

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13741

研究課題名(和文)筋ジストロフィー克服を志向したペプチド医薬創生

研究課題名(英文)Generation of peptide-based drugs for muscular dystrophy

研究代表者

原 雄二(Hara, Yuji)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60362456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋に高発現する膜タンパク質ジストログリカンは、0-マンノース型糖鎖にリン酸基を介した特殊な糖鎖修飾を有する。ジストログリカン糖鎖修飾不全により、ラミニンとの結合が損なわれ、筋ジストロフィーが惹起される。その未成熟型糖鎖を特異的に認識するペプチド性プローブについて、多価型ペプチドライブラリーを用いて同定を試みた。マンノース基に未修飾のリン酸基を有する糖鎖構造を認識する配列として、塩基性アミノ酸に富み、かつトリプトファン残基を含む配列が候補として得られた。このことは、ジストログリカン上の糖鎖認識には、単に静電相互作用だけでなく、アミノ酸レベルでの配列特異性が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dystroglycan is a membrane protein that bears phosphorylated 0-mannosyl glycans. Impaired glycosylation of dystroglycan causes muscular dystrophy due to a lack of the interaction with laminin, one of the major constituents of extracellular matrix. To develop the probe that can detect hypo-glycosylated forms on dystroglycan, we utilized a multivalent peptide library that contains randomized amino acid sequences. We focused on a phosphate residue on 0-mannosyl glycan because of its importance for the interaction with laminin. This attempt identified a specific amino acid sequence composed of a series of basic amino acid residues but contained tryptophan residues. This result suggests that not only electrostatic interaction but also specificity of amino acid sequences would be crucial for the interaction between dystroglycan's glycans and laminin.

研究分野：筋細胞生物学

キーワード：筋ジストロフィー ペプチド医薬 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは運動能低下・筋萎縮が進行する遺伝性筋疾患であり、治療法が未確立の難病である。主な病因のひとつは、細胞外マトリックス (ECM) 中のラミニンと筋線維膜タンパク質ジストログリカンの結合が損なわれることである。申請者らの研究により、一連の糖転移酵素群の変異に伴うジストログリカン上の糖鎖構造不全は、ラミニンとの結合能低下を引き起こし、ECM-形質膜間の連結が損なわれることで、重篤な筋疾患症状をもたらすことが明らかになった (Hara et al., New Eng. J. Med., 2011; Hara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2011)。これまでにジストログリカン糖鎖修飾不全により筋疾患をもたらす原因遺伝子群が多数報告されていることから、筋ジストロフィーの詳細な診断では、成熟糖鎖とわずかに構造が異なる未成熟糖鎖を検出することが極めて重要である。しかし、ジストログリカン糖鎖構造の微細な違いを検出する抗体や化合物は現在までに創出されておらず、新規分子プローブの創製が急務であった。

2. 研究の目的

本研究では、ジストログリカン上の未成熟糖鎖を特異的に認識するペプチド性分子プローブ創出を目指す。まず未成熟糖鎖を特異的に認識するペプチド配列をペプチドライブラリーより同定する。さらにペプチド配列の骨格部分に蛍光団もしくはビオチン付加により筋疾患モデルマウス由来の骨格筋切片で結合性を評価すると共に、骨格筋ヒトサンプルでの診断への応用を目的とする。さらに開発ペプチドにラミニン結合能を賦与し、細胞外マトリックスと細胞膜を架橋する筋疾患治療薬への発展を目指した。

3. 研究の方法

(1) スクリーニングに用いる未成熟糖鎖型ジストログリカンの調製

スクリーニングに使用するジストログリカン配列として、申請者の研究により 317, 319 番目のスレオニン残基が機能型糖鎖修飾

部位として同定されたことから (Hara et al., PNAS, 2011)、同残基を含む最少領域をスクリーニングに用いた。同タンパク質を HEK293 細胞にて安定的に発現させ、大量培養を行う系を構築した。その際に申請者が以前構築した無血清培地における HEK293 細胞での大量培養系を用いることにした。

本研究で着目した構造は「ジストログリカン 0-マンノース糖鎖上のリン酸基」である。同構造に着目する理由は、リン酸基の付加はラミニン結合糖鎖の修飾に必須であること、またリン酸基自体、あるいはリン酸基以降の修飾に關与する筋疾患原因遺伝子が多いと想定されるためである (Yoshida-Moriguchi et al., Science 2013)。そこでスクリーニング用に (a) リン酸基を有さない、(b) リン酸基を有するがラミニン結合糖鎖を有さないペプチドタンパク質をそれぞれ調製、精製した。

(2) 多価型ペプチドライブラリーのスクリーニング

リン酸基の有・無それぞれのタンパク質のアフィニティーカラムを作製し、当研究室に既存のペプチドライブラリーを吸着させ、洗浄後に溶出されたペプチド配列をアミノ酸シーケンスにて解読し、各ポジションで最も出現頻度が高かったアミノ酸残基を選択した。配列決定後、ELISA 等により、候補ペプチドの結合親和性および特異性を評価した。

4. 研究成果

(1) スクリーニングに用いる未成熟糖鎖型ジストログリカンの調製

前述の方法にて、ジストログリカンの最小配列を用いて未成熟糖鎖を有するタンパク質を調製した。調製方法として、HEK293 細胞におけるジストログリカン分子の安定発現細胞を樹立し、バイオリクター法により調製を試みた。ジストログリカンは多くの糖鎖修飾部位および多様な糖鎖構造を有するが、これまでの申請者らの研究により、糖鎖修飾の最小領域が同定されていたため、そのノウハウを利用し効率的な精製を行った。当研究にて着目した「未修飾のリン酸基」を有する

ジストログリカンタンパク質を調製する際に、強制発現系ということもあり、通常のタグを用いた精製だけでは十分な精製度は得られなかった。そこで我々は、未修飾のリン酸基を認識・結合する IMAC ビーズを用いての精製を行ったところ、純度の高いタンパク質の調製に成功した(図1)。また、リン酸基を有さない糖鎖構造については、フッ化水素酸を反応させることで、リン酸基を除去することで生成した。尚、今回の糖鎖構造はリン酸基が未修飾であり(図1のラミニン結合型糖鎖を含まない構造)、該当糖鎖構造はラミニンとは結合しないことをラミニン結合アッセイ等にて確認した。

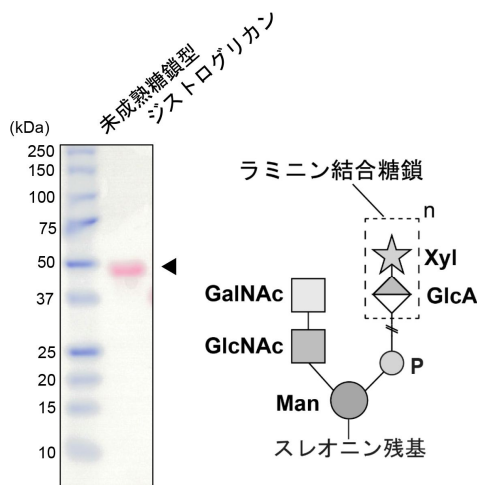


図1 ジストログリカン上の未成熟糖鎖体の精製

(2) 多価型ペプチドライブラリーのスクリーニングによる、ジストログリカン未修飾糖鎖結合ペプチド配列の同定、

続いて、調製したジストログリカンタンパク質をバイトタンパク質として、多価型ライブラリーのスクリーニングを行った。7箇所任意のアミノ酸を導入することで、19の7乗もの配列をスクリーニングした。リン脂質が修飾されておらず負電荷を有すると考えられること、また糖鎖修飾部位(アミノ酸317、319番目のスレオニン)は複数存在し、糖鎖と結合タンパク質の性質上、多点での相互作用の必要性から、塩基性アミノ酸のクラスターが候補配列として考えられた。実際、スクリーニングの結果、塩基性アミノ酸に富む配列が同定されたものの、単に塩基性のクラス

ターだけでなく、下記に示す興味深い性質が認められた(図2)。

- 単に塩基性アミノ酸だけでなく、トリプトファンの存在が重要。
- さらにトリプトファンの位置が変化することで、結合性が減少。

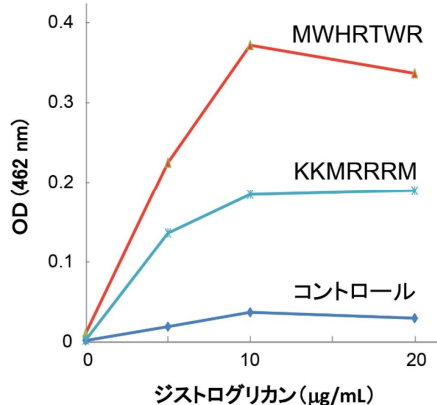
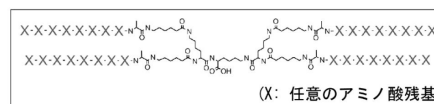


図2 ジストログリカン未成熟糖鎖を認識するペプチド配列

トリプトファンの位置を変化させた変異体を作製したところ、結合親和性が大幅に変化したことから、ジストログリカンの未成熟型糖鎖を認識する過程で、単に静電相互作用だけでなく、アミノ酸配列による制御をうけることが明らかになった。

糖鎖構造を認識しうるペプチド配列の同定を受けて、ペプチド鎖への修飾を試みた。ペプチド配列の可変領域に修飾基を導入すると、ジストログリカンとの相互作用に影響を及ぼす可能性が考えられたため、根元部分へのビオチン基、蛍光団の導入を試みた。しかしアーム部分が構造的に反応を阻害するためか、副生成物のみが生成されたため、残念ながらペプチド配列へのビオチン化および蛍光団の標識化は断念した。

一方、上記研究を行っていた際に、国内のグループから、ジストログリカン上の新たな糖鎖構造体(リピトールリン酸)の存在が同定され、機能型糖鎖構造が全決定された(Kanagawa et al., Cell Reports, 2016)。さらに同グループからは、当初の報告と異なり、マンノース基に存在するリン酸基の位置

が異なることも併せて報告された。以上の知見を考慮して、今後もジストログリカン上の未修飾糖鎖構造を認識するプローブ開発を進める必要がある。さらにその報告ではリン酸基の位置が異なることが報告されたことから、そのようなリン酸基の位置の違いを含めてさらに結合性を検討していきたい。

また、ペプチドライブラリーを用いた生体分子の検出プローブ創出として、我々はリン脂質にも着目してきた。特にホスファチジン酸は生体内にて重要な役割を果たしているにも関わらず、特異的な検出法が存在しないため、プローブ創製が待たれていた。我々は多価型ペプチドライブラリーを用いることで、ホスファチジン酸に対する結合プローブの創製に成功した (Ogawa et al., PLoS ONE 2015)。以上、我々の研究により、生体分子への新たなプローブ創製法への方法論構築に貢献したといえる。今後は同手法をさらに別の生体分子の検出プローブ構築に発展させ、将来的にペプチド工学の医療への応用へと発展させることを目指す予定である。

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 1 件)

Ogawa R, Nagao K, Taniuchi K, Tsuchiya M, Kato U, Hara Y, Inaba T, Kobayashi T, Sasaki Y, Akiyoshi K, Watanabe-Takahashi M, Nishikawa K, *Umeda M. (2015) Development of a Novel Tetravalent Synthetic Peptide That Binds to Phosphatidic Acid. PLoS One. 10, e0131668. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131668>

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 雄二 (HARA Yuji)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 60362456

(2) 連携研究者

梅田 眞郷 (UMEDA Masato)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 10185069

長尾 耕治郎 (Nagao Kohjiro)

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号: 40587325