

令和元年6月14日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01818

研究課題名（和文）酵素活性を指標とした新規リガンド探索法の開発と機能性二環状Dペプチドの創製

研究課題名（英文）Construction of novel screening method using enzyme reconstitution and creation of bicyclic functional D-peptides

研究代表者

高橋 剛 (Takahashi, Tsuyoshi)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：90345380

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、リガンド-タンパク質の相互作用を酵素活性として読み出す新しい検出方法（IDNCL-PTS、IDNCL-ER）を開発し、この方法を用いて、がん関連タンパク質である、RasやSH2、Pin1などに結合する合成リガンドの探索を試みた。スクリーニングのために、直鎖状Dペプチドライブラリの合成および二環状Dペプチド作製のためのチオールエン反応の利用などを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内におけるタンパク質の異常・機能破綻は、多くの疾患の発症を起こす原因となる。そのため、それらのタンパク質の挙動の解析や、機能制御は重要であり、それらのタンパク質に結合する合成リガンドの探索が精力的に行われている。特に、ペプチド分子は、標的タンパク質に対する結合親和性に優れたものなどを創製するためのライブラリ構築のスキフォールドとして最適である。また非天然型のDアミノ酸からなるDペプチドは、生体内での分解耐性に優れているため、薬剤としての利用も期待されている。標的に結合するDペプチドを探索する技術の開発は、将来的な医薬品としての応用が期待されるため、社会的な意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In the present study, the novel detection systems (interaction-dependent native chemical ligation and enzyme reconstitution; IDNCL-ER, and protein trans-splicing; IDNCL-PTS) for ligand-protein interactions by reading out the enzyme activities have been constructed. In IDNCL-PTS, beta-galactosidase was employed as a reporter enzyme. In IDNCL-ER, NanoLuc luciferase, which is known as a smaller and brighter luciferase, was employed as a reporter protein. Using these systems, synthetic ligands that bind to Ras, SH2, and Pin1 proteins, related to the cancer, have been screened from the synthetic positional scanning peptide libraries that contain D-amino acids.

研究分野：生物有機化学

キーワード：リガンド探索 ペプチドライブラリ 相互作用検出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内におけるタンパク質の異常・機能破綻は、多くの疾患（がん、糖尿病、アルツハイマー病）の発症を引き起こす。そのようなタンパク質の挙動解析や機能制御をするために、標的タンパク質に相互作用する合成リガンドの活用が有効である。簡便に高い多様性をもつライブラリを構築できるペプチドは、特定の標的タンパク質に結合するリガンドを探索する上で非常に有用である。これまでに、ファージディスプレイ法や、mRNA ディスプレイ法により、多数のペプチドリガンドが開発されている。一方で、これら生合成システムを利用したライブラリから得られたペプチドは、L 体アミノ酸からなる直鎖状ペプチドである。そのため、プロテアーゼ感受性が高く、細胞内での利用にはあまり適していない。そのため、生体安定性に優れた D 体アミノ酸からなる D ペプチドライブラリや、D,L 混合ライブラリからの探索が強く望まれている。

申請者は、タンパク質に結合するリガンドの新規探索法として、リガンド-タンパク質間相互作用に基づく近接効果を利用したペプチド連結反応および酵素再構成系 (Interaction-Dependent Native Chemical Ligation & Enzyme Reconstitution; IDNCL-ER) の開発を行っている。ここでは、リガンド-タンパク質間の相互作用による近接効果により、リガンドとタンパク質それぞれに担持させたペプチドタグが連結し、新たなペプチド鎖が生成する。生成したペプチド鎖を使った酵素再構成系により、「リガンド-タンパク質間相互作用を酵素活性で読み出す」ことができる。これまでに酵素再構成系として、リボヌクレアーゼ S (RNase S) を用いた系を第一世代として開発してきた。これを使って、コイルドコイルペプチド間の相互作用や、リン酸化ペプチド-Pin1 WW ドメインタンパク質との相互作用を検出できることを明らかにした。また、タンパク質スプライシング活性をもつインテインと ガラクトシダーゼを組み合わせた第二世代のシステム (Interaction-Dependent Native Chemical Ligation & Protein Trans-Splicing; IDNCL-PTS) の開発にも着手していた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発を行っている IDNCL-ER 法および IDNCL-PTS 法を改良し、化学合成法により作製した D 体アミノ酸を含むペプチドライブラリから、がん関連タンパク質に結合する人工ペプチドのスクリーニングを目的とした。まず、現状の IDNCL-ER 法で不十分な酵素活性測定の検出感度の向上について、βガラクトシダーゼを用いた IDNCL-PTS システムの改良や、新たに NanoLuc ルシフェラーゼを検出用レポーター酵素とした IDNCL-ER システムの構築を試みることにした。実際に構築したシステムを使い、モデルライブラリからの探索実験や、直鎖状 D,L 混合ペプチドライブラリから、がん関連タンパク質に結合するペプチドの探索を行い、本手法の有用性について検証した。また、二環状ペプチドを合成するための方法について、モデルペプチドを用いた実験を行った。

3. 研究の方法

(1) βガラクトシダーゼを検出酵素とした IDNCL-PTS システムの構築

大腸菌由来βガラクトシダーゼは、4 量体構造を形成することで酵素活性を発現する。この 4 量体構造の形成には、N 末端領域のアミノ酸配列が重要であることが知られている。そこで、N 末端領域 (24-34) 配列を欠損したβガラクトシダーゼ (βGalC) と N 末端領域 (24-34) 配列からなるペプチド (βGalN) をインテインによる PTS 反応で連結させることで酵素活性が回復する系を構築した。βGalN11 と Ssp DnaB インテイン由来の N 末端 11 アミノ酸を連結したペプチド (βGalN-IntN) とインテイン C 末端タンパク質とβGalC を連結したタンパク質 (IntC-βGalC) を作製した。これを用いて PTS 反応に依存した酵素活性について評価した。

次に、βGalN と IntN 配列をそれぞれペプチドタグとして、リガンドと標的タンパク質に配置した (図 1)。チオエステルを介してリガンドを配置するために、クリック反応でβGalN の C 末

端側に pYEEI を配置した。NCL で生成した β GalN-IntN 配列を含むタンパク質に対し、IntC- β GalC を加えて PTS 反応を行うことで、酵素活性が回復するかについて検討した。

(2) モデルライブラリを用いた SrcSH2 に結合するペプチドの探索

Src ファミリータンパク質はがんの増殖に関連し

ているが、Src homology domain 2 (SH2) は、リン酸化チロシンを含むペプチド配列を認識することが知られている。Src キナーゼの SH2 ドメイン (SrcSH2) は、pYEEI 配列 (pY = phosphotyrosine) を認識する。そこで、1 残基目をリン酸化チロシンで固定し、2~4 残基目を Gly と Cys を除く L 体 18 種類のアミノ酸からなるペプチドライブラリを構築した。ここでは、2~4 残基目の各位置でアミノ酸を固定し、それ以外の部分をアミノ酸混合物としたポジショナルスキニング (PS) ライブラリを作製した。合成したペプチドライブラリは、クリック反応により、 β GalN 配列と複合化し、IDNCL-PTS による SrcSH2 との相互作用の検出を行った。

(3) NanoLuc ルシフェラーゼレポーターを用いた IDNCL-ER システムの構築

NanoLuc ルシフェラーゼは、他のルシフェラーゼと比較して高い発光効率および小さい分子量といったレポータータンパク質として優れた特性を有している。また、Dixon ら (A. S. Dixon *et al.*, *ACS Chem. Biol.* 2016, **11**, 400-408) は、NanoLuc の分割体を作製し、N 末端側の 156 アミノ酸からなる 11S 断片と、C 末端側 12 アミノ酸からなるペプチド断片を混合することでルシフェラーゼ活性が回復することを報告している。そこで、この C 末端側ペプチドを 2 つに分割した断片をペプチドタグとして用いて、IDNCL-ER システムの構築を行った。報告されている C 末端ペプチド配列に対し、NCL 反応に必要なシステインを配置した cNL ペプチド (Ac-VSGYRCFRRISG) を設計した。このペプチド配列の N 末端側ペプチド (cNLn; Ac-VSGYR) の C 末端にチオエステルを介してリガンドを配置した。リガンドとしては、SrcSH2 に結合することが知られているリン酸化チロシン含有ペプチド (pYEEI) を用いた。C 末端側ペプチド (cNLc; CFRRISG) は、標的のタンパク質 (ここでは SrcSH2) の N 末端にリンカー配列を介して配置した。これら構築したペプチド (cNLn-pYEEI) と標的タンパク質 (cNLc-SrcSH2) を緩衝液中で相互作用させ NCL 反応を誘導し、その後、11S タンパク質および NanoLuc の基質であるフリマジンを加えて発光強度を測定した。

(4) D, L 混合ペプチドライブラリの合成と Pin1 結合ペプチドの探索

がん関連タンパク質に結合するペプチドを探索するために、天然型の L 体だけでなく D 体アミノ酸の両者を用いた D, L 混合ペプチドライブラリの合成を行った。アミノ酸は、13 種類 (Ala, Arg, Asn, Asp, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Val) の D 体と L 体を用いて、6 アミノ酸残基からなるライブラリを構築した。ここでは、比較的簡便にライブラリを構築できるポジショナルスキニング法を採用した。各残基において、26 アミノ酸を固定し、固定した場所以外は、26 種類のアミノ酸混合液を用いてカップリング反応を行い、合計 156 種類の化合物群を合成した。合成したペプチドライブラリを用いて、NanoLuc を採用した IDNCL-ER システムで Pin1 に結合するペプチド配列の探索を行った。IDNCL-ER で得られる発光強度をもとに、各ポジションで最適なアミノ酸を選び出した。

(5) 二環状ペプチド合成のためのチオールエン反応の検討

コノトキシン様の二環状ペプチドを効率的に合成する方法を開発し、二環状ペプチドライブ

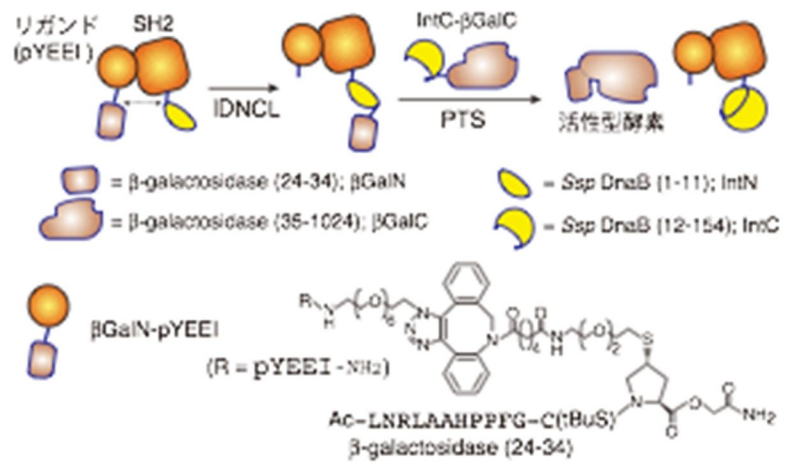


図1 IDNCL-PTS法の模式図(上)と用いたリガンドの化学構造(下)。

ラリの合成に繋げるため、チオールエン反応を用いた系の開発を試みた。システイン上のチオール基と反応させる相手として、ビニル基を側鎖にもつアミノ酸(ビニルグリシン; Vgl)を合成した。初期段階として、Vglを組み込んだオキシトシンアナログを合成し、光照射による環化反応を試みた。

4. 研究成果

(1) β ガラクトシダーゼを検出酵素とした IDNCL-PTS システムの構築

β ガラクトシダーゼの酵素活性を指標として相互作用を検出する IDNCL-PTS を作製した。モデル相互作用ペアとして用いた、pYEEI と SrcSH2 との相互作用について、pYEEI 濃度の増加に依存してガラクトシダーゼ活性みられた。一方、リン酸化チロシンを含まないペプチドでは酵素活性の増加はみられず、IDNCL-PTS がうまく機能していることが明らかとなった。

(2) モデルライブラリを用いた SrcSH2 に結合するペプチドの探索

リン酸化チロシンを含むモデルペプチドライブラリから、SrcSH2 タンパク質に結合する配列の探索を行った。その結果、結合する配列である pYEEI や、それに類似した配列が選択された。このことから、IDNCL-PTS システムを用いることで、SrcSH2 に結合するペプチドを見つけ出すことに成功した。

(3) NanoLuc ルシフェラーゼレポーターを用いた IDNCL-ER システムの構築

第一世代の RNase S を用いた IDNCL-ER と比較し、NanoLuc を用いた系では、検出感度の大幅な向上がみられた。また今までは困難であったリガンド-タンパク質間相互作用の定量解析が可能となり、モデルとして用いた、pYEEI ペプチドと SrcSH2 との解離定数を約 100 nM と見積もることができた。

(4) D, L 混合ペプチドライブラリの合成と Pin1 結合ペプチドの探索

リン酸化セリン/トレオニン-プロリン配列を認識し、プロリンのシストランス異性化を触媒する Pin1 タンパク質は、がんの増殖に関係していると示唆されている。NanoLuc ルシフェラーゼをレポータータンパク質とした IDNCL-ER システムを用いて、D, L 混合ペプチドライブラリから、Pin1 に結合するペプチドの探索を行った結果、各ポジションで、結合に優位なアミノ酸が幾つかみられた。この情報をもとに 4 種類のペプチドを個別に化学合成し、Pin1 との相互作用を調べたところ、結合親和性はそれほど強くないものの、Pin1 と相互作用することが確認された。

(5) 二環状ペプチド合成のためのチオールエン反応の検討

二環状ペプチドの合成を目的として、チオールエン反応を利用したペプチド環化反応の開発を試みたが、質量分析などの結果から、目的とするオキシトシンアナログの環化体の生成が確認できなかった。ルテニウム錯体を用いた方法なども検討したが、目的生成物を得ることができなかった。今後は、別の反応を用いて二環状ペプチドの作製に取り組む予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Yamamoto K, Oyaizu M, Takahashi T, Watanabe Y, *Shoji O.
Inhibiting aggregation of β -amyloid by folded and unfolded forms of fimbrial protein of gram-negative bacteria.
ChemistrySelect, 査読有, 2: 9058-9062, 2017.
2. *Takahashi T, Saito A.
Interaction-dependent native chemical ligation and protein trans-splicing (IDNCL-PTS) for detection and visualization of ligand-protein interactions.
ChemistrySelect, 査読有, 1: 1768-1772, 2016.

[学会発表](計 10 件)

1. 高橋剛

ペプチド連結反応とルシフェラーゼ再構成を利用したリガンド-タンパク質間相互作用検出

系の構築

- 日本化学会第98春季年会, 2018年
2. 藤岡芽生子, 荒井将吾, 須賀大貴, 高橋剛
酵素活性を指標としたリガンド-タンパク質間相互作用検出法を用いたがん関連タンパク質に結合するペプチドの探索
日本化学会第98春季年会, 2018年
 3. 高橋剛
Detection of peptide-protein interactions using interaction-dependent native chemical ligation
第54回ペプチド討論会, 2017年
 4. 高橋剛
IDNCL-PTS法を用いたリガンド-タンパク質間相互作用検出システムの構築
第11回バイオ関連化学シンポジウム, 2017年
 5. 藤岡芽生子, 茂木千明, 高橋剛
IDNCL-PTS法を用いたリン酸化ペプチドとSHP2 SH2ドメインとの相互作用の評価
第11回バイオ関連化学シンポジウム, 2017年
 6. 高橋剛
リガンド-タンパク質間の相互作用に依存したネイティブケミカルライゲーション反応における脱離基の影響
日本化学会第97春季年会, 2017年
 7. 茂木千明, 高橋剛
Detection and screening of phosphopeptide-SH2 interactions using interaction-dependent native chemical ligation and protein trans-splicing (IDNCL-PTS)
第53回ペプチド討論会, 2016年
 8. 高橋剛
短鎖ペプチド断片によるタンパク質トランススプライシング反応を用いたシグナル生成系の構築
第10回バイオ関連化学シンポジウム, 2016年
 9. 高橋剛, 齋藤彰紀
Interaction dependent native chemical ligation and protein splicing for detecting ligand-protein interactions
第52回ペプチド討論会, 2015年
 10. 高橋剛, 齋藤彰紀, 茂木千明
ペプチド連結反応とタンパク質スプライシングを用いたリガンド-タンパク質間相互作用検出系の構築
第9回バイオ関連化学シンポジウム, 2015年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://bioorgchem.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/Home.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：茂木 千明

ローマ字氏名：(MOGI, chiaki)

研究協力者氏名：藤岡 芽生子

ローマ字氏名：(FUJIOKA, meiko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。