

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590134

研究課題名(和文)スクリーニング技術を利用したEGFレセプター阻害ペプチドの系統的構造最適化

研究課題名(英文)Systematic structure optimization of the EGF receptor-inhibiting peptide through use of a screening technology

研究代表者

齋藤 一樹 (SAITO, Kazuki)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授

研究者番号：10192585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：過去に開発したEGFレセプターの二量化を阻害する環状ペプチドについて、どの残基が阻害活性を担っているのかを特定するために、レトロインバーソ体や一連のアラニン置換体などを化学合成してそれらの阻害活性を測定し、阻害活性には環状ペプチドの主鎖ではなく側鎖が関与しており、中でもおもにTyr-246の側鎖が寄与していることを明らかにした。しかし、もとの環状ペプチドの阻害活性を増強させる手段がなかなか見つからなかったため、混合溶液中にあって各ペプチドの標的タンパク質に対する親和性を一斉に評価できるスクリーニング手法を開発し、環状ペプチドの構造最適化に適用した。

研究成果の概要(英文)：To identify the residues contributing the inhibitory activity of the previously-developed cyclic peptide against the EGF receptor dimerization, various analogs of the peptide were chemically synthesized and their activities were measured. Judged by activities of the retro-inverso and alanine-substituted analogs, the Tyr-246 side-chain was revealed to be involved in the inhibitory activity. To optimize the structure of the cyclic peptide for acquiring stronger inhibitory activity, a novel high-throughput screening technology was developed, with which affinities of peptides in a mixture solution can be evaluated simultaneously.

研究分野：分子認識化学

キーワード：EGFレセプター 二量化阻害 ループ構造模倣環状ペプチド レセプター創薬 スクリーニング キャピラリー電気泳動 質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

EGF レセプターは、正常細胞の増殖・分化などに深く関わっている一方で、様々ながん組織の細胞において過剰に発現していることから、EGF レセプターの制御異常ががん細胞の無秩序な増殖や転移を引き起こしているのではないかと考えられている。実際に、抗肺がん薬として、EGF レセプターの細胞内領域に存在するチロシンキナーゼドメインを標的とするキナーゼ阻害薬 Iressa<sup>®</sup> (一般名 *gefitinib*) や細胞外領域のリガンド結合部位付近を標的とする抗体医薬 Erbitux<sup>®</sup> (一般名 *cetuximab*) などが開発されてきている。しかし、近年、それらの医薬品の重篤な副作用や高額な薬価が社会問題となっており、これまでとは異なる作用機序を持つ抗 EGF レセプター薬の開発が望まれている。

EGF レセプターは、それまでの生化学的な研究から、細胞外領域にリガンドが結合すると細胞膜上で二量化し、その二量体形成がレセプター活性化の引き金となることが明らかにされていた。私は、2002年、EGF が結合した EGF レセプター細胞外領域の二量化複合体の結晶構造を明らかにし [Ogiso *et al.*, *Cell*, **110**, 775-787 (2002)], その結晶構造中では、細胞外領域を構成するドメイン I~IVのうち、ドメイン II がおもに二量体を形成する際の界面(接触面)となっており、特に、“二量化アーム”と呼ばれる特徴的な二次構造の先端にあるループ部分に水素結合などの分子間相互作用が集中していることを見出した。そこで、私はこのループ構造を模倣した環状ペプチドを設計し (図 1)、その環状ペプチドが、EGF で刺激したときの EGF レセプターの二量化やヒト上皮がん由来の A431 培養細胞における EGF レセプターの自己リン酸化を阻害することを突き止めた。

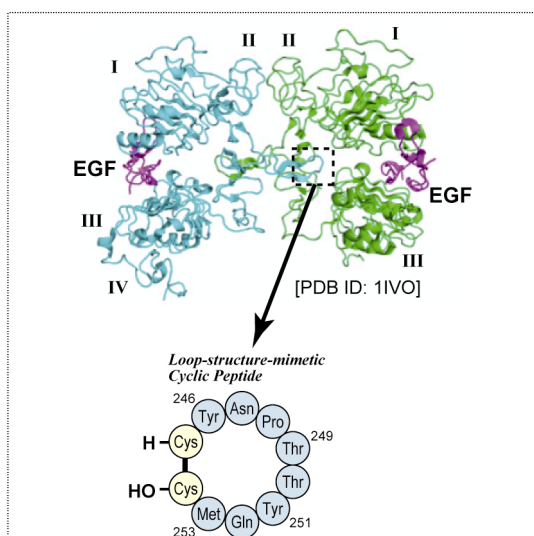


図 1. EGF とそのレセプターの細胞外領域との複合体の結晶構造と、二量化アーム先端ループ構造を模倣した阻害性環状ペプチドの設計

## 2. 研究の目的

前記したように、私はすでに EGF レセプターの“二量化アーム”の先端ループ構造を模倣した環状ペプチドが、EGF レセプターの二量化や自己リン酸化を阻害することを見出していた。しかし、この環状ペプチドのどの部分が阻害活性を担っているのかは明らかにされていなかった。また、EGF レセプターを阻害するこの環状ペプチドの IC<sub>50</sub> は約 10 μM であり、阻害薬リードとしてはまだまだ活性が弱いものであった。

そこで、本研究では、EGF レセプターの二量化を阻害する環状ペプチドの「阻害活性を担う残基の特定」および「レセプターに対する阻害活性の増強にむけた情報の取得」の 2 つを研究目標とし、それらの目標を達成するために、新たなスクリーニング手法を開発して適用することにした。

## 3. 研究の方法

EGF レセプターを阻害する環状ペプチドの中でどの残基が阻害活性を担っているのかを特定するためには、ペプチドを構成するアミノ酸を 1 残基ずつアラニンに置換して阻害活性への影響をみる“アラニン・スキャン”が有効であるが、EGF レセプターの二量化や自己リン酸化を定量的に測定する手順は非常に煩雑で、アラニン・スキャンのシリーズの化合物すべての阻害活性を再現良く測定して比較するためには膨大な手間がかかってしまう。また同様に、環状ペプチドの阻害活性を増強させるためには、環状ペプチドの部分構造を変えた様々なアナログを一つ一つ化学合成してはその阻害活性を測定し、環状ペプチドの構造をどのように変化(最適化)させていったらよいかという情報を集める必要がある。

そこで、本研究の当初計画では、まず、「強い阻害活性を示す化合物は、少なくとも標的である EGF レセプターの細胞外領域に強く結合する」と考え、キャピラリー電気泳動 (CE) と質量分析 (MS) とを組み合わせ、親和性を一斉に評価できるような効率のよいスクリーニング手法を開発することにした。この手法を用いてアラニン置換体やその他のアナログの親和性を評価し、その結果にもとづいて実際にアナログを化学合成して阻害活性を確認しようという計画である。

しかし、初年度に不慮の事故によりスクリーニングシステムを構成する MS 装置が故障し、代替の修理部品の手配に非常に長い期間を要することが判明した。そこで、急遽、当初の研究実施計画を変更し、まずは環状ペプチドの様々なアナログを化学合成してそれらの阻害活性を地道に測定することを先行させ、予定していたスクリーニング手法の開発・適用は MS 装置の修理が完了次第、後追いで実施することにした。

(1) アナログの化学合成による、阻害活性を担う残基の特定と阻害活性増強のための情報の収集

EGF レセプターを阻害する環状ペプチドは 10 残基のアミノ酸から構成され、その両端はジスルフィド結合により環化させるためのシステイン残基である (図 1)。そこで、おもにどの残基が EGF レセプターに対する阻害活性を担っているのかを明らかにするために、両端のシステインおよび二次構造形成(環化)に影響してしまうと考えられるプロリン以外の 7 残基をアラニンに置換したアナログを一つ一つ化学合成し、それらの阻害活性を測定した。

また、阻害活性を担う残基が特定されたら、その残基は保持したまま、それ以外の残基を他のアミノ酸に置換することで環状ペプチドの阻害活性の増強が図れないかを検討した。

さらに、環状ペプチドの阻害活性を増強させる目的で、本来二量化アームが持つ数残基のアミノ酸を環状ペプチドの前後に加えたアナログを化学合成してそれらのアナログの阻害活性を比較した。

(2) 標的タンパク質に対する親和性を一斉評価できるスクリーニング手法の開発と、環状ペプチドのアラニン置換体ライブラリへの適用

すでにペプチド混合物の中から標的タンパク質に親和性のあるペプチドを拾い出してくるスクリーニング手法の開発には着手していたので [Saito *et al.*, *Pept. Sci.* 2010, 287 (2011)]、まずは、この手法を実際に環状ペプチドの一斉親和性測定に適用できるように改良した。

それとともに、このスクリーニング手法に供するための、環状ペプチドのアナログの混合物からなるライブラリを調製した。「ペプチド」は、固相合成というコンビナトリアルなライブラリ合成に適した調製法が最も確立された生体分子の一つである。そこで、固相樹脂上でペプチド鎖を伸長してゆく際に split-and-mix 法 [Geysen *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 222-230 (2003)] という手法を採用し、1 残基ごとにアミノ酸の半分をアラニンに置換して合成し、結果的に環を構成するシステイン以外の残基をランダムにアラニンに置換した環状ペプチドのアラニン置換体ライブラリを作製した。

実際に、市販の EGF レセプターの細胞外領域を標的として用い、調製した環状ペプチドのアラニン置換体ライブラリに CE-MS を用いたスクリーニング手法を適用することにより、アラニンに置換すると親和性が低下する残基を求め、別途、アラニン置換体を化学合成してアラニン・スキャンを行った結果と比較した。

#### 4. 研究成果

(1) アナログの化学合成による、阻害活性を担う残基の確認と阻害活性増強のための情報の収集

①EGF レセプターを阻害するときに認識されているのは環状ペプチドを構成するアミノ酸の側鎖部分である

様々なアナログを化学合成する前に、環状ペプチドの主鎖部分が認識に含まれているのかそれとも側鎖の配向のみが認識されているのかを明らかにするために、環状ペプチドのレトロインバーソ体を化学合成してその阻害活性を調べた。レトロインバーソ体は、環状ペプチドを構成する残基をすべて光学異性の D-アミノ酸で構成し、かつ配列を逆にならべたものであり、もとのペプチドと主鎖の向きは逆になるが、側鎖の配向は同じに保たれたままになる。

A431 細胞の膜画分を調製してリガンド刺激依存的な EGF レセプターの二量化に対する影響を調べたところ、レトロインバーソ体はもとの環状ペプチドとほぼ同程度の阻害活性を示した (図 2)。また、ここには載せていないが、A431 細胞におけるリガンド刺激依存的な EGF レセプターの自己リン酸化や A431 細胞の増殖に対しても、レトロインバーソ体はもとの環状ペプチドと同程度の阻害活性を示した。これらの結果から、環状ペプチドの阻害活性は、その主鎖の方向には関係がなく、おもに側鎖の官能基の配置・配向が認識されていることが明らかとなった。

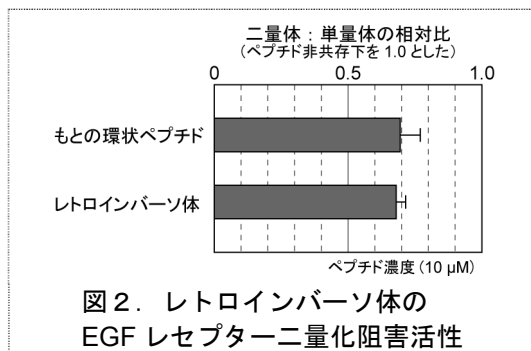


図 2. レトロインバーソ体の EGF レセプター二量化阻害活性

②アラニン・スキャンによる阻害活性を担う残基の特定

環状ペプチドを構成する 10 個の残基のうち、環化に必要な両端のシステイン残基とループ構造の形成(環化)に影響があると思われるプロリン残基以外の 7 個の残基をそれぞれアラニンに置換したアナログを化学合成し、それらのリガンド刺激依存的な EGF レセプターの二量化に対する阻害活性を測定して比較した (図 3)。

7 種すべてのアラニン置換アナログにおいて、もとの環状ペプチドより阻害活性が低下してしまっていたが、その中でも Tyr-246 と

Thr-250 (残基番号に関しては図 1 を参照) をアラニンに置換したものは、ほとんど EGF レセプターの二量化を阻害しなかった。この結果から、この環状ペプチドが EGF レセプター二量化阻害活性を現す際には、特に Tyr-246 と Thr-250 の 2 つの残基の側鎖が認識されていると考えられる。

また、ここには示していないが、同様の阻害活性評価をリガンド刺激で引き起こされる EGF レセプターの自己リン酸化でも測定したところ、自己リン酸化アッセイにおいても Tyr-246 の関与が顕著に見られることがわかった。

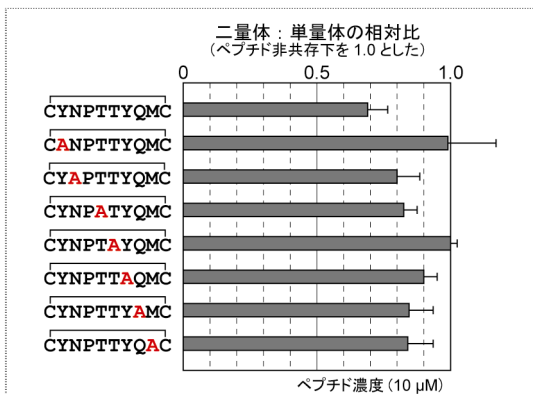


図 3. 環状ペプチドのアラニン・スキャンによる EGF レセプター二量化阻害活性の変化

### ③Met-253 の置換による EGF レセプター阻害活性への影響

環状ペプチドを構成する残基のうち、253 位について、この位置をメチオニンからいろいろなアミノ酸に置換したアナログを化学合成し、EGF レセプターのリガンド刺激依存的な二量化に対するそれらの阻害活性を測定した (図 4)。EGF とレセプター細胞外領域との二量化複合体の結晶構造を精査してみると Met-253 の側鎖の周りには空間的に余裕があるように見えるので、Met-253 を別のアミノ酸に置換してこの空間をうまく埋めることができれば阻害活性の増強が期待できると考えたからである。

253 位をメチオニンよりも小さい側鎖を持つアラニン (Ala) に置換すると、すでにアラニン・スキャンのときに示されていたように、やはり阻害活性は減少した。これに対して、メチオニンよりも側鎖の長さは少し短い大きさとしてあまり変わらないロイシン (Leu) に置換した場合には、阻害活性にはあまり影響がなかった。しかし、メチオニンと側鎖の長さや大きさはほぼ同じだが硫黄原子がメチレン鎖に変わったノルロイシン (Nle) に置換した場合には、アラニン置換体と同程度まで阻害活性が減少してしまった。当初の戦略に反して、253 位に位置するアミノ酸の側鎖の大きさはあまり阻害活性には影響せず、むしろ側鎖の硫黄原子の存在自体

が重要ではないかと思われた。実際にメチオニンの硫黄原子を酸化したメチオニン・スルフォキシド (Met(O)) に置換すると阻害活性は大きく低下してしまった。

グルタミン (Gln) に置換したアナログを含めここで合成した Met-253 を置換したアナログでは、いずれももとの環状ペプチドの阻害活性を上回るような阻害活性を示すものを見出すことはできなかった。

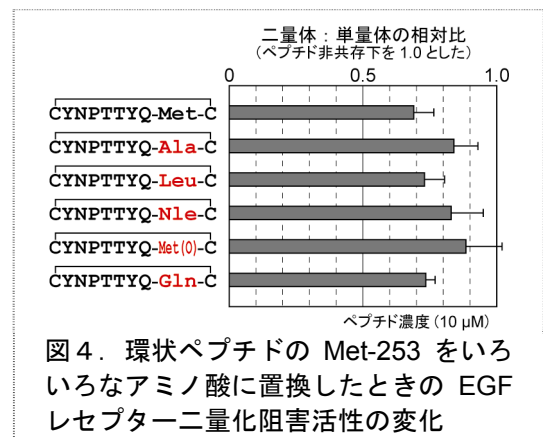


図 4. 環状ペプチドの Met-253 をいろいろなアミノ酸に置換したときの EGF レセプター二量化阻害活性の変化

### ④環外へのアミノ酸の伸長による EGF レセプター阻害活性への影響

ここまで、環状ペプチドを構成する環内の残基を置換しても、もとの環状ペプチドよりも強い阻害活性を示すアナログがまったく得られなかったので、環の部分だけでは十分な活性を発揮することができないのかもしれないと考え、環の外にペプチド鎖を伸ばしたアナログを化学合成し、EGF レセプターに対する二量化阻害活性を測定してみた。環状ペプチドの N 端側に 1, 2, 3 残基、C 端側に 1, 2, 4 残基の配列を伸ばしてみたところ、N 端側にメチオニン 1 残基を付加したものが、EGF レセプターの二量化に対して、唯一もとの環状ペプチドよりも強い阻害活性を示した (図 5)。

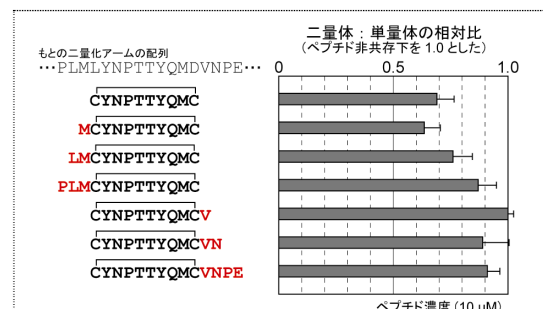


図 5. 環状ペプチドの環外にアミノ酸配列を伸ばしたときの EGF レセプター二量化阻害活性の変化

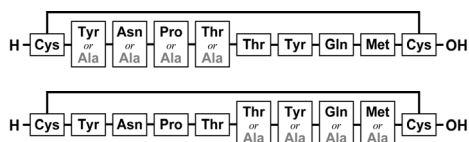
そこで、N 端側に 1 残基付加するアミノ酸をメチオニン以外にも様々なアミノ酸で行ったところ、ここにはデータは示さないが、アスパラギンやスレオニンなど比較的親水

的な小さな側鎖を持つアミノ酸を環の N 端側に付加すると阻害活性が高まることがわかった。

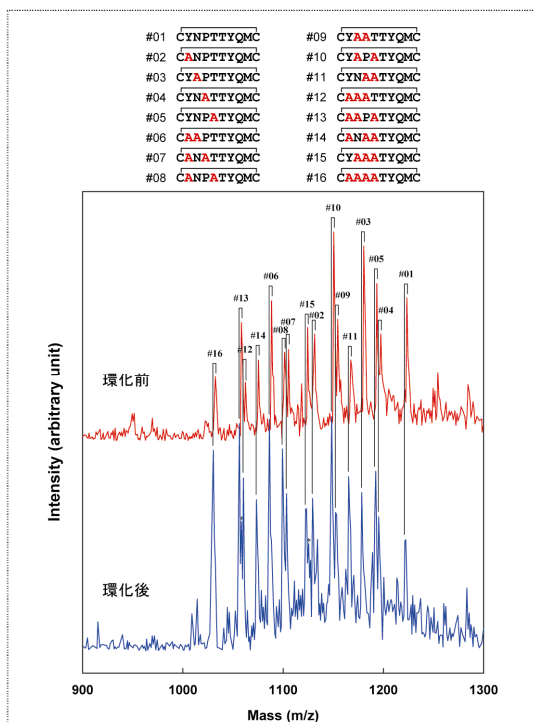
(2) 標的タンパク質に対する親和性を一斉評価できるスクリーニング手法の、環状ペプチドのアラニン置換体ライブラリへの適用

①スクリーニング手法による一斉親和性測定に供する環状ペプチドのアラニン置換体ライブラリの調製

標的タンパク質に対する親和性を一斉に評価できるスクリーニング手法の開発・改良を終えることができたので、その手法を用いてアラニン・スキャンを実施するためのライブラリの調製を行った。環状ペプチドには 2 つのスレオニン残基が含まれること、すべてのアラニン置換体を CE-MS で分離できる保証がなかったことなどの理由から、アラニン置換を配列の前半と後半とに分け、



の 2 種のライブラリを調製することにした。固相樹脂上で split-and-mix 法により直鎖ペプチドを合成し、通常空気酸化によってジスルフィド結合を形成させて環化させた。配列の前半をアラニン置換したライブラリは、**図 6** に示した ESI-MS スペクトルで見ると、#13 と #15 で環化前のペプチドが少し検出されるものの、こちらが期待したすべての



**図 6.** 環状ペプチドの配列の前半をランダムにアラニン置換したライブラリの MS スペクトル

アラニン置換体がライブラリに含まれていることがわかった。また、ここには示していないが、配列の後半をアラニン置換したライブラリも同様に調製することができた。

②スクリーニング手法によるアラニン置換体ライブラリの親和性測定

市販の EGF レセプター細胞外領域を標的として、開発したスクリーニング手法を用いて、ライブラリ中に含まれる環状ペプチドのアラニン置換体アナログの親和性を一斉に測定した。**図 3** で得られた結果と同様に Tyr-246 がアラニンに置換されたペプチドで親和性が低下する傾向が見られたが、残念ながら今回の測定では数多くの夾雑物のピークが重なってしまい詳しい解析には至らなかった。

(3) まとめ

本研究では、数多くの合成アナログを調製したにも関わらず、環状ペプチドの構造最適化に向けた十分な情報は得られず、化学合成や阻害アッセイの労力に見合う結論は得られなかった。やはり今後はスクリーニング手法のような効率のよい評価法の導入が必要だろう。特に、近年、EGF レセプターの二量化アーム付近を標的とした薬剤設計の論文が外国からも数多く出始めており、この環状ペプチドの構造最適化も急務となってきている。

今回は、市販の EGF レセプター細胞外領域を用いて実験を行ったために試料に混入していた夾雑物によるピークが重なり、はっきりした結論は得られなかったが、今後、標的タンパク質の精製純度を向上させることにより、環状ペプチドをもっと強い阻害活性を示すような化合物に改変してゆく手法として本研究で開発したスクリーニング手法が活用されるようになるだろう。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Takaaki Mizuguchi\*, Yukako Yamazaki, Kazuya Kobayashi, Honami Ooe, Mika Iida, Ryunosuke Ninomiya, Kazuki Saito, Kenichi Akaji, Hirokazu Tamamura: Studies on identification of active sites of an inhibitory cyclic peptide against EGF receptor dimerization. *Pept. Sci.* 2014, 163-164 (2015). [査読有]
- ② 齋藤一樹\*: 「プロテオーム時代の創薬に向けた plug-plug ACE 法の利用」 生物物理化学 電気泳動, 第 58 巻, 第 2 号「特集: 最新の電気泳動技術」, 大石正道・近藤格 編 pp. 71-73, 日本電気泳動学

- 会, 2014. [査読無]  
DOI: 10.2198/sbk.58.71
- ③ Kazuki Saito\*, Mamiko Nakato, Takaaki Mizuguchi, Shinji Wada, Hiromasa Uchimura, Hiroshi Kataoka, Shigeyuki Yokoyama, Hiroshi Hirota, Yoshiaki Kiso: Application of plug-plug technique to ACE experiments for discovery of peptides binding to a larger target protein: A model study of calmodulin-binding fragments selected from a digested mixture of reduced BSA. *Electrophoresis*, **35**, 846–854 (2014). [査読有]  
DOI: 10.1002/elps.201300339
- ④ Takaaki Mizuguchi, Naho Ohara, Mika Iida, Ryunosuke Ninomiya, Shinji Wada, Yoshiaki Kiso, Kazuki Saito, Kenichi Akaji\*: Effect of ring size and side-chain orientation of cyclic peptides for the inhibition of EGF receptor dimerization. *Pept. Sci.* 2012, 19–20 (2013). [査読有]
- ⑤ Takaaki Mizuguchi, Naho Ohara, Mika Iida, Ryunosuke Ninomiya, Shinji Wada, Yoshiaki Kiso, Kazuki Saito, Kenichi Akaji\*: Evaluation of dimerization-inhibitory activities of cyclic peptides containing a  $\beta$ -hairpin loop sequence of the EGF receptor. *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 5730–5737 (2012). [査読有]  
DOI: 10.1016/j.bmc.2012.08.013

[学会発表] (計 8 件)

- ① 齋藤一樹: 「プロテオーム時代の創薬に向けた plug-plug ACE 法の利用」, 第 65 回日本電気泳動学会総会 シンポジウム「最新の電気泳動技術 30 の話題」, 2014 年 10 月 25 日, 横浜情報文化センター(神奈川県横浜市) [招待講演]
- ② 水口貴章, 山崎由香子, 小林数也, 大江保奈美, 飯田美佳, 二宮龍之介, 齋藤一樹, 赤路健一, 玉村啓和: 「EGF レセプター二量化阻害環状ペプチドの活性部位に関する研究」, 第 51 回ペプチド討論会, 2014 年 10 月 23 日, 徳島大学蔵本キャンパス大塚講堂 (徳島県徳島市)
- ③ 水口貴章, 二宮龍之介, 飯田美佳, 大江保奈美, 山崎由香子, 小林数也, 齋藤一樹, 赤路健一, 玉村啓和: 「二量体化に着目した新規作用機序の EGF レセプター阻害薬研究」, 創薬懇話会 2014, 2014 年 7 月 10 日, 長良川温泉ホテルパーク (岐阜県岐阜市)
- ④ 水口貴章, 大原菜穂, 二宮龍之介, 山崎由香子, 飯田美佳, 大江保奈美, 齋藤一樹, 赤路健一: 「EGF レセプターの二量化阻害を示す環状ペプチドの構造的特徴」, 日本薬学会 第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- ⑤ 水口貴章, 大原菜穂, 飯田美佳, 二宮龍之介, 和田真治, 木曾良明, 齋藤一樹, 赤路健一: 「EGF レセプターの二量化阻害に必要な環状ペプチドの環の大きさと側鎖配置の効果」, 第 49 回ペプチド討論会, 2012 年 11 月 7 日, かごしま県民交流センター (鹿児島県鹿児島市)
- ⑥ 二宮龍之介, 水口貴章, 大原菜穂, 飯田美佳, 齋藤一樹, 赤路健一: 「EGF レセプターの二量化阻害ペプチドをもとにしたアラニン置換ペプチドの細胞増殖抑制効果」, 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2012 年 10 月 20 日, 武庫川女子大学浜甲子園キャンパス (兵庫県西宮市)
- ⑦ 大原菜穂, 水口貴章, 二宮龍之介, 飯田美佳, 齋藤一樹, 赤路健一: 「EGF レセプターの二量化阻害活性を示す環状ペプチドの環サイズと側鎖配置の評価」, 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2012 年 10 月 20 日, 武庫川女子大学浜甲子園キャンパス (兵庫県西宮市)
- ⑧ Kazuki Saito, Hiromasa Uchimura, Hiroshi Kataoka, Yoshiaki Kiso: Application of proteolytic  $^{18}\text{O}$ -labeling to quantification of native disulfide bond formation in a folding protein by MALDI-MS. The 14th Akabori Conference: German-Japanese Symposium on Peptide Science, 2012 年 9 月 12 日, ヒルトンニセコビレッジ (北海道虻田郡ニセコ町)

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
齋藤 一樹 (SAITO, Kazuki)  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授  
研究者番号: 10192585
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
赤路 健一 (AKAJI, Kenichi)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 60142296
- (4) 研究協力者  
水口 貴章 (MIZUGUCHI, Takaaki)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教 (研究開始当初は、京都薬科大学・薬学部・大学院生)  
研究者番号: 30732557