

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05359

研究課題名(和文) 耐性変異克服へ向けた「キナーゼドメイン間相互作用阻害型」新規キナーゼ阻害剤の創製

研究課題名(英文) Production of peptide that associate to the dimer interface of kinase domains

研究代表者

小橋川 敬博 (Kobashigawa, Yoshihiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・准教授

研究者番号：90455600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：受容体型チロシンキナーゼの一種であるFGFR1のキナーゼドメイン間相互作用面に結合するヘリックス-ループ-ヘリックス構造を持つペプチド(HLHペプチド)を作製した。このペプチドがFGFR1のキナーゼドメインに結合すること、FGFR1の自己リン酸化を亢進することを見出した。HLHペプチドはマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質として調製したが、MBP融合タンパク質の精製において、安価なデンプンがアフィニティークロマトグラフィー担体として利用できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、受容体型チロシンキナーゼを活性化するペプチドを見出した。ペプチドの生産には大腸菌発現系を用いたが、ペプチド鎖長上は化学合成でも生産可能である。受容体型チロシンキナーゼを活性化するタンパク質(成長因子・細胞増殖因子)は細胞培養の際に試薬として使用される。それらは、複雑な構造を有し、生産ロット間の品質のばらつきにつながる。今後、さらなる研究は必要だが、受容体型チロシンキナーゼを活性化するペプチドを化学合成したものが代替できれば、生産ロット間の品質格差の抑制につながる。

研究成果の概要(英文)：Receptor tyrosine kinases transiently form inter-kinase domain dimers during activation. In this study, we attempted to search for peptides that bind to the dimer interface between kinase domains of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1). The helix G plays an important role in the interaction between kinase domains of FGFR1. Therefore, an interaction residue between kinase domains of helix G was introduced into one of the helices of a peptide that forms helix-loop-helix structure (HLH peptide). As a result, it was found that this peptide binds to the kinase domain of FGFR1 and enhances the auto-phosphorylation of FGFR1. The HLH peptide was prepared as a fusion protein with maltose-binding protein (MBP). It was also revealed that inexpensive corn starch can be used as an affinity chromatography carrier for the purification of the MBP fusion proteins.

研究分野：構造生物化学

キーワード：線維芽細胞増殖因子受容体 チロシンキナーゼ 二量体

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼは基質となるタンパク質のチロシン残基のリン酸化を触媒することで細胞内シグナル伝達のトリガーとして機能するタンパク質ファミリーである。細胞増殖・分化・遊走などに関わっている。チロシンキナーゼの活性は正常細胞では厳密に制御されているが、多くのがん細胞ではその活性が亢進しており、チロシンキナーゼは抗癌剤開発の主要な標的タンパク質である。これまでに数多くのチロシンキナーゼ阻害薬が開発され、臨床において使用されてきた。しかし、薬剤耐性変異体の出現が問題となっている。本研究課題の当初の目的は、薬剤耐性変異体の克服を目指して、チロシンキナーゼの活性化に関わるキナーゼドメイン間相互作用面を標的とした新しいタイプのチロシンキナーゼ阻害剤の創製に資することである。

現在使用されるチロシンキナーゼ阻害薬は基質である ATP の結合を妨げる ATP 拮抗阻害薬である。これまでの研究で、FGFR1 の薬剤耐性変異体の 1 種において、ATP に対する親和性の向上が阻害剤耐性機構であることを報告しており (Yoza *et al.*, *Gene to Cells*, 2016)、EGFR においても同様の報告がなされている (Yoshikawa *et al.*, *Oncogene*, 2012; ; Yun *et al.*, *Cancer Cell*, 2007; Yun *et al.*, *PNAS*, 2008)。そのため、ATP に対する親和性の向上がキナーゼ間で共通する薬剤耐性機構の一つとなっている可能性が高く、ATP 結合部位以外を標的とした阻害剤の創製が薬剤耐性変異体を克服する上で有効な手段となり得る。本研究課題では、受容体型チロシンキナーゼが活性化される際にキナーゼドメイン間で過渡的に 2 量体構造を形成することに着目し、その相互作用面を標的とした阻害ペプチドを創製することを目的とした。

2. 研究の目的

チロシンキナーゼは、触媒ドメインであるキナーゼドメイン内の活性化ループにあるチロシン残基のリン酸化により活性化される。受容体型チロシンキナーゼは、ホモ 2 量体形成を基軸としてキナーゼドメイン同士が近接し、互いにリン酸化し合うことで活性化される。2007 年の Kuriyan らによる EGFR に関する報告 (Zhang *et al.*, *Cell*, 2006) 以降、キナーゼドメイン間で過渡的に 2 量体構造を形成することがキナーゼドメイン自身のリン酸化において必須であることが明らかにされつつある。これまでに FGFR1 の活性化ループのリン酸化に関わるキナーゼドメイン間 2 量体構造を解析し、① リン酸化部位周辺だけではなく、広い相互作用面を有すること、② 塩橋等の特異的な相互作用が形成されており、特異的かつ広い相互作用面を用いて基質となるキナーゼを識別していること、③ 既知の構造との比較からキナーゼドメイン間 2 量体構造がキナーゼ間で異なることを明らかにしてきた (Kobashigawa *et al.*, *Gene to Cells*, 2015)。本研究課題では活性化ループのリン酸化に関わるキナーゼドメイン間 2 量体構造が ATP 結合ポケットに替わる新たなキナーゼ阻害薬開発の標的部位となり得るか、さらには薬剤耐性変異体に対しても効果を示す標的部位となり得るかについて明らかにする。FGFR1 は、活性化ループのチロシン残基のリン酸化により、500-1000 倍程度に活性が亢進する (Lew *et al.*, *Mol Cell*, 2009)。がん変異のみでは数倍程度だが、この数倍が活性化ループのリン酸化を介してさらに増幅されることが、がん変異体の本態と言える。そのため、活性化の初期段階である活性化ループのリン酸化を阻害することが、チロシンキナーゼの機能を阻害する上で重要であると考えられる。

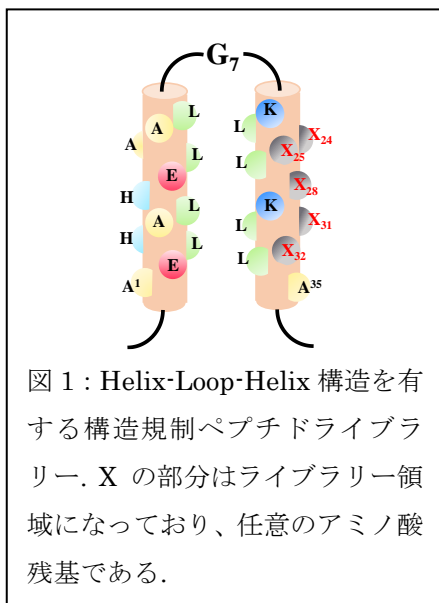
3. 研究の方法

本研究課題では、活性化ループのリン酸化に関わるキナーゼドメイン間 2 量体構造が ATP 結合ポケットに替わる新たなキナーゼ阻害薬開発の標的部位となり得るか、さらには薬剤耐性変異体に対する標的部位となり得るかについて明らかにする。具体的には、(1) フェージディスプレイ法を用いてペプチドライブラリーより、キナーゼドメイン間相互作用面に結合するペプチド配列を取得する。(2) 得られたペプチドについて、大腸菌発現系により調製し、物理化学的手法により FGFR1 との結合を評価する。(3) *in vitro* のリン酸化実験により阻害活性を生化学的手法により評価する。(4) ペプチドによるキナーゼドメイン間相互作用阻害能を物理化学的手法により確認する。(5) 薬剤耐性変異体についても同様の実験を行い、キナーゼドメイン間相互作用面が薬剤耐性変異体克服へ向けた新たな創薬標的となり得るかについて明らかにする。

4. 研究成果

(1) ファージディスプレイによる FGFR1 に結合するペプチドの探索

これまでの研究において FGFR1-FGFR1 キナーゼドメイン間二量体構造を解析し、helix-G がキナーゼドメイン間の相互作用において重要であることを明らかにしている。そこで、ファージディスプレイを用いて、FGFR1 のキナーゼドメイン間相互作用面に結合するペプチドの探索を試みた。探索の際、キナーゼドメイン間相互作用において helix-G が重要であることを考慮し、ランダム構造を持つペプチドライブラリーではなく、Helix-Loop-Helix (HLH) 構造を有する構造規制ペプチドの一つの面にライブラリー領域が設定されたものを用いた (図 1)。その結果、ライブラリー領域においてアミノ酸出現頻度の偏りがみられた。32 番目以外の部位では、Pro が高い頻度で出現していた。Pro はヘリックス構造を破壊するアミノ酸であるため、得られたペプチドは当初の予想に反し、ヘリックス構造を有していないと考えられた。



	F	G	L	P	S	others
24	5	1	0	4	2	7
25	2	3	4	3	2	5
28	2	1	5	3	1	7
31	4	1	0	4	3	7
32	5	1	3	0	4	6

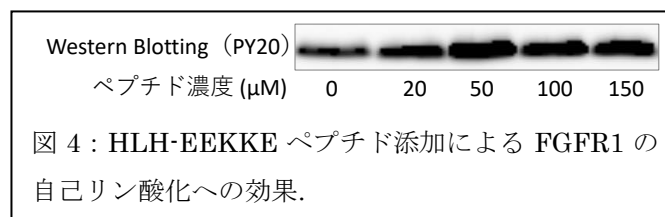
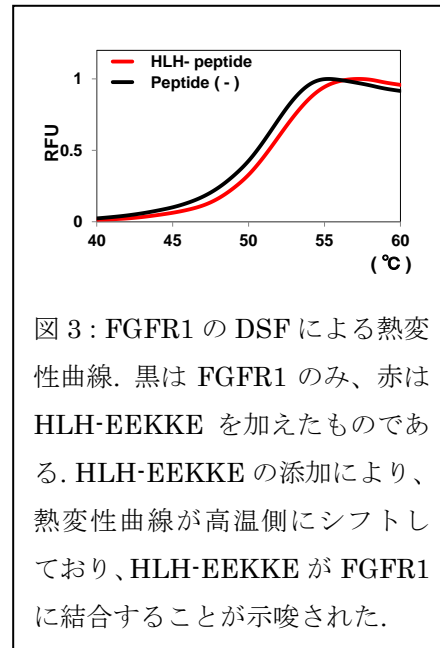
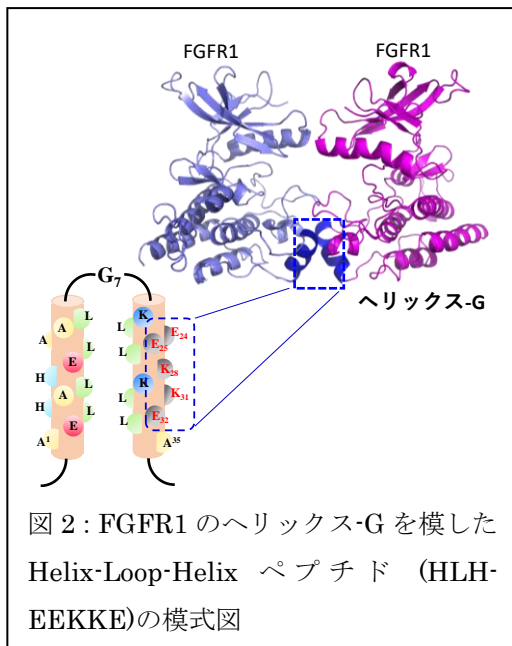
表 1 : ファージディスプレイにより得られたペプチドのアミノ酸の出現頻度

(2) FGFR1-FGFR1 キナーゼドメイン間相互作用面を模したペプチドの作製

次に、HLH ペプチドに対して、FGFR1 の helix-G の上に存在するキナーゼドメイン間相互作用面の残基を導入した HLH ペプチドを作製した。図 1 中の X₂₄、X₂₅、X₂₈、X₃₁、X₃₂ が順に、E₂₄、E₂₅、K₂₈、K₃₁、E₃₂ となる (図 2)。以下、設計したペプチドのことを HLH-EEKKE と表記する。設計したペプチドは N 末端からマルトース結合タンパク質 (MBP)、HRV3C 切断部位、HLH-EEKKE ペプチド、His-tag の融合タンパク質として作製した。得られた HLH-EEKKE ペプチドと FGFR1 のキナーゼドメインの間の相互作用を示差走査蛍光測定 (DSF) を用いた熱変性実験により調べた。その結果、ペプチドの添加により FGFR1 の変性曲線が高温側にシフトした。このことから、作製した HLH-EEKKE ペプチドが FGFR1 のキナーゼドメインに結合することが示唆された。

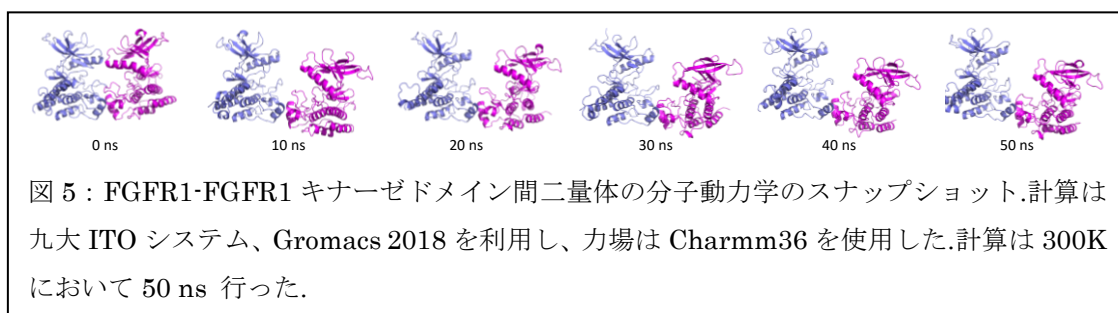
FGFR1 と HLH-EEKKE ペプチドの相互作用が確認されたことから、FGFR1 の自己リン酸化に対する HLH-EEKKE ペプチドの阻害活性について検討した。FGFR1 と HLH-EEKKE ペプチドを混合した状態で ATP を添加し、FGFR1 の自己リン酸化反応を行った。その後、リン酸化チロシンに対する抗体である PY20 を用いた Western Blotting によりリン酸化された FGFR1 を検出した。その結果、ペプチド濃度を上げるにしたがって Western Blotting におけるバンドが濃くなっており、HLH-EEKKE ペプチドは FGFR1 の自己リン酸化が亢進するとの結果を得た。予想に反し、HLH-EEKKE ペプチドは自己リン酸化を阻害するペプチドではなく、促進するペプチドであることが明らかとなった。以上の結果より、FGFR1-FGFR1 のキナーゼドメイン間相互作用面を標的とした阻害ペプチドを創製するためには、キナーゼドメイン間相互作用を模倣するだけで

不十分であることが明らかとなった。相互作用面阻害するには、キナーゼドメイン間相互作用を介した活性化のメカニズムの詳細知る必要がある。



(3) FGFR1-FGFR1 キナーゼドメイン間二量体の分子動力学解析

FGFR1-FGFR1 キナーゼドメイン間二量体について、分子動力学計算を行った。計算は分子動力学ソフトウェア Gromacs 2018 を使用し、九州大学に設置された共同利用施設であるスーパーコンピュータシステム ITO を使用した。FGFR1 キナーゼドメイン間二量体はヘリックス-C の末端のループ領域およびヘリックス-G が二量体相互作用面を形成する。分子動力学計算は 50ns 行ったが、ヘリックス-C の相互作用は 10ns において解離した。一方、ヘリックス-G 同士の相互作用は強固であり、50ns の間、相互作用は持続されていた。以前の研究において、変異体を用いたリン酸化実験により、ヘリックス-G 同士の相互作用が FGFR1 の活性化において重要であることを明らかにしていた。分子動力学計算の結果から、ヘリックス-G を介した相互作用が安定であることが示唆され、FGFR1 の活性化に関わるキナーゼドメイン間相互作用を阻害する上で、ヘリックス-G を介した分子間相互作用が妥当な標的であることが改めて示されたと言える。今後、さらなる解析を行うことで、FGFR1 のキナーゼドメイン間相互作用を介した活性化の詳細な機構が明らかになると期待される。



(4) MBP 融合タンパク質の精製のための安価なアフィニティークロマトグラフィー担体の作製

HLH-EEKKE ペプチドは MBP 融合タンパク質として発現させており、その精製過程ではアミロース固定化樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行う。アミロース固定化樹脂は複数社より市販されているが、いずれも高価である。また、大腸菌はアミラーゼを持っているが、その影響により、アミロース固定化樹脂は何度も繰り返して使用すると結合容量が低下するため、再利用の回数は限られる。構造生物学や応用研究では大量のタンパク質試料を必要とするため、安価で使い捨てが可能なアフィニティークロマトグラフィー担体の作製が必要とされていた。デンプンは短鎖のアミロースと分岐鎖アミロースであるアミロペクチンにより構成される高分子であり、非常に安価である。そこで、MBP 融合タンパク質の精製へのデンプンの使用について検討した。

過去の研究において、生デンプンが使用できることが報告されていたが、実際に試したところ、ほとんど MBP が結合しないことが明らかとなった。そこで、次の操作によりデンプンを糊化した。20mg のデンプンを水に懸濁し、95°C で糊化した。それを遠心、水に懸濁する、洗浄操作を繰り返し、最後に緩衝液に変えて同様の操作を行うことで糊化デンプンを調製した。このように作製した糊化デンプンを用いて、MBP 50 μ M、ミオグロビン 100 μ M、リゾチーム 100 μ M、アルブミン 50 μ M を混ぜた溶液 500 μ L を試料として MBP と糊化デンプンとの間の相互作用について検討した。試料溶液と糊化デンプンを混ぜて 4°C で 30 分 転倒混和し、遠心、緩衝液による洗浄を 3 回繰り返し、最後にマルトースを含む緩衝液により溶出した。その結果、素通り画分には MBP がほとんど含まれず、ほぼすべての MBP が糊化デンプンに結合したことが示唆された (図 6)。一方、リゾチーム、アルブミン、ミオグロビンは素通り画分と洗浄画分にのみバンドが観測されており、糊化デンプンには結合しないことが示された。溶出画分は MBP のバンドが観測されており、糊化デンプンが MBP に特異的に結合することが示された。FGFR1、SIRT7、CAR、一本鎖抗体など複数のタンパク質について MBP 融合タンパク質を作製し、糊化デンプンクロマトグラフィーによる精製に成功している。日持ちしないので用時調製が必要であり手間がかかること、粒子が小さく通常使用されるカラムのフィルターを通過するためカラムクロマトグラフィーが使用できないという欠点はあるが、非常に安価なので、MBP 融合タンパク質の大量調製には有用である。今後、研究室の WebPage や学会発表等を通して広報を行い、本手法を普及させていきたい。

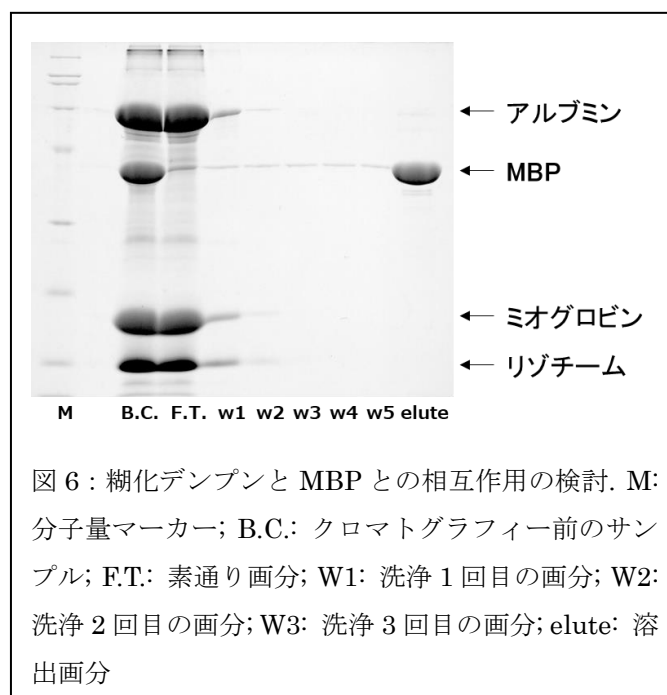


図 6 : 糊化デンプンと MBP との相互作用の検討. M: 分子量マーカー; B.C.: クロマトグラフィー前のサンプル; F.T.: 素通り画分; W1: 洗浄 1 回目の画分; W2: 洗浄 2 回目の画分; W3: 洗浄 3 回目の画分; elute: 溶出画分

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobashigawa Yoshihiro, Namikawa Mana, Sekiguchi Mitsuhiro, Inada Yuki, Yamauchi Soichiro, Kimoto Yuu, Okazaki Kyo, Toyota Yuya, Sato Takashi, Morioka Hiroshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Expression, Purification and Characterization of CAR/NCOA-1 Tethered Protein in <i>E. coli</i> Using Maltose-Binding Protein Fusion Tag and Gelatinized Corn Starch	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 125 ~ 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杜燕, 逆瀬川知香, 林田大輝, 矢口悠, 雨宮舜, 佐藤卓史, 森岡弘志, 小橋川敬博
2. 発表標題 FGFR4-FGFR1ヘテロ2量体を介したFGFR4シグナル伝達機構の解明
3. 学会等名 第140回日本薬学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林田大輝, 与座魁斗, 雨宮舜, 福田夏希, 逆瀬川知香, 佐藤卓史, 小橋川敬博, 森岡弘志
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼ (FGFR) の阻害剤耐性および選択性の分子機構の解明に向けた分子間相互作用の物理化学的解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	森岡 弘志 (Morioka Hiroshi) (20230097)	熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------