

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05334

研究課題名（和文）膜タンパク質の機能を制御する中分子アプタマーの創出とその構造学的基盤の解明

研究課題名（英文）Creation and crystallographic studies of artificial medium-sized aptamers that modulate membrane protein functions

研究代表者

野村 紀通 (Nomura, Norimichi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10314246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：がん、高血圧、慢性炎症など種々の疾病に対する医薬品の分子標的の多くは膜タンパク質である。本研究では、膜タンパク質の機能を制御する中分子アプタマーの創出とその構造学的検証に有用な新しい方法論を確立した。技術の有効性を検証するために、免疫チェックポイントの抑制性受容体PD-1、病原ウイルス感染のエントリーレセプターとして機能するヒト膜タンパク質A、がんの転移能獲得・悪性化進展に関与するヒト膜タンパク質B等の複数の創薬標的膜タンパク質に特異的に認識し結合する中分子ペプチドを取得した。膜タンパク質/中分子ペプチド複合体の精製品を調製し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を進めているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、最先端の膜タンパク質構造研究と合成生物学の知見を融合させて中分子創薬に有用なワンストップ技術プラットフォームを創造した点が重要である。研究代表者が既に保有していた抗体技術を用いた膜タンパク質構造解析技術の能力を最大限に活用して、取得した中分子アプタマーの結合様式の構造学的検証までを行った学術的意義と独自性がある。本研究により創出された中分子ペプチドは各種の疾病の治療のための医薬品開発リードとなりうるため、研究成果の社会実装が期待される点からも意義深い。

研究成果の概要（英文）： Many therapeutic drugs for various diseases such as cancer, hypertension and chronic inflammation target membrane proteins. In this study, I have established a new methodology useful for the creation of medium-sized peptides that regulate the function of medically relevant membrane proteins. In order to validate the technology, we have obtained medium-sized cysteine-rich peptides that specifically recognize and bind to several drug-target membrane proteins, such as PD-1, an inhibitory receptor for immune checkpoints, human membrane protein A, which functions as an entry receptor for pathogenic viral infections, and human membrane protein B, which is involved in the acquisition of metastatic potential and progression of malignant transformation in cancer. To elucidate the mode of action of the artificial peptides, I am conducting the structural studies of the membrane protein/medium-sized peptide complexes by cryo-electron microscopy single particle analysis.

研究分野：構造生物学・タンパク質工学

キーワード：膜タンパク質 中分子創薬 X線結晶構造解析 クライオ電子顕微鏡単粒子解析 ファージディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

がん、高血圧、慢性炎症といった疾病に対する医薬品の開発には大きな社会的要請がある。市販の医薬品の50%以上がGタンパク質共役受容体(GPCR)、膜輸送体、あるいは膜内在性酵素を作用点としており、膜タンパク質は創薬において重要なターゲットである。膜タンパク質構造研究は、「構造ベースの創薬(SBDD: Structure-Based Drug Discovery)」戦略に基づいて医薬リード分子(目的とする薬理活性を有する基本構造)を高効率で探索する情報基盤を解明する役割を担うため、幅広い医学・生物学研究者から強い関心が寄せられている。

研究開始当初まで研究代表者は、膜タンパク質に抗体フラグメントを結合させて結晶化を促進するという独自技術を確立し、各種の創薬ターゲット膜タンパク質の構造研究を推進してきた。抗体技術を用いてヒト・アデノシン A2a 受容体 (Nature, 2012)、ラット・フルクトース輸送体 GLUT5 (Nature, 2015) 等の X 線結晶構造解析に成功した。また、結晶化促進ツールとして用いた抗体の一部は、膜タンパク質の細胞外ドメインに結合して機能を制御するアロステリックモジュレーターであり、抗体医薬候補としての付加価値を有していることも明らかにした。

膜タンパク質構造創薬研究は「ポスト構造解析」に焦点が移りつつあった。その趨勢をふまえて本研究課題では、『膜タンパク質を標的とした次世代型の構造創薬研究を開拓するためにどのような方法論を創出すればよいか?』という問題に取り組む。

低分子医薬は結合面が小さいため親和性や特異性の改善に限界があり、抗体医薬は安定性・組織浸潤性が低く、生体内抗原性が高いといった問題点がある。双方のもつ問題点を解消する方策として最近、中分子骨格に基づく創薬が有望視されている。特殊環状ペプチドを探索する RaPID システム (東京大学・菅裕明博士ら) は中分子アプタマー創出での先駆的・革新的な優れた技術であるが、その分子骨格は一環の大環状ペプチドであり立体的束縛 (conformational constraint) が比較的小さい。構造の柔軟性が原因となって結合エントロピー損失が大きくなり、標的への結合親和性をある一定以上には高くできないという懸念がある。大環状ペプチドではなく、より多様なトポロジーの分子骨格に基づいて、創薬リードとなりうる中分子アプタマーを創出するための新しい方法論を確立したい。とくに次の二つの問題に着目して、研究

- 結合を担う残基が複数のペプチドループ上に立体的に配置され、かつ分子全体として強い立体的束縛のある中分子ペプチド骨格として、どのようなトポロジーが利用可能か?
- 高い結合親和性と特異性を兼ね備えた機能性アプタマーを取得するために、どのようなライブラリー構築・スクリーニング過程を経ればよいか?

2. 研究の目的

上記の背景に基づき本研究では、『創薬ターゲット膜タンパク質の機能を人為的に制御可能な中分子アプタマーの探索とその構造学的検証をワンストップで実施できる技術プラットフォームを創出する』ことを目的とした。具体的な目標としては、(i) 多様なトポロジーをもち立体的束縛を有する安定なペプチド分子骨格 (50~90 残基) を基盤として複数の末端ループの配列と長さを多様化した合成ライブラリーを作製し、高い親和性と特異性を兼ね備えたアプタマーを探索する、(ii) 現有の抗体技術と X 線結晶解析手法を活用し、膜タンパク質 / 中分子アプタマー相互作用の構造学的基盤を解明する、の二点である。

3. 研究の方法

多様なトポロジーをもつ中分子骨格に基づくライブラリーの構築

David Baker 博士らは計算科学的方法を活用して、分子内に多数のジスルフィド結合が架橋され強い立体的束縛のある安定な中分子ペプチド骨格群を de novo 設計した (Nature, 2016)。これらの多様なトポロジーをもつ各々の分子骨格(図1にその一部を例示)を基盤に、複数の末端ループの長さと同様化したファージディスプレイライブラリーを構築した。多様化のためのコドンはランダム変異 (NNK)_n または Tyr/Ser バイナリーコード (TMT)_n (n=3~16 の可変数) 等を用いる。次世代シーケンサーを用いた解析によりライブラリー実効規模と同様化空間の多様性を評価した。

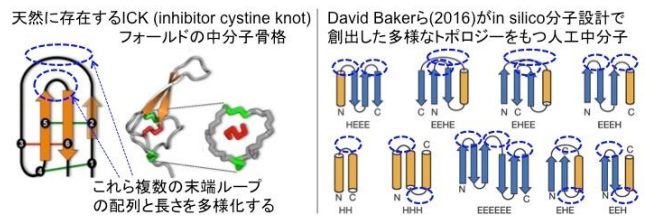


図1. 本研究で用いる中分子骨格の例

いずれの分子骨格も分子内に複数のS-S結合が架橋されており、立体構造上の束縛が強く、安定性が高い。点線で囲まれたループ部分を多様化してライブラリーを構築する。結合を担う残基は複数のループ上に立体的に配置される。Hは α ヘリックス、Eは β ストランドを示す。

膜タンパク質の機能を制御する中分子アプタマーのスクリーニング

昆虫細胞 Sf9 発現系を用いて生産・精製した膜タンパク質を、図2に示すような磁気ビーズを包含した特殊なプロテオリポソーム(ホスファチジルコリン(PC)およびビオチン修飾 PC を用いて再構成)に配向を揃えて埋め込んだ。これをベイトとして、膜タンパク質の細胞外ドメインを特異的に認識し結合するファージ集団を 4~12 サイクル程度の選抜を経て、増幅・濃縮する。選抜過程でのファージ集団の優占度の遷移を次世代シーケンサーにて解析した。各ライブラリーから 50 クローン程度のアプタマー候補を E.coli ペリプラズムで生産後、精製した。

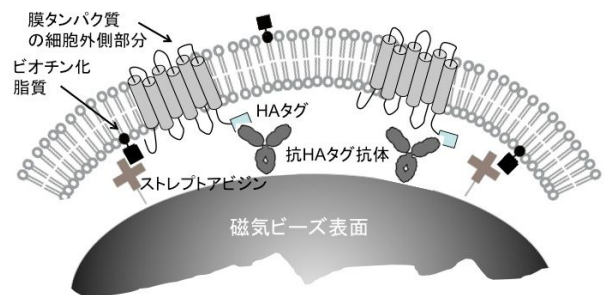


図2. 膜タンパク質の配向をそろえて磁気ビーズ表面に固定化する方法(膜タンパク質の細胞外側部分をリポソーム表面に提示)

① 膜タンパク質のC末端(細胞内側に位置する)にHAタグを付加し、磁気ビーズ表面に固定化した抗HA抗体により膜タンパク質をキャプチャーする。②可溶化した脂質(一部はビオチン化脂質で磁気ビーズ表面のストレプトアビジンに結合する)を添加すると同時に界面活性剤を除去すると膜タンパク質間に脂質二重膜が張られる(磁気ビーズ全体がリポソームの内部に囲まれた状態になる)。

中分子アプタマーの薬理活性・作用機序の構造学的基盤の解明

膜タンパク質/中分子アプタマー複合体を精製し、それを抗原として用いて結晶化促進ツールとしての構造認識抗体を作製した。Fab 抗体断片の添加により、膜タンパク質/中分子アプタマー/Fab の三者複合体の精製品を調製し、この試料を用いてクライオ電子顕微鏡単粒子解析を行なった。

4. 研究成果

立体的束縛を有する安定なヘペプチド分子骨格 (50-90 残基)を基盤として複数の末端ループの配列と長さを多様化した合成ライブラリーを作製した。具体的には分子内に多数のジスルフィド結合が架橋され強い立体的束縛のある安定な中分子ヘペプチド骨格をベースとして、その末端ループの配列と同様化した中分子母集団を人工合成し、ファージディスプレイ系ライブラリーを作製した。病原ウイルス感染のエントリーレセプターとして機能するヒト膜タンパク質 A やがんの転移能獲得・悪性化進展に関与するヒト膜タンパク質 B 等の複数の創薬標的膜タンパク質について、(1) 界面活性剤ミセルに覆われた状態の精製試料、(2)脂質ナノディスクに再構成した状態の試料等を作り、さらにパニングにおいて独自技術を導入することによって、これらの膜タンパク質ターゲットに対して特異的に認識し結合するファージ集団を 4-12 サイクル程度の選抜を経て取得した。膜タンパク質/中分子ペプチド複合体を精製し、それを抗原として用いて結晶化促進ツールとしての構造認識抗体を作製した。Fab 抗体断片の添加により、膜タンパク質/中分子ヘペプチド/Fab の三者複合体の精製品を調製し、クライオ電子顕微鏡単粒子解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kinjo Tomoaki, Terai Kenta, Horita Shoichiro, Nomura Norimichi, Sumiyama Kenta, Togashi Kaori, Iwata So, Matsuda Michiyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 FRET-assisted photoactivation of flavoproteins for in vivo two-photon optogenetics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-019-0541-5	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 -
1. 著者名 Asada Hidetsugu, Inoue Asuka, Ngako Kadji Francois Marie, Hirata Kunio, Shiimura Yuki, Im Dohyun, Shimamura Tatsuro, Nomura Norimichi, Iwanari Hiroko, Hamakubo Takao, Kusano-Arai Osamu, Hisano Hiromi, Uemura Tomoko, Suno Chiyo, Aoki Junken, Iwata So	4. 巻 28
2. 論文標題 The Crystal Structure of Angiotensin II Type 2 Receptor with Endogenous Peptide Hormone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 418 ~ 425.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.12.003	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 -
1. 著者名 Umeda Rie, Satouh Yuhkoh, Takemoto Mizuki, Nakada-Nakura Yoshiko, Liu Kehong, Yokoyama Takeshi, Shirouzu Mikako, Iwata So, Nomura Norimichi, Sato Ken, Ikawa Masahito, Nishizawa Tomohiro, Nureki Osamu	4. 巻 11
2. 論文標題 Structural insights into tetraspanin CD9 function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15459-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ono M, Horita S, Sato Y, Nomura Y, Iwata S, Nomura N	4. 巻 27
2. 論文標題 Structural basis for tumor necrosis factor blockade with the therapeutic antibody golimumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 1038-1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3407	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 -

1. 著者名 Asada H, Horita S, Hirata K, Shiroishi M, Shiimura Y, Iwanari H, Hamakubo T, Shimamura T, Nomura N, Kusano-Arai O, Uemura T, Suno C, Kobayashi T, Iwata S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Structural and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 570-576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-018-0079-8	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 -

1. 著者名 Nagarathinam K, Nakada-Nakura Y, Parthier C, Terada T, Juge N, Jaenecke F, Liu K, Hotta Y, Miyaji T, Omote H, Iwata S, Nomura N, Stubbs M, Tanabe M	4. 巻 9
2. 論文標題 Outward open conformation of a Major Facilitator Superfamily multidrug/H ⁺ antiporter provides insights into switching mechanism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06306-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Terakado-Kimura K, Asada H, Inoue A, Kadji FMN, Im D, Mori C, Arakawa T, Hirata K, Nomura Y, Nomura N, Aoki J, Iwata S, Shimamura T	4. 巻 26
2. 論文標題 Structures of the 5-HT _{2A} receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Structural and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 121-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-018-0180-z	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 -

1. 著者名 Toyoda Y, Morimoto K, Suno R, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Ligand binding to human prostaglandin E receptor EP ₄ at the lipid-bilayer interface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 18-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-018-0131-3	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 -

1. 著者名 Nojima Shingo, Fujita Yoko, Kimura Kanako Terakado, Nomura Norimichi, Suno Ryoji, Morimoto Kazushi, Yamamoto Masaki, Noda Takeshi, Iwata So, Shigematsu Hideki, Kobayashi Takuya	4. 巻 29
2. 論文標題 Cryo-EM Structure of the Prostaglandin E Receptor EP4 Coupled to G Protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 252 ~ 260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2020.11.007	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 -

1. 著者名 Im Dohyun, Inoue Asuka, Fujiwara Takaaki, Nakane Takanori, Yamanaka Yasuaki, Uemura Tomoko, Mori Chihiro, Shiimura Yuki, Kimura Kanako Terakado, Asada Hidetsugu, Nomura Norimichi, Tanaka Tomoyuki, Yamashita Ayumi, Nango Eriko, Tono Kensuke, Kadji Francois Marie Ngako, Aoki Junken, Iwata So, Shimamura Tatsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20221-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Deshpande Chandrika N., Azucenas Corbin R., Qiao Bo, Nomura Norimichi, Xin Vicky, Font Josep, Iwata So, Ganz Tomas, Nemeth Elizabeta, Mackenzie Bryan, Jormakka Mika	4. 巻 11
2. 論文標題 Isolation and thermal stabilization of mouse ferroportin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 26 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matoba Kazuaki, Kotani Tetsuya, Tsutsumi Akihisa, Tsuji Takuma, Mori Takaharu, Noshiro Daisuke, Sugita Yuji, Nomura Norimichi, Iwata So, Ohsumi Yoshinori, Fujimoto Toyoshi, Nakatogawa Hitoshi, Kikkawa Masahide, Noda Nobuo N.	4. 巻 27
2. 論文標題 Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1185 ~ 1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-020-00518-w	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0件

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Norimichi Nomura, Yayoi Nomura, Yumi Sato, So Iwata	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 511
3. 書名 Methods in Enzymology, Vol. 629, "Tumor Immunology and Immunotherapy; Molecular Methods" (Edited by Lorenzo Galluzzi, Nils-Petter Rudqvist)	

1. 著者名 Jaenecke F., Nakada-Nakura, Y., Nagarathinam, K., Ogasawara, S., Liu, K., Hotta, Y., Iwata, S., Nomura, N., Tanabe, M	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 355
3. 書名 Methods Molecular Biology, Vol. 1700, Yamaguchi, A. and Nishino, K. (Eds.) "Bacterial Multidrug Exporters"	

1. 著者名 Norimichi Nomura, Yayoi Nomura, Yumi Sato, So Iwata	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 340
3. 書名 Methods in Molecular Biology, Vol. 2247, Porterszman, A. (Eds.) "Multiprotein Complexes", Springer	

〔産業財産権〕

〔その他〕

薬剤耐性の原因「薬剤汲み出しタンパク質」の排出メカニズムを解明 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/181001_2.html 分子の立体構造から血圧調節の仕組みを原子レベルで解明 - 高血圧症の新しい治療法の開発へ - http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/180702_2.html プロスタグランジン受容体の立体構造を世界初解明 http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/181204_2.html 統合失調症やパーキンソン病の治療薬の標的の構造解明 - 副作用を抑えた薬の合理的な探索・設計が可能に - http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/190205_1.html
--

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------