

令和元年5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08544

研究課題名(和文) リガンド受容能不全の変異ペプチドホルモン受容体に対する人工リガンド創製の基盤研究

研究課題名(英文) Establishment of artificial ligands technology for peptide hormone receptors with functional mutations

研究代表者

酒井 克也 (Sakai, Kastuya)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：10523318

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)：増殖因子受容体に対する人工リガンド技術は疾患や再生医療に応用可能である。本研究では環状ペプチドスクリーニングを用いて、インスリン受容体に対する人工リガンドの取得と、人工アゴニスト環状ペプチドの性状に関する基盤研究を行った。組換えIRタンパク質は活性を保ったままでの生成が困難であり、ナノディスクによる可溶性IRの精製を試行している。環状ペプチドアゴニストが本来のリガンドとほとんど同じ活性を持ち得ること、不完全アゴニスト環状ペプチドを用いることで本来のリガンドと異なる選択的な細胞応答性を誘導できること、ユニークな環状ペプチドタンパク質の結合様式を立証し、人工リガンド技術確立のための知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチド・タンパク質ホルモンや増殖因子は細胞膜受容体を介して生理活性を發揮する。本課題により低分子人工ペプチド性リガンドを着実に創製できる技術を実証したこと、これらの技術の基盤となる知見を得られたことは、医薬品として際立った薬効をもつ複数の低分子生理活性医薬を創製する技術原理を確立することにつながる。

研究成果の概要(英文)：Artificial ligands for growth factor receptors are clinically applicable. We here tried identification of artificial ligands for insulin receptor (IR) using macrocyclic peptide screening, and characterized MET-agonist macrocyclic peptides to establish artificial ligand technology based on macrocyclic peptide. Expression and purification of IR protein with its kinase activity was difficult. Now, purification of IR in nanodiscs is being investigated. We have proved that 1) artificial ligands based on macrocyclic peptide are able to have similar activity compared to natural ligands, 2) partial agonists based on macrocyclic peptide are able to induced biased or selective cellular responses compared to natural ligands, and 3) macrocyclic peptides interact with thier target protein in a unique manner. These results illustrate potential of artificial ligands based on macrocyclic peptides.

研究分野：バイオテクノロジー

キーワード：受容体 リガンド 環状ペプチド

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

1. 研究開始当初の背景

インスリンに代表されるタンパク質・ペプチドホルモンは、代謝や内分泌を制御する重要な生理活性物質である。ペプチドホルモン受容体の機能喪失型変異は重篤な代謝・内分泌異常症の原因となる。受容体変異の中でも、受容体細胞外領域の変異によって、ペプチドホルモンへの結合が低下・喪失する場合や、受容体の活性型構造への変換能が失われた場合においては、人工ペプチドによって変異受容体の機能を救済することが可能と考えられる。しかし、従来の技術では、ペプチドの標的親和性が低いこと、取得効率が低いこと、エンジニアリングの許容性が低いこと、などの理由から、実現が困難であった。

私達は、肝細胞増殖因子 (HGF) の受容体である MET 受容体に高親和性に結合する環状ペプチドを効率的に複数取得し、それらを連結することで、MET 受容体を活性化できる人工リガンドを創製することに成功した (Ito, Sakai *et al.*, *Nat Commun.*, 2015)。この人工リガンドは、HGF タンパク質と同等の生物活性 (細胞増殖、細胞遊走、上皮管腔形態形成) を発揮するが、HGF とは相同性の無いペプチドである。この方法は、環状ペプチドライブラリの親和性セレクションとエンジニアリングに基づいており、従来のペプチド選択法と比較して標的タンパク質への親和性が高く、エンジニアリングの余地の大きいペプチドが得られる利点がある。

2. 研究の目的

機能喪失型変異インスリン受容体 IR (インスリン結合能低下、インスリンによって活性型構造が誘導されない) を、人為的に活性化する人工環状ペプチドの取得を目的とした。加えて、人工アゴニスト環状ペプチド技術の確立のために、すでに取得している MET 受容体アゴニスト環状ペプチドをモデルとして、環状ペプチドの性状に関する基盤研究を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ペプチドセレクションのための組換え IR タンパク質 (野生型、機能喪失型変異) の発現、精製とインスリン-IR 結合の検討: IR 細胞外領域-Fc 融合タンパク質および IR 全長タンパク質を安定発現する CHO-K1 細胞を樹立し、浮遊旋回培養による高密度培養法によって、IR-ECD-Fc タンパク質および IR 全長タンパク質の大量発現系を構築した。protein A affinity 精製、イオン交換クロマトグラフィー、NTA クロマトグラフィーを用いた精製を行い、キナーゼアッセイによる IR 活性の評価とインスリン感受性を検討した。

(2) IR (野生型、機能喪失型変異) 発現細胞とバイオアッセイ系の確立のために、CHO 細胞に、全長ヒト IR (野生型及び機能喪失型変異) を発現させ、異所的に発現させたヒト IR (野生型及び機能喪失型変異) のインスリン応答性を IR のリン酸化、下流シグナルである IRS、AKT、MAPK の活性化によって評価した。

(3) 環状ペプチドセレクションのために自己環状化する非天然アミノ酸を開始コドンとし、10~20 アミノ酸をコードするランダムな環状ペプチドライブラリを構築した。

(4) MET 受容体アゴニスト環状ペプチド (MET ペプチド) の性状に関する基盤研究として、MET ペプチドの受容体結合部位の特定、MET ペプチドによる MET 受容体二量体化、細胞内シグナル活性化、遺伝子発現パターンの詳細な検討を行い、本来のアゴニストである HGF との比較を行った。

(5) 人工アゴニストの特徴として、本来のアゴニストと異なる、もしくは部分的な細胞内シグナル伝達を活性化できることが様々な受容体に関して報告されており、リンカー長の異なる MET ペプチドを用いて、この可能性を検討した。

(6) 分子量 1,000~2,000 Da の環状ペプチドの性状として、タンパク質とのユニークな相互作用様式が示唆されており、HGF 阻害環状ペプチドをモデルとして、相互作用様式の解明を行った。

4. 研究成果

(1) IR 細胞外領域 (IR-ECD) と Fc の融合タンパク質はタンパク質発現量が少なく、正しくジスルフィド結合を形成していない IR が多いことが分かり、全長 IR として精製する方法に変更した。WGA 親和性カラム、Ni カラム、anti-Flag カラムを用いることで高純度に精製できたが、精製の各段階で IR のキナーゼ活性が失われた。キナーゼ活性を保った IR を精製するために、界面活性剤の検討を行った。また、精製方法として限外膜濃縮による凝集や変性を避けるため透析による方法を検討した。また、Affinity 精製の方法として Ni カラム、anti-Flag Ab、anti-IR Ab など検討した。これらの結果から IR のキナーゼ活性保持が改善されたが、完全に保持することは困難であった。現在、ナノディスクによる可溶性 IR の精製を試行している。

(2) CHO 細胞に、ヒト IR を安定発現させることでヒトインスリンに反応したヒト IR のリン酸化をウエスタンブロット法で検出できた。さらに様々な細胞外領域変異ヒト IR の発現ベクターを構築し、CHO 細胞においてヒトインスリンに対する応答性の低下や喪失を確認できた。また IR のキナーゼ活性を評価できる *in vitro* kinase assay を確立した。具体的には部分精製 IR とピオチン標識した基質 IRS1 ペプチドを、ATP を含むバッファー中で反応させ、基質ペプチドをストレプタビジンプレートに固相化した後、基質ペプチドのチロシンリン酸化を抗チロシンリン酸化抗体で検出した。

(3) 環状ペプチドセレクションのために自己環状化する非天然アミノ酸を開始コドンとし、10

～20 アミノ酸をコードするランダムな環状ペプチドライブラリを構築した。

(4) 取得した配列の異なる3つのMETペプチドとMET受容体細胞外タンパク質、およびその欠損体との結合評価から、METペプチドは細胞膜近傍のIPTドメインに結合しており、HGFリガンドとは異なるMET受容体のドメインに結合することが分かった。また、METペプチドはHGFと同様に、MET受容体二量体化と細胞内シグナル(Akt、Erk、PRAS40、STAT3、CREB)の活性化を誘導できること、mRNAアレイの解析によって誘導もしくは抑制される遺伝子発現パターンがHGFとほぼ同様であることが分かった。以上の結果から、人工的な環状ペプチドアゴニストが、本来のタンパク質リガンドとほとんど同じ活性を持ち得ることが立証された。Miao W, Sakai K, et al., *Sci. Rep.* 8(1):16492, 2018.

(5) MET受容体のリン酸化を部分的に誘導するMETペプチド(不完全アゴニスト)の性状解析から、MET受容体の部分的活性化だけで細胞遊走活性は完全に誘導されるが、細胞増殖活性と3次元管腔形成活性は部分的にしか誘導されないことが分かり、MET受容体の活性状態と細胞応答に関する知見が得られた。不完全アゴニストとして働く人工環状ペプチドを用いることで、本来のリガンドと異なる選択的な細胞応答性を誘導できることが示唆された。Miao W, Sakai K, et al., *Int. J. Mol. Sci.* 19(10):3141, 2018.

(6) HGF阻害環状ペプチドとHGFタンパク質、およびHGF断片蛋白質との結合解析から、環状ペプチドはタンパク質のドメイン間構造を認識して相互作用することが分かった。複数のタンパク質ドメインと結合することで標的タンパク質の立体構造を変化し、静的に保つことが高速原子間力顕微鏡による1分子観察で明らかになった。このような環状ペプチドタンパク質結合様式は、低分子化合物タンパク質結合様式やタンパク質タンパク質結合様式と異なるユニークなもので、環状ペプチドを利用することで標的タンパク質のユニークな立体構造や新規の標的部位の同定につながることを立証された。Sakai K, et al., *Nat. Chem. Biol.* 印刷中, 2019.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

- [1] Sakai K, Passioura T, Sato H, Ito K, Furuhashi H, Umitsu M, Takagi J, Kato Y, Mukai H, Warashina S, Zouda M, Watanabe Y, Yano S, Shibata M, Suga H, Matsumoto K. Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor. *Nat. Chem. Biol.* 15:598-606, 2019, 査読有, <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0285-7>
- [2] Miao W, Sakai K, Ozawa N, Nishiuchi T, Suzuki Y, Ito K, Morioka T, Umitsu M, Takagi J, Suga H, Matsumoto K. Cellular signaling and gene expression profiles evoked by a bivalent macrocyclic peptide that serves as an artificial MET receptor agonist. *Sci. Rep.* 8(1):16492, 2018, 査読有, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34835-4>
- [3] Miao W, Sakai K, Imamura R, Ito K, Suga H, Sakuma T, Yamamoto T, Matsumoto K. MET Activation by a Macrocyclic Peptide Agonist that Couples to Biological Responses Differently from HGF in a Context-Dependent Manner. *Int. J. Mol. Sci.* 19(10):3141, 2018, 査読有, <https://doi.org/10.3390/ijms19103141>
- [4] Adachi E, Sakai K, Nishiuchi T, Imamura R, Sato H, Matsumoto K. Different growth and metastatic phenotypes associated with a cell-intrinsic change of Met in metastatic melanoma. *Oncotarget* 7(43):70779-70793, 2016, 査読有, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12221>
- [5] Umitsu M, Sakai K, Ogasawara S, Kaneko MK, Asaki R, Tamura-Kawakami K, Kato Y, Matsumoto K, Takagi J. Probing conformational and functional states of human hepatocyte growth factor by a panel of monoclonal antibodies. *Sci. Rep.* 6:33149, 2016, 査読有, <https://doi.org/10.1038/srep33149>
- [6] Isozaki H, Ichihara E, Takigawa N, Ohashi K, Ochi N, Yasugi M, Ninomiya T, Yamane H, Hotta K, Sakai K, Matsumoto K, Hosokawa S, Bessho A, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K. Non-Small Cell Lung Cancer Cells Acquire Resistance to the ALK Inhibitor Alectinib by Activating Alternative Receptor Tyrosine Kinases. *Cancer Res.* 76(6):1506-1516, 2016, 査読有, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1010

[学会発表](計15件)

- [1] Sakai K, Furuhashi H, Shibata M, Matsumoto K. HS-AFM revealed unexpected mechanism of MET receptor activation. The 1st NanoLSI International Symposium. Feb 21, 2018 (Tokyo)
- [2] Sato H, Sakai K, Mukai H, Watanabe Y, Passioura T, Suga H, Matsumoto K. PET imaging system reflecting activation status of HGF/Met signalling with macro-cyclic peptides. The 1st NanoLSI International Symposium. Feb 21, 2018 (Tokyo)
- [3] Imamura R, Sato H, Sakai K, Matsumoto K. Novel biological function of HGF receptor Met in immune responses. The 1st NanoLSI International Symposium. Feb 21, 2018 (Tokyo)
- [4] 岩佐奈美、有森貴夫、酒井克也、松本邦夫、加藤幸成、高木淳一 X線結晶構造解析によ

る HGF の活性変換メカニズムの解明 第 18 回日本蛋白質科学会年会、2018 年 6 月 26～28 日(新潟)

- [5] 岩佐奈美、有森貴夫、酒井克也、松本邦夫、加藤幸成、高木淳一 HGF の活性変換メカニズムの解明に向けた精製と結晶化 日本生化学会、2018 年 9 月 24 日(京都)
- [6] Miao Wenyu、酒井克也、伊藤健一郎、菅裕明、松本邦夫 選択的生物活性をもつ環状ペプチドによる MET/HGF 受容体アゴニストの創成 第 91 回日本生化学会、2018 年 9 月 25 日(京都)
- [7] 佐藤拓輝、酒井克也、今村龍、松本邦夫 HGF の局所的活性化に起因する転移性ニッチ形成機構 第 77 回日本癌学会総会、2018 年 9 月 29 日(大阪)
- [8] 今村龍、佐藤拓輝、酒井克也、松本邦夫 増殖因子受容体 Met が寄与する感染防御機構 第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 28 日(横浜)
- [9] Miao Wenyu、酒井克也、小澤直也、伊藤健一郎、菅裕明、松本邦夫 Activation and detection of Met/HGF receptor by cyclic peptide technology. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 30 日(横浜)
- [10] 佐藤拓輝、足立恵理、酒井克也、今村龍、松本邦夫 HIntrinsic HGFG induced by cancer cells promotes lung metastasis in Met-high expressing melanomas. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 30 日(横浜)
- [11] Miao Wenyu、酒井克也、小澤直也、伊藤健一郎、菅裕明、松本邦夫 特殊環状ペプチドからなる人工 MET/HGF 受容体アゴニストの細胞内シグナル・遺伝子発現制御特性. 第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日(仙台)
- [12] 酒井克也、伊藤健一郎、鈴木芳典、小澤直也、菅裕明、松本邦夫 特殊環状ペプチドによる人工 Met アゴニスト. 第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日(仙台)
- [13] 足立恵理、酒井克也、今村龍、松本邦夫 B16F10 メラノーマの造腫瘍性/転移性における Met 階層的発現の意義 第 75 回日本癌学会総会、2016 年 10 月 8 日(横浜)
- [14] 海津正賢、有森貴夫、酒井克也、小笠原諭、北郷悠、金子美華、加藤幸成、松本邦夫、高木淳一 HGF/c-Met シグナリングの解明に向けた二本鎖 HGF の構造決定. 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日(横浜)
- [15] 今村龍、Jangphattananont Nawaphat、酒井克也、松本邦夫 Purification and functional analyses of multi-functional cytokine Lect2. 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日(横浜)

〔図書〕(計 3 件)

- [1] ものづくり技術からみる再生医療 -細胞研究・創薬・治療-, 酒井克也、松本邦夫、シーエムシー出版、282 ページ、2018 年 3 月
- [2] 環状ペプチドからなる人工増殖因子の創成, 松本邦夫、酒井克也、菅裕明、MEDCHEM NEWS, 28: 110-114, 2018 年 3 月
- [2] 医療・診断をささえるペプチド科学 再生医療・DDS・診断への応用、松本邦夫、酒井克也、菅裕明、シーエムシー出版、183-188 ページ、2018 年 10 月

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：環状ペプチド

発明者：菅裕明、松本邦夫、酒井克也

権利者：

種類：特許

番号：特願 2018-167102

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

金沢大学 がん進展制御研究所 腫瘍動態制御研究分野
<https://www.k-matsumoto-kanazawa-u.org/>

金沢大学 WPI ナノ生命科学研究所
<https://nanolsi.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
該当なし

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。