イオンフィルター領域(H5)モデル蛋白質の構築

今後の課題と発展

(1)、(2)で得られた結果から、ペプチド工学的手法を用いて構築したモデル蛋白質が、チャンネルのポアとしての基本的性質を示していることが明らかとなった。今後はさらに得られたモデルのイオン選択性などを詳細に検討し、モデルの更なる精密化を図って行きたい。分子量10万を超えるイオンチャンネル蛋白質のほんの一部の構造をペプチドを用いて具現化することにより、その機能をシミュレートできることはある意味で驚くべきことであり、どこまで天然チャンネルに迫れるかは大きいなるチャレンジである。また、どのようにすればより天然に近い機能が発揮できるかを考える過程から、点変異実験等とは異なる切り口でのチャンネル機能の成り立ちに関する知見が得られるものと期待している。

発表論文リスト

1) S. Futaki, M. Aoki, M. Fukuda, F.

Kondo, M. Niwa, K. Kitagawa, Y. Nakaya: Assembling of the Four Individual Helices Corresponding to the Transmembrane Segments (S4 in Repeat I-IV) of the Sodium Channel. *Tetrahedron Lett.*, in press.

2) S. Futaki, K. Sogawa, J. Maruyama, T. Asahara, M. Niwa: Preparation of Peptide Thioesters using Fmoc-Solid-Phase Peptide Synthesis and its Application to the Construction of a Template-Assembled Synthetic Protein (TASP). *Tetrahedron Lett.*, in press.

3) S. Futaki, K. Kitagawa: Peptide-Unit Assembling via Disulfide Cross-Linking: A Versatile Approach Which Enables the Creation of Artificial Proteins Comprising Helices with Different Amino Acid Sequences. *Tetrahedron*, 53, 7479-7492 (1997).