

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870613

研究課題名(和文) 機能性ペプチドを用いたラミニンの生物活性部位の同定および医薬分野への応用

研究課題名(英文) Identification of laminin active sites using functional peptides

研究代表者

片桐 文彦 (Katagiri, Fumihiko)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60420642

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)：ラミニンは細胞の周囲にあるタンパク質で、細胞に様々な刺激を与えて生命現象を発生させる。ラミニンの生物機能を明らかにすることは、医薬分野や再生医療に有用な知見を与えられ、ラミニンの生物機能を大別すると、細胞接着、細胞運動に分けられ、本研究では、ラミニンのアミノ酸配列を網羅する合成ペプチドを用いて、細胞接着、遊走活性を評価し、それらが作用する受容体を同定した。

研究成果の概要(英文)：Laminin is a huge protein around cells in the body, and it expresses a life phenomenon by giving various stimuli to the cell. To elucidate biological functions of laminin is thought to provide useful information for pharmaceutical field and regenerative medicine. The main biological functions of laminin are cell adhesion and cell motility. In this study, we evaluated cell adhesion and migration activity using synthetic peptides covering the amino acid sequence of laminin, and the receptor was identified.

研究分野：ペプチド科学

キーワード：ペプチド 細胞 受容体

### 1. 研究開始当初の背景

現在、本邦の医療で最も期待されているのは人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS 細胞) だと思われる。この 10 年で、iPS 細胞から様々な組織への分化誘導に成功した報告が国内外から発表され、臨床応用への期待が高まっているが、複雑な培養方法や一部細胞の癌化など、依然解決すべき問題も多い。2010 年に iPS 細胞の自己増殖能維持にラミニン-511 が寄与しており、かつ、その受容体がインテグリン  $\alpha 6\beta 1$  であることが報告され (Rodin S., *Nat. Biotechnol.*, 28, 611-615, 2010)、最近ではラミニン-511 の C 末端領域の組換えタンパク質 (ラミニン 511-E8) が、胚性幹細胞 (embryonic stem cells, ES 細胞) や iPS 細胞のフィーダーフリー、シングルセル継代が可能な試薬として発売される (iMatrix-511™, (株)ニッピ) など、ラミニンならびにその受容体の機能解析や、医薬分野への応用が注目されている。ラミニンは細胞外マトリックス 基底膜の主要成分の 1 つで、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 種類の鎖から構成される糖タンパク質である。5 種類の  $\alpha$  鎖、3 種類ずつの  $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖の組み合わせで、現在までにラミニン-111 ( $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ ) からラミニン-523 ( $\alpha 5\beta 2\gamma 3$ ) の 15 種類のラミニンアイソフォームが同定されている。各アイソフォームは発生段階や組織特異的に発現し、器官形成、神経網再生、血管新生、創傷治癒など様々な生命現象に関与している。一方、インテグリンは、ラミニンの主要な受容体の 1 つであり、 $\alpha$  と  $\beta$  の 2 種類のサブユニットからなるヘテロダイマーで、18 種類の  $\alpha$  サブユニットと、8 種類の  $\beta$  サブユニットが発見されており、少なくとも 24 種類のインテグリンが同定されている。ラミニンとインテグリンを始めとする受容体との相互作用は、細胞の増殖、接着、運動などの制御、組織の発生や分化、血管新生、がんの浸潤転移、炎症、自己免疫疾患などに深く関与していることが明らかとなっている。ラミニンは 20 種類を超える受容体と相互作用することが報告されており、それらの受容体に特異的に結合するリガンドの開発は、受容体の機能解明につながるだけでなく、疾患の原因解明や創薬に直結すると考えられる。しかし、これらの受容体には多くのサブタイプが存在し、それぞれが独立して様々な生命現象に関与しているため、特異的なリガンドの開発は遅々として進んでいない。

著者らはラミニンの機能解明、生物活性部位の同定を目的に、アミノ酸配列を網羅するペプチドライブラリー (ラミニンペプチドライブラリー) を構築し、種々のスクリーニングに附することで、細胞接着活性や神経突起生長活性などの生物活性を示す機能性ペプチドの探索を行っている。ラミニンペプチドライブラリーを様々なスクリーニングに附す過程で、インテグリン  $\alpha 6\beta 1$  に結合する A2G10 など、特定の受容体に特異的に作用するペプチドを見出している。著者は、これらの機能

性ペプチドを分子プローブとして用い、組換えタンパク質と競合させることでラミニンの受容体結合部位を同定し、さらには構造活性相関研究を行うことで、配列を最適化し、ラミニン受容体の機能解析や創薬、再生医療に応用できる分子プローブの開発ができるのではないかと考え、本研究を着想するに至った。

### 2. 研究の目的

本申請課題ではラミニンペプチドライブラリーから見出された機能性ペプチドを用いて、ラミニンと各種受容体との結合部位の同定を行うとともに、機能性ペプチドの構造活性相関研究を行い、受容体特異的な配列 (分子プローブ) の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 著者らは現在までに、全 11 種類のラミニンサブユニット全てのアミノ酸配列を網羅する合成ペプチドライブラリーの作成を完了している (全 24,244 配列、2,546 ペプチド)。また、現在までに、インテグリン  $\alpha 2\beta 1$  結合ペプチドを 15 種類、 $\alpha 3\beta 1$  結合ペプチドを 3 種類、 $\alpha 6\beta 1$  結合ペプチドを 5 種類、 $\alpha$ -ジストログリカン結合ペプチドである A2G78 (GLLFYMARINHA; マウスラミニン  $\alpha 2$  鎖 2796-2807)、A2G80 (VQLRNGFPYFSY; マウスラミニン  $\alpha 2$  鎖 2812-2823)、多数のシンデカン結合ペプチド (A119 (LSNIDYILIKAS、マウスラミニン  $\alpha 1$  鎖 1321-332) 他) を見出している。本研究では、このラミニンペプチドライブラリーのヒト皮膚線維芽細胞を用いた細胞接着スクリーニングを行う。接着活性を示したペプチドは、ヘパリン/EDTA による細胞接着阻害効果を評価し、プロテオグリカン過剰発現細胞、抗インテグリン抗体などを用いて受容体の同定を行う。

(2) 著者らが見出した機能性ペプチドの中には、生物活性を示すが、受容体が同定できていないペプチドが含まれている。例えば、C16 ペプチド (KAFDITYVRLKF、マウスラミニン  $\gamma 1$  鎖 139-150) は、種々のスクリーニングの結果、細胞接着活性、神経突起生長活性、がん転移浸潤促進活性を示すが、上記の方法では受容体が同定できていない。また受容体とのアフィニティーが弱いためか、cell lysate を用いた pull-down assay でも特異的なタンパク質は検出できていない。ラミニンはインテグリン、シンデカンを始め、20 種類以上の受容体と結合することが知られており、過去に 110-kDa ラミニン受容体 (LBP110) に特異的に結合する A208 (AASIKVAVSADR、マウスラミニン  $\alpha 1$  鎖 2097-2108)、CD44 に結合する A5G27 (RLVSYNGHIFFLK、マウスラミニン  $\alpha 5$  鎖 2892-2904) など報告されている。そこで、現在までに受容体が同定できていない機能性ペプチドに光親和性標識 (tri-

fluoromethylphenyldiazirine, benzophenone) を導入し、cell lysate を用いた pull-down assay などによって受容体の同定を試みる。

(3) 細胞接着活性のスクリーニングとは別に、著者らが開発した確立した boyden chamber 法、culture-insert 法などの走化性、遊走能のスクリーニングを行う。細胞接着活性が認められず、細胞運動促進活性が認められた機能性ペプチドの受容体探索には、先述の光親和性標識導入ペプチドが有効であると考えられる。

(4) 著者らが報告した代表的な機能性ペプチドを選択し、受容体結合に必要なアミノ酸残基を同定するため、ペプチドのアミノ酸残基 1 つずつを基本アミノ酸である Ala に置換したペプチドを合成し、接着活性を評価する (Ala scan)。最近、著者らは、マウスラミニン  $\beta 1$  鎖の配列由来のペプチドから  $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$  インテグリンに結合するペプチド B67 (IPYSMEYEILIRY、マウスラミニン  $\beta 1$  鎖 604-616) を見出し、Ala scan によって Glu<sup>8</sup> がインテグリン結合活性に不可欠であることを見出している。また、各アミノ酸残基を Gly に置換したペプチドを合成し、細胞接着活性を評価する (Gly scan)。Gly は  $\alpha$  位に置換基がなく、光学不活性なアミノ酸であるため、Gly を導入することによって、その立体構造が大きく変わる可能性が示唆される。Ala scan により受容体結合に必須な残基を、Gly scan によって構造的に必須な残基を同定した後、その結果を参考に、短縮ペプチド、欠失ペプチド、さらには他のアミノ酸残基に置換したペプチドを合成し、低分子化、簡素化を図る。

#### 4. 研究成果

(1) 著者らはラミニン  $\alpha 1 \sim \alpha 5$  鎖の C 末端に存在する G ドメインと呼ばれる領域、並びにラミニン  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$  鎖の N 末端領域のアミノ酸配列を網羅する合成ペプチドを用いて、同領域の細胞接着活性を有するペプチドを報告している。また、ラミニン全 11 サブユニットのアミノ酸配列を網羅する合成ペプチドライブラリーを構築しており、本研究では、ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) を用いて、細胞接着活性を有するペプチドのスクリーニングを終えた。3 つの  $\beta$  鎖 ( $\beta 1 \sim \beta 3$  鎖) のについては、既に論文にて報告し、現在、 $\alpha 3 \sim \alpha 5$  鎖、並びに 3 つの  $\gamma$  鎖 ( $\gamma 1 \sim \gamma 3$  鎖) の N 末端領域については、既に細胞接着ペプチドを同定し、EDTA/ヘパリンを用いた接着様式の同定、抗インテグリン抗体を用いた阻害アッセイより、結合するインテグリンを同定した。ラミニン  $\alpha 5$  鎖については、遺伝子組換えタンパク質も利用し、実際のタンパク質でもペプチドで同定した領域が細胞接着に関与していることも検討した。現在、論文作成中である。

ある。

(2) C16 ペプチドの Ala scan の結果を元に、Phe<sup>3</sup>、Tyr<sup>7</sup> を光親和性標識 (trifluoromethylphenyldiazirine, benzophenone) したアミノ酸に置換し、N 末端に PEG リンカーを介してビオチン標識したペプチドをデザイン・合成した。これらのペプチドを HDF に作用させて、アビジンビーズを用いた pull-down assay を行い、SDS-PAGE で分析したところ、C16 と特異的に結合したと思われるタンパク質が検出できた。現在、質量分析を用いて、結合タンパク質を同定中である。

(3) 著者らが開発した culture-insert 法を用いて、ペプチドの細胞遊走能に与える影響を評価した。3 つの  $\gamma$  鎖 ( $\gamma 1 \sim \gamma 3$  鎖) のアミノ酸配列を網羅する合成ペプチドを用いて、HDF を遊走させるペプチドを同定した。また、ラミニン  $\gamma 2$  鎖はがん転移促進活性があることが示唆されており、ラミニン  $\gamma 2$  鎖のアミノ酸配列を網羅する合成ペプチドはマウス悪性黒色腫細胞株 B16F10 を用いた評価も行った。現在、細胞接着活性との比較、相同性の高い  $\gamma 1$  鎖、 $\gamma 3$  鎖間での比較を行っている。

(4) 著者らが以前に報告した、 $\alpha$ -ジストログリカン ( $\alpha$ DG) 結合ペプチド A2G80 と、インテグリン  $\alpha 6\beta 1$  結合ペプチド A2G10 の構造活性相関研究を行った。両ペプチドのアミノ酸残基を 1 つずつ Ala に置換したペプチドを合成し、各受容体との結合能を評価した (Ala scan)。A2G80 は、元々ペプチドをセファロースビーズに結合させ、マウス筋芽細胞株 C2C12 の細胞溶解物から精製した  $\alpha$ DG との結合を western blotting で検出して見出したが、本手法を用いた Ala scan では結合能を評価することができなかった。そのため、N 末端にビオチンを結合させた、ビオチン標識ペプチドを合成し、上記の  $\alpha$ DG との結合能を ELISA で評価した。また、円二色性スペクトルを測定し、構造活性相関を評価した。現在、分子動力学シミュレーションの手法を用いて、構造活性相関研究を継続中である。A2G10 は、HDF に対する細胞接着活性を Ala scan、さらには Gly scan で評価し、インテグリン  $\alpha 6\beta 1$  との結合活性を維持した 6 残基まで短縮することができた。現在、6 残基の側鎖を様々な官能基に置換し、構造活性相関を評価し、結合活性の向上を検討している。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

(全て査読有)

Chikara Fujimori, Jun Kumai, Kyotaro Nakamura, Yingzi Gu, Fumihiko Katagiri, Kentaro Hozumi, Yamato Kikkawa, and Motoyoshi Nomizu. Biological activity of peptide-conjugated polyion complex

matrices consisting of alginate and chitosan. Biopolymers, in press, (2017)

Yurie Enomoto-Okawa, Yuka Maeda, Nozomi Harashima, Yumika Sugawara, Fumihiko Katagiri, Kentaro Hozumi, Kam Man Hui, Motoyoshi Nomizu, Yuji Ito, and Yamato Kikkawa. An anti-human Lutheran glycoprotein phage antibody inhibits cell migration on laminin-511: epitope mapping of the antibody. PLoS ONE. doi: 10.1371/journal.pone.0167860. (2017)

Jun Kumai, Kentaro Hozumi, Yuji Yamada, Fumihiko Katagiri, Yamato Kikkawa, and Motoyoshi Nomizu. Effect of Spacer Length and Type on the Biological Activity of Peptide-polysaccharide Matrices. Biopolymers, 106, 512-520 (2016)

Yamato Kikkawa, Nozomi Harashima, Kazuki Ikari, Shogo Fujii, Fumihiko Katagiri, Kentaro Hozumi, and Motoyoshi Nomizu. Down-regulation of cell adhesion via rho-associated protein kinase (ROCK) pathway promotes tumor cell migration on laminin-511. Exp. Cell Res. 344, 76-85 (2016)

Kentaro Hozumi, Kyotaro Nakamura, Haruna Hori, Mari Miyagi, Rika Nagao, Keiko Takasaki, Fumihiko Katagiri, Yamato Kikkawa, and Motoyoshi Nomizu. Mixed Fibronectin-Derived Peptides Conjugated to a Chitosan Matrix Effectively Promotes Biological Activities through Integrins,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ , and Syndecan. Biores Open Access, 5, 356-366 (2016)

Hironao Yamada, Sakiko Mori, Takeshi Miyakawa, Ryota Morikawa, Fumihiko Katagiri, Kentaro Hozumi, Yamato Kikkawa, Motoyoshi Nomizu, and Masako Takasu. Structural Study of Cell Attachment Peptide Derived from Laminin by Molecular Dynamics Simulation. PLoS One, doi: 10.1371/journal.pone.0149474 (2016)

Yamato Kikkawa, Takahiro Miwa, Naoki Tanimizu, Yuichi Kadoya, Takaho Ogawa, Fumihiko Katagiri, Kentaro Hozumi, Motoyoshi Nomizu, Toru Mizuguchi, Koichi Hirata, and Toshihiro Mitaka. Soluble Lutheran/basal Cell Adhesion Molecule is Detectable in Plasma of Hepatocellular Carcinoma Patients and Modulates Cellular Interaction with Laminin-511 in vitro. Exp Cell Res, 328, 197-206 (2014)

Fumihiko Katagiri, Toshihiro Hara, Yuji Yamada, Shunsuke Urushibata, Kentaro Hozumi, Yamato Kikkawa, and Motoyoshi Nomizu. Biological Activities of the Homologous Loop Regions in the Laminin  $\alpha$  Chain LG Modules. Biochemistry, 53, 3699-3708 (2014)

Fumihiko Katagiri, Masaharu Takagi, Minako Nakamura, Yoichiro Tanaka, Kentaro Hozumi, Yamato Kikkawa, and Motoyoshi Nomizu. Screening of Integrin-binding Peptides in a Laminin Peptide Library Derived from the Mouse Laminin  $\beta$  Chain Short Arm Regions. Arch Biochem Biophys, 550-551, 33-41 (2014)

Kentaro Hozumi, Chikara Fujimori, Fumihiko Katagiri, Yamato Kikkawa, and Motoyoshi Nomizu. Suppression of Cell Adhesion Through Specific Integrin Crosstalk on Mixed Peptide-polysaccharide Matrices. Biomaterials, 37, 73-81 (2014)

Masanori Yamada, Sachiko Hara, Tetsuya Yamada, Fumihiko Katagiri, Kentaro Hozumi, and Motoyoshi Nomizu. Double-stranded DNA Stereoselectively Promotes Aggregation of Amyloid-like Fibrils and Generates Peptide/DNA Matrices. Biopolymers, 102, 465-472 (2014)

#### [学会発表](計 10 件)

F. Katagiri, K. Mori, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Effect of racemic amyloidogenic peptides on phosphorylation of focal adhesion kinase. 34th European Peptide symposium (Leipzig, Germany) 2016.09

F. Katagiri, K. Mori, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu. The phosphorylation of focal adhesion kinase in human dermal fibroblasts on chiral/racemic amyloid-like fibrils. 2016 Annual Meeting the American Society for Cell Biology (San Francisco, USA) 2016.12

F. Katagiri, K. Mori, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Amyloid-like fibril formation and biological activity of racemic fibrogenic peptides. 第 53 回ペプチド討論会 (京都市) 2016.10

片桐 文彦、森 香子、保住 建太郎、吉川 大和、野水 基義 アミロイド様線維形成ラセミ混合ペプチドの生物活  
日本薬学会第 137 年会 (仙台市) 2017.03

F. Katagiri, K. Takeyama, N. Yamada, A. Naito, S. Yamada, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Structural requirement of fibrogenic peptide AG97 (SAKVDAIGLEIV) and B160 (VILQQAADIAR) for amyloid-like fibril formation and cellular activity. American Peptide Symposium 2015 (Orlando, USA) 2015.06

F. Katagiri, S. Yamada, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Structure-activity relationship study for biologically active peptides C16 (KAFDITYVRLKF) derived from mouse laminin gamma1 chain sequence. 2015 cell biology ASCB annual meeting (San Diego, USA) 2015.12

片桐 文彦、山田 里実、保住 建太郎、吉川 大和、野水 基義 ラミニン  $\gamma$ 1 鎖配列由来生物活性ペプチド C16 の構造活性相関 日本薬学会第 136 年会(横浜市) 2016.03

F. Katagiri, H. Shirono, K. Kobayashi, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Identification of integrin-binding sites on short arm region of laminin alpha5 chain by screening in synthetic peptide library. 33rd European Peptide Symposium (Sofia, Bulgaria) 2014.08

F. Katagiri, R. Yamanaka, R. Suyama, N. Nakajima, Y. Yamada, K. Hozumi, Y. Kikkawa, M. Nomizu. Structure-activity relationship study for integrin alpha6beta1-binding peptide A2G10 derived from mouse laminin alpha2 chain sequence. The 2014 ASCB/IFCB meeting (Philadelphia, USA) 2014.12

片桐 文彦、山中 涼、陶山 竜作、中島 直美、山田 雄二、保住 建太郎、吉川 大和、野水 基義 インテグリン  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 結合ペプチド A2G10 の構造活性相関研究 日本薬学会第 135 年会(神戸市) 2015.03

〔その他〕

ホームページ

・東京薬科大学薬学部病態生化学教室  
<http://www.ps.toyaku.ac.jp/~nomizu/index.html>

tml

・researchmap  
<http://researchmap.jp/fumihikokatagiri/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

片桐 文彦 (KATAGIRI, Fumihiko)