

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870503

研究課題名(和文)特異的分子ツール設計法：プロテインキナーゼ指向型立体構造規制ペプチドライブラリー

研究課題名(英文)A method for generating molecular-targeting tools: Protein kinase-oriented library based on conformationally constrained peptide

研究代表者

藤原 大佑 (Fujiwara, Daisuke)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30611420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：プロテインキナーゼは、細胞の周辺環境に対する応答や細胞分裂の際にはたらく酵素である。ヒトゲノムには500種以上のプロテインキナーゼの存在が明らかとなっているが、多くの機能は未解明である。個々のキナーゼの生物学的機能を解明するために、研究対象とするキナーゼを特異的に制御する分子ツールの創出が必要である。また、異常型キナーゼは癌などの疾患原因となるため、異常型キナーゼに対する特異的分子ツールは、医薬品リードとして期待できる。本研究ではプロテインキナーゼ特異的阻害剤の新しい分子設計、創出手法を確立した。本手法により、生物学研究用分子ツールならびに医薬品創成研究に寄与できる。

研究成果の概要(英文)：Protein kinase takes roles of signal transduction or cell division of living cells. The biological functions of over 500 members of protein kinases are still not fully understood because of the lack of specific molecular tools to examine each protein kinase. Aberrant protein kinases cause diseases, and their specific inhibitors based on such molecular tools are expected to be therapeutics. Here we developed a new method to design and generate specific protein kinase inhibitors. This method would contribute to generate novel molecular tools in biology and also give therapeutic leads.

研究分野：ケミカルバイオロジー、ペプチド科学、進化分子工学

キーワード：プロテインキナーゼ 阻害剤 ペプチド ライブラリー ファージディスプレイ オーロラキナーゼ  
細胞膜透過性

1. 研究開始当初の背景

(1) プロテインキナーゼはアデノシン三リン酸 (ATP) からリン酸基を転位してタンパク質をリン酸化し、シグナル伝達により細胞の分化・増殖、免疫応答などを厳密に制御している。ヒトゲノム解読以降に未知機能のプロテインキナーゼが多数発見されたが、未だに多くのはたらきは解明されていない。これは、研究対象とするプロテインキナーゼのための特異的分子ツールがないためである。

(2) これまでにプロテインキナーゼを制御する分子ツールとして ATP 競合性の低分子阻害剤が設計されている(引用文献①)。しかし、プロテインキナーゼの活性中心にある ATP 結合部位は互いに構造が類似し、これらの阻害剤は同時に複数のプロテインキナーゼを阻害する。このことから、従来阻害剤は標的分子特異性が低いことが課題であった。そこで本研究では、プロテインキナーゼ特異的分子ツールの新たな分子設計・獲得方法を提唱する(図 2a)。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではプロテインキナーゼを標的タンパク質として、特異的分子ツール(阻害剤)の設計法を確立する。ヒトゲノムが解読されて 500 種以上のキナーゼの存在が明らかとなっているが、個々のキナーゼに対する特異的分子ツールがないため、生物学的機能の解明は進んでいない。

(2) そこで、ATP 類似体と申請者ら独自の立体構造規制ペプチド・ライブラリーを組み合わせるにより、ATP 結合部位とその周辺部位を同時に認識する二価結合性分子ツール創出方法を確立する。すなわち、ATP 類似体修飾ペプチド・ライブラリーを構築し、個々のキナーゼに対する特異的分子ツールをスクリーニングする。本手法は、プロテインキナーゼの生物機能の解明に貢献するとともに新しい分子標的医薬品の開発に寄与する。

3. 研究の方法

(1) これまでに設計した立体構造規制ペプチドライブラリー(引用文献②,③)を基盤として、プロテインキナーゼ指向型二価阻害剤ライブラリーの創出を試みた(図 2a)。この二価阻害剤ライブラリーの特徴は、ATP 結合性低分子化合物と、その周辺部位を広く認識する立体構造規制ペプチド(以下、マイクロ抗体)を同時に併せ持つ点にある。マイクロ抗体は、安定な立体構造をもち広い標的分子認識部位をもつため、高い表的分子結合活性と特異性が期待できる。このライブラリーを用いたスクリーニングにより迅速に特異的阻害剤の獲得を試みた。また、細胞内のプロテインキナーゼを制御するために、細胞膜透過性の付与をあわせて検討し、細胞アッセイで利用可能な分子ツールの創出を試みた。平成 26 年度

は、ファージ表層提示上のマイクロ抗体へ化学的に低分子化合物を導入する手法を確立した。低分子化合物のモデル・ケースとして、ビオチンを用いた。平成 27 年度は、ATP 競合性の低分子化合物を提示させたファージ表層提示マイクロ抗体ライブラリーを作製し、プロテインキナーゼ指向型の二価阻害剤ライブラリーとした。さらにセリン・スレオニンプロテインキナーゼの代表例として標的分子オーロラキナーゼ A (以下 AurA) に対するスクリーニングを行い、選択的阻害剤を獲得した。平成 28 年度は、獲得した AurA 選択的阻害剤への細胞膜透過性の付与を試みた。

4. 研究成果

(1) ファージ表層提示マイクロ抗体へ低分子化合物を化学的に導入する手法を確立した(図 1)。すなわち、進化分子工学の代表的手法であるファージ表層提示法を基盤としたプロテインキナーゼ指向型マイクロ抗体ライブラリーを作製した。①最初に、ファージ表層提示マイクロ抗体へ低分子化合物を化学的に導入する手法を確立した。次に②マイクロ抗体を基盤としたプロテインキナーゼ指向型二価阻害剤ライブラリーを作製した。

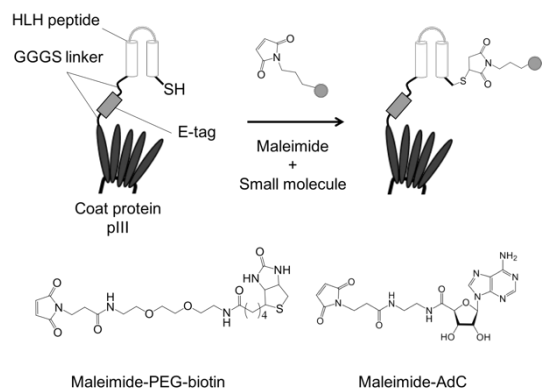


図 1. マレイミド付加化合物を用いたファージ表層提示マイクロ抗体の化学修飾。

①チオール基選択的な化学修飾法によるファージ表層提示ペプチドの選択的化学的修飾を試みた。ファージ表層タンパク質上にシステインをもたない繊維状ファージを用いた(引用文献④)。この Cys-Free ファージのコートタンパク質 pIII に、システインを 1 残基もつマイクロ抗体を提示させた(図 1)。次に、チオール基選択的に反応するマレイミド基をもつ低分子化合物の導入を試みた(引用文献⑤)。マレイミド化ビオチンを調製したファージに加えたところ、本ファージがビオチンを介して選択的にストレプトアビジンへ結合したことをファージ ELISA 法により確認した。このように、Cys-Free ファージ、システインをもつマイクロ抗体、ならびに、チオール選択的に反応して架橋形成できるマレイミドをつかったファージ表層提示マイクロ抗体の選択的修飾法を確立した。

② ①で確立したように、マレイミド基をもつ化合物を用いることで、選択的にファージ表面ペプチドを修飾できる。研究目標であるプロテインキナーゼ指向型ライブラリーを構築するために、プロテインキナーゼの ATP 結合部位を認識する ATP 競合性低分子化合物の導入を試みた。アデノシンはプロテインキナーゼの活性中心に結合し、ATP と競合阻害活性をもつ。アデノシンをペプチドに導入するために、マレイミドを導入したアデノシンを合成した (図 1)。ファージ表面提示マイクロ抗体ライブラリーを作製し、このファージライブラリー溶液に本化合物を加えて化学修飾によりアデノシンを導入し、プロテインキナーゼ指向型二価阻害ライブラリーを作製した (Adc-CDGGSGGSAELAALAEALAELEGGGGGGKLLXLKXKLXKLXKX: X はランダム化したアミノ酸を示す)。

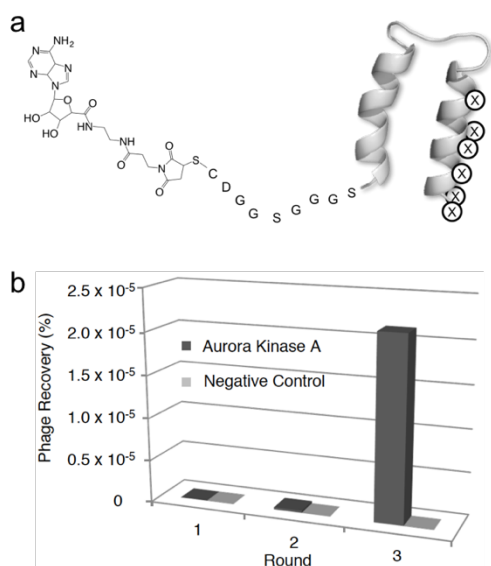


図 2. プロテインキナーゼ指向型マイクロ抗体(a)を用いた AurA 選択的ファージのスクリーニング(b).

(2) プロテインキナーゼを標的タンパク質とした特異的分子ツール (阻害剤) の創出を目的として作製したプロテインキナーゼ指向型マイクロ抗体ライブラリーを用いて、AurA 選択的阻害剤の創出を試みた。①最初に、ライブラリー・スクリーニングによって AurA 選択的に結合するファージクローンを得た。②次に、得られたファージクローンが提示するアデノシン修飾型マイクロ抗体を化学的に合成した。③さらに、合成したアデノシン修飾型マイクロ抗体について、AurA に対するキナーゼ活性阻害能ならびに AuaA 選択性を評価した。

①ファージ表面提示法を基盤とするプロテインキナーゼ指向型マイクロ抗体ライブラリーを用いて、AurA 選択的なファージクローンの獲得を試みた。まず、AurA を 96 ウェルプレートへ固定化し、AurA 固定化量依存的なキナーゼ活性を確認した。次に、このキナーゼ固定

化ウェルに対してプロテインキナーゼ指向型ライブラリーを加えた。非特異吸着のファージを洗い流したのち、AurA 結合性クローンを回収して増幅し、このサイクルを 4 回繰り返した。その結果、陰性対照としたブロッキング剤固定化ウェルと比較して、AurA 選択性クローンの優位な増幅が見られた (図 2b)。これらのクローンから任意に選んだファージゲノムを回収してそれぞれの DNA 配列を確認した。これにより獲得したマイクロ抗体のアミノ酸配列を決定した。これらのクローンのうち、最も高頻度で見られた配列のマイクロ抗体 (Adc-CDGGSGGSAELAALAEALAELEGGGGGGKLEYLKWKLWPLKGW) を Adc-Bip-3 とした。

②(1)で得た配列のマイクロ抗体 Adc-Bip-3 を合成した。まず、Fmoc 固相合成法を用いてマイクロ抗体 Bip-3 (CDGGSGGSAELAALAEALAELEGGGGGGKLEYLKWKLWPLKGW) を化学的に合成した。さらに、マレイミド化アデノシンと溶液中で反応させて、マレイミド化マイクロ抗体 Adc-Bip-3 を合成した。

③Adc-Bip-3、Bip-3、アデノシンについてそれぞれ IMAP TR-FRET 法により AurA のキナーゼ活性阻害試験を実施した。その結果、二価阻害剤 Adc-Bip-3 が最も強いキナーゼ活性を示した。さらに、Aur とは異なるファミリーに属すプロテインキナーゼとして Src、Erk、PKA、PKA4 に対して同様の手法でキナーゼ阻害活性を評価したところ、Adc-Bip-3 は AurA を最も強く阻害した。すなわち、Adc-Bip-3 は AurA に対する選択性を示した。

①-③を通じて、プロテインキナーゼ指向型マイクロ抗体ライブラリーを用いた AurA 選択的阻害剤の創出とした。

(3) AurA 選択的阻害剤 Adc-Bip-3 に対する細胞膜透過性付与を検討した。これまでに AurA 選択的二価阻害剤 Adc-Bip-3 を創出したが、AurA は細胞内に発現しているため、これを制御するためには、阻害剤 Adc-Bip-3 を細胞内へ導入する必要がある。大変興味深いことに、 $\alpha$ -ヘリックス構造をもつ分子内架橋ペプチドが細胞膜透過性を示すことが明らかとなっている (引用文献⑥)。そこで、 $\alpha$ -ヘリックス構造を保持するマイクロ抗体 Bip-3 を出発物質とした細胞膜透過性 AurA 阻害剤の創出を目標とした。まず、①低分子化ペプチド cH-Bip-3a (b) を設計して、②化学的に合成して立体構造を調べた。

①Adc-Bip-3 の細胞内透過性を高めるために、Adc-Bip-3 の低分子化を試みた。Bip-3 はヘリックス-ループ-ヘリックス構造をもち、C 末端側のヘリックスが AurA を認識する (KLEYLKWKLWPLKGW; cH-Bip-3)。i, i+6 番目のシステインの側鎖に対してビスアルキル化反応を用いて 1 本鎖ヘリックスを安定化できるリンカーBph の利用を検討した (図 3, 引用文献⑥)。

②cH-Bip-3 の i, i+6 番目にシステインを導入した 2 種のペプチド cH-Bip-3a (Ac-KCEYLKWKWCWPLKGW-NH<sub>2</sub>)、cH-Bip-3b (Ac-KLEYCKWKLWPCKGW-NH<sub>2</sub>)、ならびにペアレント・ペプチド由来 cH-YT-1(Ac-KLAACALAAALACKAY-NH<sub>2</sub>)をそれぞれ、Fmoc 固相法を用いて合成した。これらの合成ペプチドをそれぞれ架橋剤 Bph と反応させて環状化ペプチドを合成した。ペアレント・ペプチド YT1 を土台とした cH-YT1-では、CD スペクトル測定からヘリックス構造をもつことを確認した。しかしながら、大変興味深いことに cH-Bip-3a、cH-Bip-3b ともにヘリックス構造をもたなかった。このことから、Bip-3 の AurA 結合エピトープのダウンサイジングには、最適な分子内架橋方法が必要であることが明らかとなった。

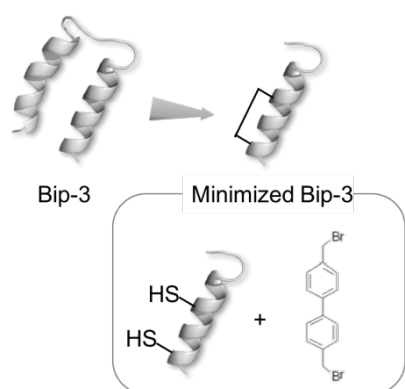


図 3. 細胞膜透過性付与を目的とした Bip-3 のダウンサイジング。

研究成果(1)-(3)を通じて、選択的プロテインキナーゼ阻害剤の新規分子設計・創出方法の確立とした。

#### <引用文献>

- ① *Science* **2002**, 298, 1912-1934.
- ② *Curr. Protols Chem. Biol.* **2013**, 5, 171-194
- ③ *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1776-1778.
- ④ *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 502-508.
- ⑤ *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 5680-5693.
- ⑥ *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9396-9398.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Fujiwara, D., Mihara, K., Nakamura, Y., Tsumuraya, T., and Fujii, I. (2017) Generation of Molecular-Targeting Peptides for Protein Kinase:A Phage-Displayed Library of Helix-Loop-Helix Peptides conjugated with Adenosine. *Peptide Science* 2016, 169-170.
- ② Nakamura, Y., Fujiwara, D., Nishihara,

T., and Fujii, I. (2014) Chemically modified phage-displayed peptide libraries: Tethering biotin to the displayed peptides. *Peptide Science* 2013, 353-354.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Fujiwara, D., Mihara, K., Nakamura, Y., Tsumuraya, T., Fujii, I. (2017) Generation of Molecular-Targeting Peptides for Protein Kinase:A Phage-Displayed Library of Helix-Loop-Helix Peptides conjugated with Adenosine. (第 53 回ペプチド討論会, 平成 28 年 10 月 26 日, 京都)

- ② Takayama R., Fujiwara, D., and Fujii, I. (2015) Molecular Design of Protein Kinase Inhibitors: Conjugation of ATP-Competitive Molecules with Kinase Surface-Targeted Peptides. (第 51 回ペプチド討論会, 平成 26 年 10 月 22 日, 徳島)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: プロテインキナーゼ阻害剤  
 発明者: 藤原大佑、藤井郁雄  
 権利者: 公立大学法人 大阪府立大学  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2016-016460  
 出願年月日: 平成 28 年 1 月 9 日  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
 ホームページ等  
 該当なし

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
 藤原 大佑 (FUJIWARA, Daisuke)  
 大阪府立大学・理学系研究科・助教  
 研究者番号: 30611420
- (2) 研究分担者  
 該当なし
- (3) 連携研究者  
 該当なし
- (4) 研究協力者  
 該当なし