

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18875

研究課題名(和文) タンパク質間相互作用を標的とした遺伝性アミロイドーシスの創薬研究

研究課題名(英文) Peptide ligand screening of transthyretin protein-protein interaction inhibitor using phage display system

研究代表者

佐藤 卓史 (SATO, Takashi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：70555755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)は、トランスサイレチン(TTR)の変異体が細胞外に分泌された後に、アミロイド線維を形成し、全身諸臓器に沈着する疾患である。我々は、変異型TTRを細胞内で分解し、細胞外への分泌を阻害することでFAPの発症を抑制する治療薬の開発を目指している。本研究では、その創薬標的であるTTR四量体化阻害剤のシース探索をファージディスプレイ法を用いたペプチドリガンドスクリーニングにより行った。スクリーニングの結果、TTRに結合する3種類の環状ペプチドを同定し、うち2種類の環状ペプチドはTTRの四量体および単量体構造を不安定化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP) is one of the systemic amyloidosis, which is caused by a point mutation in transthyretin (TTR). Because mutant TTR forms amyloid fibrils after secretion from the cells, we believed that secretory inhibition of mutant TTR followed by their intracellular degradation could be a potential drug target for FAP. We previously demonstrated that inhibition of TTR tetramerization in the endoplasmic reticulum blocks secretion of mutant TTR. In this study, we aimed to determine peptides that could inhibit TTR tetramerization using the phage display system. Here, we identified three cyclic peptides that bind to TTR. Two of the three peptides could destabilize conformations of tetrameric and monomeric TTRs.

研究分野：生物系薬学

キーワード：トランスサイレチン 家族性アミロイドポリニューロパチー ファージディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) はトランスサイレチン (TTR) の遺伝子変異により発症する遺伝性難病である。TTR タンパク質は小胞体で四量体を形成し、細胞外へ分泌される。変異型 TTR は野生型と比べて四量体構造が不安定化しており、細胞外環境で四量体から単量体に解離しやすい。解離した単量体 TTR は変性した後、細胞毒性を示す凝集体を形成し、さらに重合してアミロイド線維となる。

FAP の治療法として TTR の主要な産生臓器である肝臓を置換し、変異型 TTR の発現を抑制する肝移植が実施されてきたが、ドナー不足や心身共に負担が大きい等の問題から新規治療薬の開発が切望されている。治療薬開発の現状としては、四量体 TTR に結合し、アミロイド形成過程の律速段階である四量体から単量体への解離を抑制する TTR 四量体安定化剤が臨床で使用されている。また、肝臓における TTR の発現を抑制する siRNA 等の核酸医薬の臨床試験が現在実施されている。これら FAP 治療薬は重症度が高い患者、移植後の患者は適応外であり、症状が進行した発症後期の患者に対する作用は不明であるため汎用性が低い点が問題となる。上記問題を克服するためには、著効を示す肝臓移植と同様に変異部位により治療効果が変わらず、変異型 TTR の発現を選択的に抑制する新規治療薬の開発が必要であると我々は考えている。

上記の研究動向を踏まえて肝臓移植の代替となる治療薬の開発を究極の目的とし、我々は変異型 TTR の分泌を抑制し、細胞内分解を誘導する新規治療法の創薬標的の探索を行ってきた。20 種類以上の変異型 TTR を用いて細胞内での TTR の分泌・分解の制御機構を解析したところ、小胞体内における TTR 四量体化阻害が、野生型 TTR の分泌には影響を与えず、評価した全ての変異型 TTR の分泌を抑制し、プロテアソームによるタンパク質分解を介して変異型 TTR を除去できることを見出した (EMBO J. 2007, J Biol Chem. 2009)。さらに、変異型 TTR の分解機構の解析から、通常の分解経路が飽和あるいは障害を受けた場合においても、変異型 TTR は N 型糖鎖修飾を受けることで別の分解経路により効率的に除去されることを発見した (Mol Cell. 2012)。したがって、我々が創薬標的として同定した小胞体内 TTR 四量体化阻害は、変異型 TTR の分泌を選択的に抑制し、細胞内に蓄積させることなく変異型 TTR を除去できるため、肝臓移植と同等の治療効果を示し、かつ移植による種々の問題を克服できる新規治療法になると期待される。

上記の研究では、変異導入により TTR の四量体化を阻害していたため、本治療戦略を創薬へと応用するためには四量体化阻害剤の開発が必要になる。しかし、TTR 四量体化を阻害する既知の候補化合物はない。そこで、*in silico* スクリーニングを行い、TTR 単量

体間の相互作用に関わるポケット構造を標的とした化合物の選別を行った。ヒット化合物の変異型 TTR の分泌抑制作用を培養細胞を用いて評価したが著効を示す化合物は同定できなかった。本結果より、TTR 四量体化阻害剤の標的探索をポケット構造からタンパク質間相互作用面へと方針変更する必要があると考えた。ポケット構造に対する探索を得意とするドッキング技術とは異なり、接触面積が広範で比較的扁平な相互作用面を標的とする化合物を *in silico* スクリーニングにより絞り込むことは容易ではない。そこで、タンパク質相互作用面を標的とした化合物探索を展開するために、TTR 四量体化の阻害に関わる相互作用面をペプチドリガンドスクリーニングにより同定する研究計画を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、TTR 四量体化の阻害に関わるタンパク質間相互作用面を同定し、変異型 TTR の分泌を選択的に抑制する創薬候補ペプチドの取得を目指す。具体的には、以下の研究を行う。

(研究 1) ランダムペプチドを提示するファージライブラリを用いたバイオパニング法により TTR 四量体化阻害ペプチドを同定する。

(研究 2) ヒットペプチドと TTR との相互作用および結合部位の構造情報を Native PAGE、等温滴型定熱量測定法 (ITC)、示差走査型蛍光定量法 (DSF) および核磁気共鳴分光法 (NMR) 用いて明らかにする。

(研究 3) ヒットペプチドによる変異型 TTR の分泌抑制能を培養細胞を用いて評価する。

3. 研究の方法

(研究 1) ファージディスプレイ法による TTR 四量体化阻害ペプチドの探索・同定

直鎖状ランダムペプチド (12 ペプチド) および環状ランダムペプチド (7 ペプチド) を提示する M13 ファージライブラリを用いてバイオパニング法により TTR の単量体間の相互作用面に結合するペプチドを探索した。バイオパニングでは、TTR の単量体間の相互作用面に結合するペプチドのヒット効率を上げるために 2 段階スクリーニングを行った。1 次セクションでは、分子表面に結合するファージを除去するためにベイトとして四量体 TTR を用いた。2 次セクションでは、1 次セクションの未結合ファージを用いて TTR の単量体間の相互作用面に結合するファージを選別するために、ベイトとして野生型または FAP 変異を導入した Monomeric TTR (M-TTR: 相互作用面への変異導入により単量体化した TTR) を行いた。上記セクションを 3 回繰り返してファージを濃縮し、DNA シークエンシングによりペプチド配列を決

定した (図 1)。

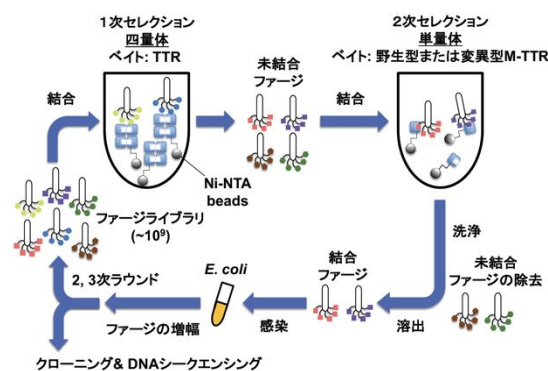


図 1 スクリーニング方法

(研究 2) ペプチド結合部位の同定、及び TTR-ペプチドの相互作用解析

ヒットした環状ペプチドと TTR との結合を評価するために、蛍光標識した環状ペプチドを合成した。各種 TTR 変異体と蛍光標識環状ペプチドをインキュベーションし、環状ペプチド-TTR 複合体の形成およびペプチドの結合に伴う四量体 TTR および単量体 TTR の構造状態の変化を Native PAGE により評価した。環状ペプチド-TTR 複合体形成の至適温度、至適 pH、至適時間の検討を行った。環状ペプチド-TTR 複合体の構造安定性は DSF および Native PAGE により評価した。単量体 TTR とヒットペプチドの相互作用に関する熱力学的パラメーターを得るために ITC を行った。

(研究 3) 変異型 TTR の分泌抑制を指標にした表現型アッセイによるペプチドの活性評価

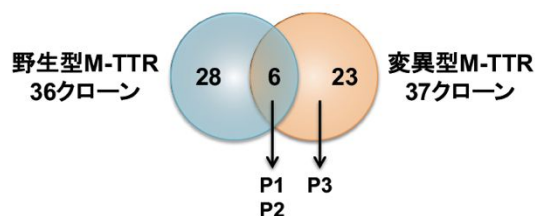
小胞体シグナルペプチドの下流に環状ペプチド配列、C 末端に小胞体局在化シグナル配列 (KDEL) を挿入した発現プラスミドを作製した。作製した発現プラスミドを野生型 TTR 及び変異型 TTR 安定発現細胞株に導入し、分泌 TTR (培養上清)、細胞内 TTR (細胞ライセート) の発現量をウエスタンブロッティングにより調べた。

4. 研究成果

(研究 1) ファージディスプレイ法による TTR 四量体化阻害ペプチドの探索・同定

ファージディスプレイの結果、直鎖状ペプチドを掲示するライブラリーにおいてはファージクローンの濃縮が観察されなかった。したがって、構造自由度の高い直鎖状ペプチドは M-TTR に対する結合能が低いことが示唆された。一方、環状ペプチドを掲示するライブラリーにおいてはファージクローンの濃縮が観察された。2 次セクションにおいて、野生型 M-TTR をベイトにして得られたヒットファージ 36 クロウンを回収し、遺伝子配列を解析したところ、28 種類のペプチド配列が

得られた。変異型 M-TTR をベイトにして得られたヒットファージ 37 クロウンを回収し、遺伝子配列を解析したところ、23 種類のペプチド配列が得られた。両者に共通するペプチドは 6 種類あり、うち 2 種類 (P1, P2) についてはペプチドの出現頻度が高かった。一方、変異型 M-TTR のみに観察される出現頻度が高いペプチドとして P3 を同定した (図 2)。



ペプチド No.	全クローンに占める各配列の出現頻度	
	野生型 M-TTR	変異型 M-TTR
P1	7/36	12/37
P2	3/36	3/37
P3	-	2/37

図 2 野生型および変異型 M-TTR に結合する環状ペプチドのファージクローンの分類

(研究 2) ペプチド結合部位の同定、及び TTR-ペプチドの相互作用解析

ファージディスプレイで同定した 3 種類の環状ペプチド (P1-3) を合成し、TTR および M-TTR への結合を評価した。Native PAGE を用いた解析により、蛍光標識した環状ペプチドの TTR への結合能はファージディスプレイでのクローンの出現率と相関することが明らかになった。また、環状ペプチドの M-TTR への結合能は野生型に比べて変異型の方が高いことが明らかになった。したがって、今回取得した環状ペプチドはネイティブ状態の単量体 TTR よりもアンフォールド状態の単量体 TTR に対して高い結合性を示す可能性が示唆された。次に、環状ペプチドと野生型 M-TTR との相互作用に関する熱力学的パラメーターを得るために ITC による解析を行った。野生型 M-TTR の入ったサンプルセルに滴定シリンジ中のペプチドを滴定し攪拌していったが、各滴定の発生熱量を測定することができなかった。そこで、滴定後のサンプルを回収したところ、野生型 M-TTR が凝集していることがわかった。本結果は環状ペプチドが野生型 M-TTR に結合して単量体構造を不安定化するためではないかと考えた。そこで、DSF を用いて環状ペプチドと野生型 M-TTR との相互作用を検討した。一般的にリガンドが標的タンパク質に結合すると、標的タンパク質の変性に必要なエネルギーはタンパク質単体の変性に必要なエネルギーに加えて、タンパク質からリガンドを解離するために必要なエネルギーが加算されるため、DSF 解析で得られる変性中点温度 (T_m) はリガンド非存在下と比べて高温側にシフトする。DSF の解析

結果より、一部の環状ペプチドではペプチド非存在下と比べて T_m が低温側にシフトするという興味深い知見を得た。この結果は、本環状ペプチドが野生型 M-TTR に結合して、単量体の構造安定性を低下させる作用を有することを示唆している。最後に、TTR の四量体構造に与える環状ペプチドの影響を調べた。環状ペプチドの添加により、環状ペプチド-四量体 TTR 複合体が新たに形成されたが、単量体 TTR への解離は観察されなかった。そこで、環状ペプチド-四量体 TTR 複合体の熱安定性を評価したところ、ネイティブ状態の四量体と比べて、複合体状態の四量体は熱安定性が低いことが明らかになった。したがって、今回同定した環状ペプチドは TTR の四量体構造を不安定化する作用は有するものの、四量体化を阻害する活性は示さないことが示唆された。現在、環状ペプチドの TTR 結合部位を明らかにするために核磁気共鳴分光法による解析を行っている。

(研究3) 変異型 TTR の分泌抑制を指標にした表現型アッセイによるペプチドの活性評価

ファージディスプレイで同定した3種類の環状ペプチドが変異型 TTR の分泌を抑制するか上記の方法を用いて評価したところ、いずれの環状ペプチドも変異型 TTR の分泌には影響を与えなかった。しかし、小胞体内で TTR の構造が不安定化した際に観察される N 型糖鎖付加 TTR が環状ペプチドを過剰発現した細胞内でわずかに増加した。したがって、環状ペプチドは細胞内において活性は弱いながらも四量体 TTR を不安定化する作用を示すことが示唆された。本検討では小胞体内の酸化環境においてペプチド配列中の2つのシステイン残基がジスルフィド結合を形成して環状化する受動的なシステムを用いたため、発現したペプチドの環状化の効率が低く、四量体 TTR の不安定化が不十分であった可能性が考えられる。今後は化学合成した環状ペプチドをトランスフェクションにより小胞体に導入して変異型 TTR の分泌抑制作用を評価する予定である。

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 2件)

1. Fukuda N, Noi K, Weng L, Kobashigawa Y, Miyazaki H, Wakeyama Y, Takaki M, Nakahara Y, Tatsuno Y, Uchida-Kamekura M, Suwa Y, Sato T, Ichikawa-Tomikawa N, Nomizu M, Fujiwara Y, Ohsaka F, Saitoh T, Maenaka K, Kumeta H, Shinya S, Kojima C, Ogura T, Morioka H. Production of Single-Chain Fv Antibodies Specific for GA-Pyridine, an Advanced Glycation End-Product (AGE),

with Reduced Inter-Domain Motion. *Molecules*. 2017 Oct 10;22(10). pii: E1695. 査読有、doi: 10.3390/molecules22101695.

2. Koga T, Shiraki N, Yano S, Suico MA, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Kume S, Kai H. Mild electrical stimulation with heat shock guides differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing cells within the definitive endoderm. *BMC Biotechnol.* 17(1):14, 2017 査読有、doi: 10.1186/s12896-017-0331-z.

[学会発表](計 5件)

1. 佐藤 卓史、小橋川 敬博、甲斐 広文、森岡 弘志 トランスサイレチンのタンパク質間相互作用を標的とした遺伝性 ATTR アミロイドーシスの創薬研究 第5回生命分子科学研究会 2018年3月7-9日 熊本

2. 河野 慎吾、小橋川 敬博、甲斐 広文、森岡 弘志、佐藤 卓史 トランスサイレチン単量体の動的な構造平衡状態の解析 第5回生命分子科学研究会 2018年3月7-9日 熊本

3. 稲田 祐貴、河野 慎吾、小橋川 敬博、森岡 弘志、佐藤 卓史 トランスサイレチンの品質管理における小胞体分子シャペロンの基質認識機構の解明 第5回生命分子科学研究会 2018年3月7-9日 熊本

4. 佐藤卓史、河野慎吾、稲田祐貴、小橋川敬博、甲斐広文、森岡弘志 トランスサイレチンのタンパク質間相互作用を標的とした家族性アミロイドポリニューロパチーの創薬研究 第12日本ケミカルバイオロジー学会年会 2017年6月7-9日 北海道

5. 河野慎吾、稲田祐貴、小橋川敬博、甲斐広文、森岡弘志、佐藤卓史 トランスサイレチン単量体の構造安定化を標的とする創薬スクリーニング系の構築 第12日本ケミカルバイオロジー学会年会 2017年6月7-9日 北海道

[その他]

ホームページ等

<http://seimeibunseki.org>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 卓史 (SATO, Takashi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬学系)・助教

研究者番号: 70555755