

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24681047

研究課題名(和文) 特殊環状ペプチドライブラリとヒト培養細胞株を用いた細胞表面分子標的医薬の探索

研究課題名(英文) Development of macrocyclic peptide drug that targets membrane proteins using cultivated human cell lines

研究代表者

加藤 敬行 (Kato, Takayuki)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90567760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膜タンパク質等の細胞表面分子を標的とする特殊環状ペプチド医薬の探索手法の確立を行った。通常、ランダムペプチドライブラリを用いた *in vitro* display法では磁気ビーズ上に固定化した標的分子をペプチドライブラリに提示させるが、標的が膜タンパク質の場合には精製・可溶化が困難なため磁気ビーズに固定できないケースが多い。そこで本研究では、膜タンパク質を発現した培養細胞株やバキュロウイルスを直接用いて *display*を行う手法を確立した。その上で、本手法を用いてCD20、IL28RA、Claudin-1および4などの細胞表面分子に結合し、機能阻害する特殊環状ペプチドの取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we developed a new method for screening non-standard macrocyclic peptide drugs that target cell-surface molecules such as membrane proteins. Normally, target molecules need to be immobilized on magnetic beads for applying *in-vitro* display method combined with random peptide library. However, immobilization of membrane proteins is generally difficult because isolation and solubilization of such proteins are impossible in many cases. Therefore, in this project, we developed a new *in-vitro* display method that utilizes cultured cells and/or baculovirus expressing membrane proteins on their surface instead of purified proteins immobilized on beads. By using this method, we could successfully obtain macrocyclic peptides that target CD20, IL28RA, Claudin-1 and 4.

研究分野：分子生物学

キーワード：膜タンパク質 ペプチド医薬 RaPIDディスプレイ 翻訳 遺伝暗号リプログラミング アゴニスト

1. 研究開始当初の背景

ペプチド医薬は、次世代の医薬品リード化合物として近年非常に注目を浴びている。中でも、本研究で用いた特殊環状ペプチドは生体内の翻訳合成に用いられる 20 種類のアミノ酸以外の非天然アミノ酸を含むペプチドであり、大環状構造や *N*-メチルアミノ酸などの特殊骨格を有している。そのため、ペプチダーゼ耐性や細胞膜透過性を持つものが多く見られ、医薬品としてのポテンシャルは天然型ペプチドよりも高い。

我々の研究室ではこれまでに遺伝暗号リプログラミング法を用いた特殊ペプチド翻訳合成法を開発しており、大環状構造や *N*-メチルアミノ酸等の特殊な構造の導入を達成している。そして、このような特殊構造をもった特殊ペプチドのライブラリを mRNA ディスプレイ法と組み合わせることで、標的分子に特異的に結合するペプチドを効率的に探索できるようになった(この手法を RaPID ディスプレイ法と呼んでいる)。ただし、この手法は必ずしもあらゆる標的分子に対して適用できるわけではない。標的分子をビーズ担体上に固定化した上でペプチドライブラリに対して提示させる必要があるため、ビーズへの固定化が困難な分子に対しては適用することができない。例えば膜タンパク質などは単離精製が困難であるためにビーズへの固定化ができないものが非常に多い。そのため、より幅広い標的分子に対して特殊ペプチドを探索できる手法の確立が望まれている状況である。

2. 研究の目的

細胞表面に存在する膜タンパク質は非常に魅力的な創薬標的分子となることが多い。シグナル伝達に関わるレセプターなど、機能的に重要なタンパク質因子が多く見られるためである。例えば、G タンパク質共役受容体(GPCR)や Toll-like receptor(TLR)などが重要な細胞膜タンパク質創薬標的として挙げられる。しかしながら、そういったタンパク質は膜貫通ドメインに疎水性アミノ酸残基を多く含んでいて、膜に埋め込まれるような構造をとるため、膜と共存しない状態では正しい構造をとることができず、単離精製や可溶化が非常に難しい。したがって、磁気ビーズ担体に固定化して行う RaPID ディスプレイ法がうまく機能しないという問題があった。

そこで、本研究ではこれらの膜タンパク質を標的とする特殊ペプチドの探索を実現するために、タンパク質を固定化する代わりに細胞そのものまたは標的タンパク質を発現したバキュロウィルスを用いて特殊ペプチドのセレクションを行う手法の開発を目指した。これにより様々な膜タンパク質を標的として特殊ペプチド医薬を探索することが可能となり、特異的かつ強固に結合する特殊ペプチドを発見できれば新規特殊ペプチド

医薬開発において非常に強力なツールとなる。

3. 研究の方法

In vitro セレクションに使用する特殊環状ペプチドライブラリは、フレキシザイムを用いた遺伝暗号リプログラミング法によって調製した。鋳型 mRNA ライブラリの 3'末端にピューロマイシンを結合させ、リボソームで翻訳された特殊環状ペプチドライブラリと mRNA ライブラリとをピューロマイシンを介して連結させた(図 1)。これを、標的タンパク質を表面に発現した細胞またはバキュロウィルスに提示して、結合するものを回収し、そのペプチドに連結された mRNA を逆転写・PCR によって増幅した後、得られた DNA をクローニングし配列解析することで、標的に結合する特殊ペプチドの配列を決定した。特殊環状ペプチド探索の標的分子としては CD20、Claudin-1、Claudin-4、Fas レセプター、アセチルコリンレセプター、インテグリン、IL28RA 等を用いた。細胞表面には標的とするタンパク質以外にも様々なものが発現しているため、それらに対して非特異的に結合するペプチドを除去するために標的タンパク質を発現していない細胞(またはバキュロウィルス)に対するプレクリアーを行って、それらに結合するものを除去する操作も実施した。この一連の過程を 5~10 サイクル程度繰り返し、高い結合能を持つペプチド配列を濃縮した。

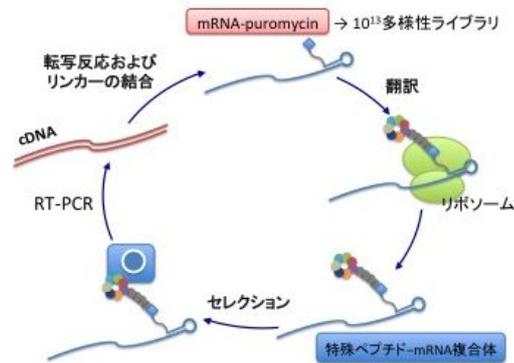


図1. 培養細胞を標的としたRaPIDディスプレイ法の概要: 標的タンパク質を担体上に固定化する代わりに、標的タンパク質を発現した細胞株をセレクションに用いることで、結合する特殊環状ペプチドを探索する。

4. 研究成果

(1) CD20 を標的とする特殊ペプチドの探索
CD20 は 33-37kDa のリン酸化膜タンパク質であり、細胞膜を 4 回貫通する構造を有する。B 細胞表面に特異的に発現し、B 細胞分化の制御において重要な役割を果たしていると考えられており、多くの悪性 B 細胞リンパ腫に発現するため、B 細胞リンパ腫に対する重要な創薬標的となると考えられる。一方で、他の造血系細胞を含むほぼ全ての細胞では発現していないと考えられている。そこで本研究では B 細胞由来の Raji 細胞を標的として用い、プレクリアーに CD20 を発現して

いないヒト T 細胞白血病細胞株の Jurkat 細胞を用いて in vitro セレクションを行った。セレクションを 9 サイクルまで実施したところ、7 サイクル目からペプチドの回収率の上昇が認められたため、ペプチド配列の解析を行ったところ、6 種類のペプチド配列を得ることに成功した。さらに、各ペプチドの標的細胞に対する結合力の評価を行ったところ、6 種類のうち 2 種類のペプチドについては実際に Raji 細胞に特異的に結合することが確認された。

(2) Claudin-1 および Claudin-4 を標的とする特殊ペプチドの探索

Claudin ファミリーは 27 種類のタンパク質から構成されており、細胞間隙のタイトジャンクションを形成する機能を担っている。そのため、Claudin に対する分子標的薬はタイトジャンクションの形成を阻害し物質の吸収を促進させる効果が期待される。また、Claudin-1 については C 型肝炎ウイルスの感染初期レセプターとしても知られており、C 型肝炎治療薬としても有用であると考えられる。本研究においては、Claudin-1 または Claudin-4 を発現する細胞およびバキュロウイルスを併用し、これらに対して特異的に結合し阻害する特殊環状ペプチドの取得を行った。Claudin-1 についてはバキュロウイルスを用いた in vitro セレクションを 8 サイクル実施しペプチドの配列を解析したところ、Claudin-1 に特異的に結合するものとして 10 種類のペプチドが得られた。現在、この 10 種類のペプチドを化学合成し薬理活性の有無についてさらに検証を進めている段階である。Claudin-4 についてもバキュロウイルスを用いた in vitro セレクションを 7 サイクル実施し配列の解析を行ったところ、6 種類のペプチドを取得できた。これらのペプチドについて Caco-2 細胞を用いた腸管上皮細胞バリア機能阻害アッセイを実施したところ 2 種類のペプチドについて可逆的な阻害活性を示すことが確認された。

(3) IL28RA を標的とする特殊ペプチドの探索

IL28RA はインターフェロン- (IFN-) の受容体であり下流の Jak-STAT 経路や MAPK 経路を介してウイルス複製や増殖の抑制、アポトーシスの促進といった抗ウイルス活性を示すため、IL28RA のアゴニストは C 型肝炎の治療薬としての開発が期待される。本研究では IL28RA を発現する細胞を標的として用い、shRNA によって IL28RA 遺伝子をノックダウンした細胞をプレクリアーに用いてセレクションを実施した。セレクションサイクルを 7 サイクル進めたところでライブラリ DNA の回収率の上昇が見られたため、ペプチド配列の解析を行い、4 種類のペプチドについて HCV ウイルス複製阻害活性のテストを行ったところ、1 種類のペプチドについて実際に阻害

活性を示すことがわかった (図 2)。

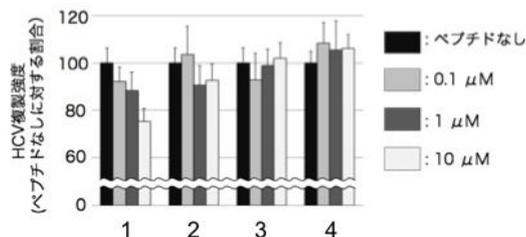


図2. HCVウイルス複製阻害活性: IL28RAを標的とするセレクションによって得られた4種類のペプチドの HCVウイルス複製阻害テストの結果。

(4) 総括

本研究によって、標的タンパク質を発現したヒト培養細胞およびバキュロウイルスを用いて標的に特異的に結合する特殊環状ペプチドを探索する手法を確立した。また、この手法を用いて実際にいくつかの膜タンパク質を標的とする特殊環状ペプチドの in vitro セレクションに成功した。これによって、これまで開発の難しかった細胞表面の膜タンパク質を標的とする分子標的ペプチド医薬品の開発が飛躍的に効率的に進められるようになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Hipolito CJ, Tanaka Y, Katoh T, Nureki O, Suga H.

A macrocyclic peptide that serves as a cocrystallization ligand and inhibits the function of a MATE family transporter. *Molecules*, **18**, 10514-30 (2013) 査読あり、DOI: 10.3390/molecules180910514.

Tanaka Y, Hipolito CJ, Maturana AD, Ito K, Kuroda T, Higuchi T, Katoh T, Kato HE, Hattori M, Kumazaki K, Tsukazaki T, Ishitani R, Suga H, Nureki O.

Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature*, **496**, 247-51 (2013) 査読あり、DOI: 10.1038/nature12014.

〔学会発表〕(計 2 件)

石田哲、平田雄一、加藤敬行、小原道法、菅裕明
細胞を用いた RaPID システムによる IL28RA 結合ペプチドの探索
第 46 回若手ペプチド夏の勉強会(2014 年 8 月 3~5 日)、京都府立青少年海洋センター(京都府宮津市)

加藤敬行、特殊ペプチド創薬、第 86 回日本生化学会大会(2013 年 9 月 11~13 日)、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 2 件)

Passioura T, Katoh T, Goto Y, Suga H.
Selection-based discovery of druglike
macrocyclic peptides.
Annu Rev Biochem. **83**, 727-52 (2014)

田口精一編、化学同人、生命システム工
学、71-100 (2012)

〔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
<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/bioorg/English/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤敬行 (KATOH, Takayuki)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：90567760

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし