

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19014

研究課題名(和文) 新奇抗癌剤開発を目指した低分子量Gタンパク質Arf6シグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of Arf6 signaling mechanism to generate novel anticancer drugs

研究代表者

片桐 尚宏 (Katagiri, Naohiro)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70755686

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)：腫瘍血管新生と癌細胞の浸潤・転移に関する低分子Gタンパク質ARF6を特異的に抑制するペプチドの作製を目的に本研究を行った。初めにファージディスプレイ法を用いて、ARF6に結合するペプチドのスクリーニングを行った。ランダムな39アミノ酸からなるペプチドを発現させるファージライブラリーを用いて、スクリーニングを行った結果、71種類のARF6に結合するペプチドを同定した。また同定したペプチドのARF6結合能をELISAにより評価した。さらに同定したArf6結合ペプチドのArf6抑制能を、蛍光ヌクレオチド交換法により評価した結果、Arf6特異的な抑制能を持つペプチドの同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out to generate peptides that specifically suppress the small molecule G protein ARF6 involved in tumor angiogenesis and cancer cell invasion / metastasis. First, peptides binding to ARF6 were screened by using the phage display assay. As a result of screening using a phage library expressing a peptide consisting of random 39 amino acids, 71 kinds of peptides that bind to ARF6 were identified. The ARF6 binding ability of the identified peptides were confirmed by ELISA. Furthermore, Arf6 inhibitory ability of the identified Arf6-binding peptide were evaluated by fluorescent nucleotide exchange assay. As a result of the experiments, several peptides showed Arf6 specific inhibitory ability.

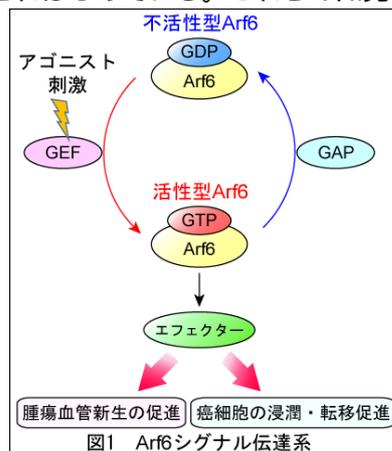
研究分野：分子生物学

キーワード：Arf6

1. 研究開始当初の背景

癌細胞は原発巣で増殖して腫瘍を形成し、また、浸潤・転移して転移巣でも腫瘍を形成する。従って、腫瘍形成と癌細胞の浸潤・転移の両者を同時に抑制する抗癌剤が望まれる。低分子Gタンパク質のARFファミリーはARF1-6までの6種のアイソフォーム（ヒトでは5種）が存在しており、アミノ酸配列の相同性からクラス I (ARF1-3)、クラス II (ARF4、5)、クラス III (ARF6) の3つのクラスに分類されている。その中でもクラス IIIのARFタンパク質であるARF6が腫瘍血管新生と癌細胞の浸潤・転移の両方に関与することが報告されており、注目されている。申請者の研究グループでは、近年、血管内皮細胞に発現する低分子量Gタンパク質Arf6が腫瘍血管新生を制御して腫瘍形成を亢進することを見出した。また、癌細胞に発現するARF6が細胞膜輸送および細胞骨格を制御することで、浸潤・転移能を亢進させていることが数々の研究グループにより報告されはじめている。これらの知見

は、ARF6シグナル伝達系を標的として新奇抗癌剤を開発できることを示唆している（図1）。



2. 研究の目的

本研究では、ARF6シグナル伝達の分子メカニズムを解明し、そのシグナル伝達を阻害することにより腫瘍形成と癌細胞の浸潤・転移の両者を同時に抑制するペプチドを創成して、新奇抗癌剤の開発に貢献できる研究基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

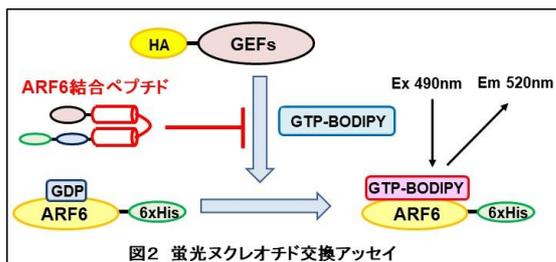
ARF6抑制ペプチドの創成のために、ARF6抑制ペプチドのスクリーニングと、ペプチドのARF6抑制能を *in vitro* で評価できる系の確立を行った。

ARF6抑制ペプチドのスクリーニングには、中程度の分子量をもつランダムなアミノ酸配列をもつタンパク質を発現させることができ、発現させたアミノ酸配列をDNA塩基配列として確認可能なファージディスプレイ法を用いた。使用したファージライブラリーは、ランダムアミノ酸配列を含む39アミノ酸からなるペプチドを発現させるDNA配列を持つ。この39アミノ酸からなるペプチドは、N末端およびC末端に16アミノ酸からなるHelix構造、その間に7アミノ酸からなるLoop構造を持つ

(Helix-Loop-Helix構造)。ARF6は通常時はGDPの結合した不活性化型として細胞内に存在し、細胞内外からの刺激によりGTPの結合した活性化型となる。本研究ではARF6の活性化を阻害するペプチドを同定するために、ARF6不活性化型変異体 (ARF6T27N) を大腸菌から精製し、標的タンパク質として使用した。以上の条件においてスクリーニングをround 4まで行い、ARF6結合ペプチドを同定した。同定ARF6結合ペプチドのアミノ酸配列は、ファージDNA配列を解析することで同定した。同定したARF6結合能を持つペプチドのDNA配列を大腸菌発現用ベクターに組み込み、大腸菌に発現させることでペプチドを作製し、ARF6特異的に結合するかを確認するためにELISAを行った。

さらに同定したペプチドのARF6抑制能を *in vitro* で評価するために、蛍光ヌクレオチド交換アッセイの確立を行った。蛍光ヌクレオチド交換アッセイでは、タンパク質に結合した時のみ蛍光発色する特殊な蛍光で標識されたGTP (GTP-BODIPY) を用いることで、タンパク質とGTPの結合を蛍光強度を測定することで評価できる。ARF6はGDP/GTP交換因 (GEF) によりGTPと結合し、活性化状態となるため、

ARF6とGTPの結合を評価することで、ARF6の活性を測定できる。蛍光ヌクレオチド交換アッセイのために、大腸菌を用いてARF6と、ARF6のGEFであるARNO、さらに他のARFファミリータンパク質ARF1およびARF5を作製し、ペプチドのARF6特異性評価の評価を行った(図2)。



4. 研究成果

腫瘍血管新生と癌細胞の浸潤・転移を同時に阻害するARF6抑制ペプチドの創成のために、ARF6抑制ペプチドのスクリーニングと、ペプチドのARF6抑制能を*in vitro*で評価できる系の確立を行った。

初めにファージディスプレイ法を用いて、ARF6に結合するペプチドのスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、71種類のARF6に結合するペプチドのアミノ酸配列を同定した。次にスクリーニングにより同定したARF6結合能を持つペプチドを大腸菌により作製し、ARF6特異的結合能をELISAで評価した。ELISAの結果、同定したペプチドはARF6に結合したが、ARF1とARF5には結合しなかったことから、ファージディスプレイによりARF6特異的な結合能を持つペプチドを同定できた。

次にペプチドのARF6抑制能を*in vitro*で評価するために、蛍光ヌクレオチド交換アッセイの確立を行った。大腸菌で作製したARF6と、ARF6のGEFであるARNO、さらにGTP-BODIPYを反応させた結果、ARNOの濃度依存的な蛍光強度の増加が確認できなかった。論文を検索した結果、ARF6は細胞外の*in vitro*条件下においてN末端の13アミノ酸がヌクレオチド交換反応を阻害することが示唆されていた。そこでN末端の13アミノ酸を欠失させた変異体

ARF6(d13ARF6)を作製し、作製したd13ARF6を用いて、再度蛍光ヌクレオチド交換アッセイが機能せるかを評価した。大腸菌で作製したd13ARF6と、ARF6のGEFであるARNO、さらにGTP-BODIPYを反応させた結果、ARNOの濃度依存的な蛍光強度の増加を確認できた。またARF6と同様にN末端のアミノ酸を欠損させた変異体ARF1 (d17ARF1)および変異体ARF5 (d17ARF5)を作製し、ARNOの濃度依存的な蛍光強度の増加を確認した。

確立した蛍光ヌクレオチド交換アッセイを用いて、同定したARF6結合ペプチドのARF6抑制能を評価した。大腸菌で作製したARNOによりd13ARF6のGTP-BODIPY結合促進が、ARF6結合ペプチドによって抑制されるかを、蛍光強度を計測することで評価した。その結果、いくつかのペプチドにおいて、ARNOによるd13ARF6のGTP-BODIPY結合促進が抑制された。すなわち同定したペプチドのGEF依存的なARF6の活性化抑制能を確認することができた。同様にARNOによるd17ARF1およびd17ARF5の活性化を、同定したペプチドが抑制するかを評価したところ、ARF6抑制ペプチドはARF1およびARF5の活性化を抑制しないことが示された。以上の結果から、ファージディスプレイにより同定したARF6結合ペプチドはARF6特異的な活性化阻害能を持つことが示された。

さらに同定したペプチドの細胞内での機能の評価するために、細胞膜透過性を向上を目的として、39アミノ酸からなるARF6抑制ペプチドのN末ヘリックス領域の6つのアミノ酸をアルギニンに置換し、有機合成により作製した。また同定したペプチドはシステイン同士ジスルフィド結合により環状構造を形成していたが、ジスルフィド結合は還元条件に弱く、細胞内・生体内での安定性に不安がある。そこで現在、研究協力者の大阪府立大学藤井郁夫教授とペプチド両端を、安定なチオエーテル結合により環状化し、細胞内およびマウス生体内でのペプチド機能の評価を行う準備

を行っている。またARF6とARF6抑制ペプチドとの結合領域の解明のため核磁気共鳴（NMR）用のサンプルを作製した。安定同位体¹³Cおよび¹⁵Nに完全置換させた培地で、大腸菌を用いてARF6を作製し、現在解析を行う外部研究機関を探している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6．研究組織

(1)研究代表者

片桐 尚宏 (Katagiri Naohiro)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：70755686

(4)研究協力者

藤井 郁夫 (Fujii Ikuo)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授

藤原 大祐 (Fujiwara Daisuke)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・助教