

2024 年度 MERIT/MERIT-WINGS 自発融合研究 成果報告書

膜透過能・結合能の向上を目指した膜タンパク質 A 結合ペプチドの改変

申請学生 1: 大野 湧仁(理学系研究科化学専攻・博士 3 年), 菅 裕明, 大栗 博毅
ペプチド P の合成、結合能評価を担当

申請学生 2: 財津 亮介(理学系研究科生物科学専攻・修士 2 年), 濡木 理
ペプチド P の修飾部位のデザイン、生理活性評価を担当

研究期間: 2024 年 6 月 1 日 -2024 年 9 月 30 日

特許申請予定のため、タンパク質の名称、ペプチドの配列は非公開とする

1. ペプチドのデザイン

これまでに申請学生 1 の先行研究により、膜タンパク質 A に結合するペプチド P が発見されており、さらに申請学生 2 の先行研究で Cryo-EM による A・P 複合体の立体構造も明らかとなっていた。その複合体構造をもとに、申請学生 1,2 で議論のもとペプチド P の側鎖 R_{1,6,8,12} に結合力を高めるような変異を加えることにした(図 1, 1-5)。また、ペプチド P は膜タンパク質 A の細胞内ドメインに結合していた。一般にペプチドは膜透過性に乏しく、ペプチド P が細胞膜を透過し細胞内ドメインに結合するとは考え難い。そこで、ペプチド P の主鎖アミドに N-メチル化を施すことで膜透過性の向上を試みた(図 1, 6-14)。

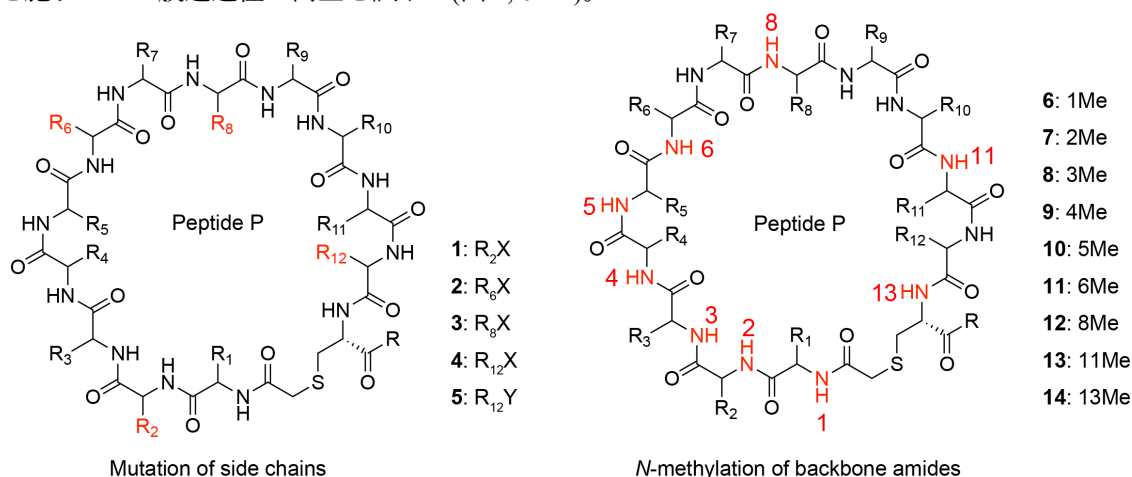


図 1 ペプチド P への修飾構造

2. 表面プラズモン共鳴(SPR)による結合能評価

申請学生 1 がペプチド P の変異体 1-14 を合成し、それらの膜タンパク質 A に対する結合能を SPR で測定した(図 2)。ペプチド P が膜タンパク質 A に対し、 $K_D = 53$ nM の結合能を示した。結合能を高めることを期待してデザインした 1-5 のうち、2 が $K_D = 50$ nM と比較的高い結合能を

示した一方、他の変異体はペプチド P の結合能を下回る結果となった。また、**2** の変異は結合能

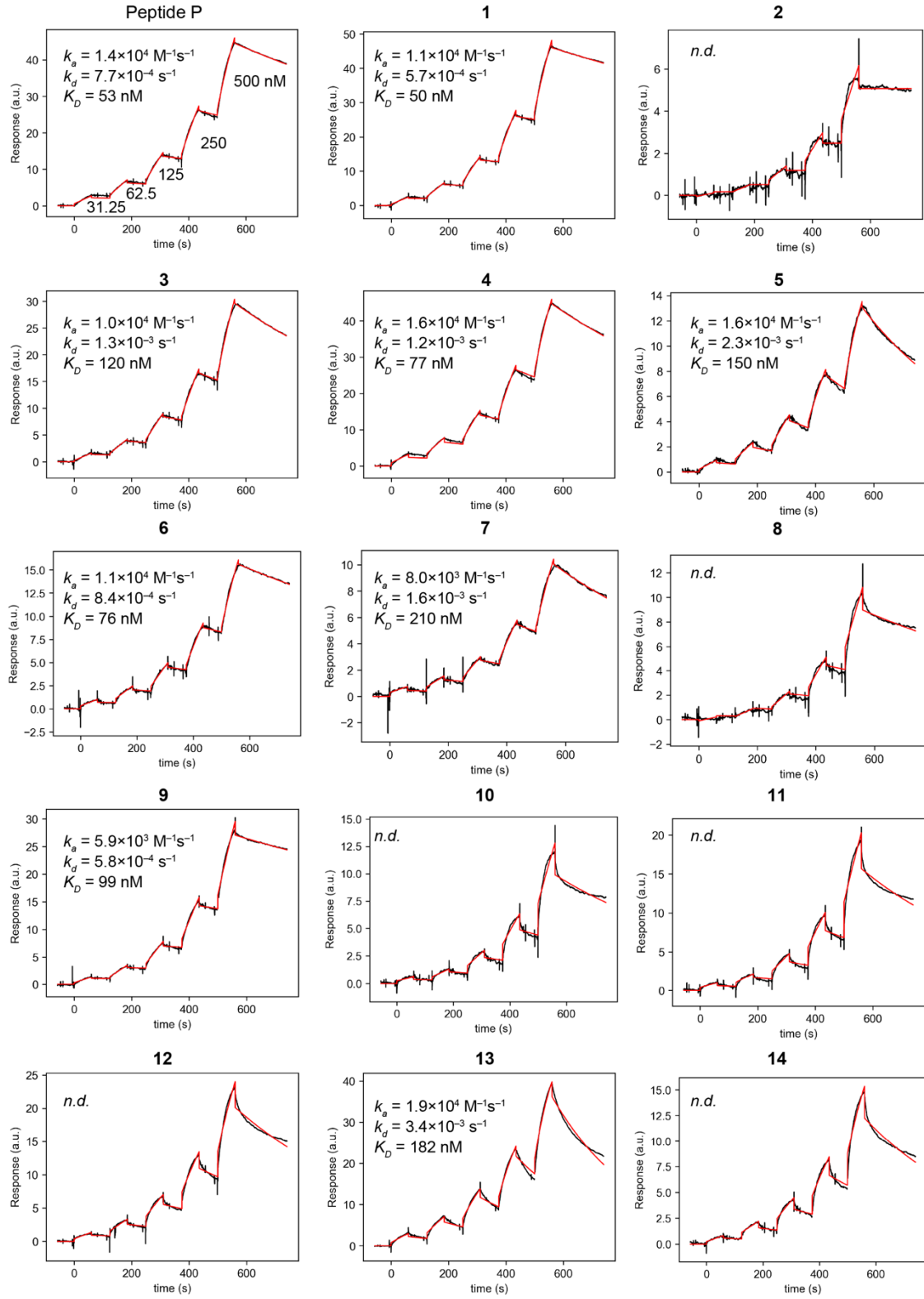


図 2. ペプチド P の変異体の結合能評価。 n.d. = not determined. 結合能が弱く信頼性の高いパラメーターを算出できなかったもの。

を向上させたものの、その変異は水素結合ドナー・アクセプターの数を増加させる変異であり、**2**の変異は有望な変異ではないと考えている。

また、*N*-メチル化に関しては、**6-14**の変異体全てでペプチド **P** の結合能を下回ったものの、**6, 7, 9** に関しては、結合能の低下は小さく十分有望な変異であると考ええる。**13** は結合能 K_D の低下は大きくないが、解離速度 k_d の低下が大きいため採用しないことにした。

3. まとめと今後の展望

申請の研究期間では、結合能 (**1-5**)と膜透過能(**6-14**)向上を目指した点変異体を作成し、結合能を測定した。その結果、主鎖アミドに *N*-メチル化を施した **6, 7, 9** はペプチド **P** と比べ大きく活性を失うことなく、膜透過能の向上が期待でき、生理活性の向上も望める。既に、これらの変異を組み合わせた変異体 **15**(図 3)を作成しており、申請学生 2 の研究室で細胞レベルでの生理活性を検証中である。今後は、変異体 **15** の結合能測定や膜透過能の測定を進めていく予定である。

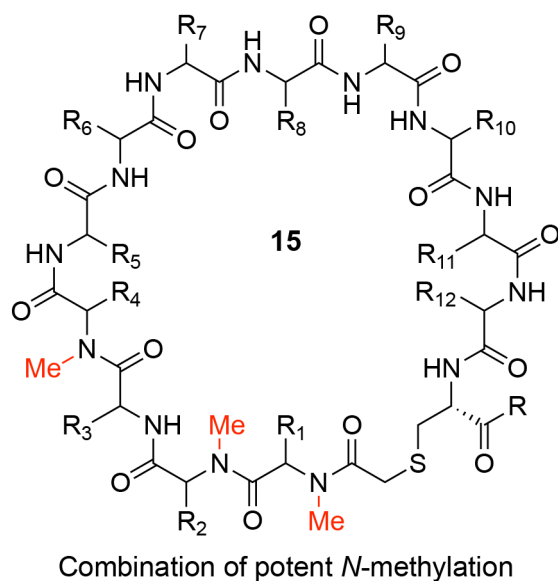


図 3. ペプチド **P** への有効な点変異を組み合わせたもの

謝辞

共同研究を了承してくださった、菅先生、濡木先生に感謝申し上げます。また、結合能測定に必要な消耗品の購入費を援助いただいた MERIT-WINGS に深く感謝申し上げます。