

令和元年5月23日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19581

研究課題名（和文）TGF-シグナルを制御するペプチドアプタマーの開発

研究課題名（英文）Regulation of the TGF-beta signaling by peptide aptamers

研究代表者

宮園 健一（Miyazono, Kenichi）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任准教授

研究者番号：90554486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：SMAD2/3は細胞内におけるTGF-シグナル伝達系のハブとして作用する転写因子である。本研究では、SMAD2/3の機能を調節するSMAD2/3コファクターのキメラ化を通じて、SMAD2/3に対して強く結合し、その機能を調節するペプチドアプタマーの設計・開発を行った。SMAD2/3のコファクターであるSARA、FOXH1及びSKIのSMAD2/3結合ドメインをタンデムに融合し、そのSMAD2/3結合能を評価したところ、数nMの解離定数でSMAD2/3に結合できるペプチドアプタマーを作製することができた。また、SMAD2/3-コファクター複合体の構造解析に成功し、その結果を論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGF-シグナル伝達の異常は、がんの悪性化や線維症の発症など重篤な疾病と関連している。これらの疾病の治療において、TGF-シグナル伝達系は有望な創薬ターゲットと考えられているが、その制御はシグナルの上流部分を対象とすることがほとんどであった。本研究では、シグナル下流で生じる生命現象（タンパク質分子間相互作用）に着目し、その制御を目指した。本研究の成果に基づき、シグナル伝達系下流における制御が可能となれば、より副作用の少ない形でTGF-シグナルが制御できるようになると期待され、がんや線維症の新たな治療法の開発へとつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：SMAD2/3 are hub proteins that regulate TGF-beta signaling in cell. In this study, we have designed and developed peptide aptamers that bind strongly to SMAD2/3. The peptide aptamers, which are produced by the tandem linkage of SMAD2/3 cofactors, are expected to regulate the function of TGF-beta signaling in cell by the competition with SMAD2/3 cofactors. Among SMAD2/3 cofactors, SMAD2/3 binding domains of SARA, FOXH1 and SKI were fused in tandem, and their SMAD2/3 binding abilities were evaluated by surface plasmon resonance assay. One of the peptide aptamers binds strongly to SMAD2/3 with dissociation constants of nanomolar order. In addition, we have determined the crystal structures of SMAD2/3-cofactor complexes and presented the results as papers.

研究分野：生物物理学

キーワード：がん TGF- ペプチドアプタマー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サイトカインの一種である TGF-β は、細胞の様々な機能を調節する多機能性因子であり、細胞の増殖や分化、アポトーシス、免疫、オートファジー、細胞外マトリックス生産等の制御を担う。TGF-β は、このような生命維持の根幹を担う現象を制御するため、ひとたび TGF-β シグナルの機能が乱れると、癌や繊維症といった重大な疾病や様々な遺伝病が発症する。これらの TGF-β シグナル異常に起因する疾病の治療を目指し、TGF-β シグナル伝達系をターゲットとした創薬研究は非常に有望視されているが、TGF-β シグナルの多機能性がゆえに研究は難航している。TGF-β シグナル伝達系の阻害は、免疫の異常等多くの副作用を併発してしまうからである。

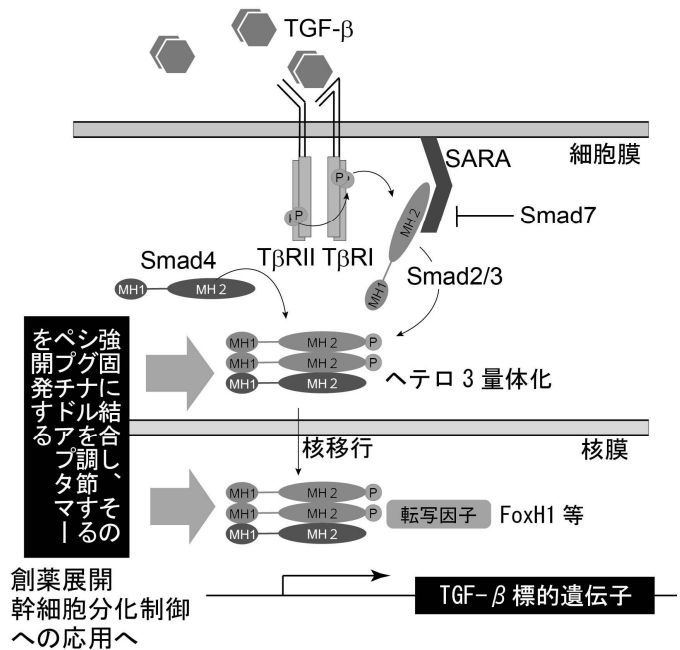
TGF-β シグナルの多機能性は、そのシグナルの細胞内での伝達ネットワークの複雑さと関係がある。細胞表面において受容された TGF-β は、細胞内においてハブ転写因子 SMAD2/3 のリン酸化へと変換される。リン酸化された SMAD2/3 は SMAD4 とヘテロ複合体を形成して核内へと移行し、多種多様な遺伝子の発現制御を行っている。TGF-β シグナルによって活性化される SMAD2/3-SMAD4 複合体は、他の多種多様な因子 (SMAD コファクター) と相互作用することによって調節を受けており、SMAD2/3-SMAD4-コファクター複合体の多様性が TGF-β シグナルに多機能性を持たせる一番の原因となっている。

2. 研究の目的

SMAD コファクターに着目し、細胞内において TGF-β シグナルを抑制しようとする試みは以前から行われている。例えば、SMAD2/3 と競合することによって TβRI による SMAD2/3 のリン酸化を阻害する SMAD7 の過剰発現は、TGF-β シグナルを負に制御する。また、SMAD コファクターの SMAD2/3 結合ドメインをチオレドキシントグと融合させたペプチドアプタマーにより、TGF-β シグナルを阻害しようとする試みもなされている。これらのシステムは、TGF-β シグナルによって引き起こされる疾病の治療に利用できる可能性を秘めており、実際モデルマウスにおいて SMAD7 の人為的な発現により、肺線維症が抑制できることが知られている。

そこで本研究では、強力に TGF-β シグナルを抑制できるペプチドアプタマーの開発を、研究代表者が行ってきた、SMAD2/3-コファクター間の構造学的な解析の結果に基づき行う。これまでに、SMAD2/3 の MH2 ドメインに結合するコファクターは、すべて SMAD2/3 の同じ結合面に結合すると予想されていた。しかしながら、研究代表者の研究成果により、一部の領域が重複することはあるものの、各コファクターは SMAD2/3 の異なる特定の分子表面上に結合することが明らかになりつつある。この観察結果に基づくと、結合領域が重複しない複数のコファクターをつなげたキメラタンパク質を作製すれば、生体内に存在する分子よりもより強く SMAD2/3 に結合するペプチドアプタマーを作製できるはずである。本研究では、SMAD2/3 に対し強く結合し、その機能を調節する新規人工ペプチドアプタマーを作製することを目的とした (図 1)。

シグナルを抑制できるペプチドアプタマーの開発を、研



3. 研究の方法

(1) コファクターのキメラ化

SMAD2/3 コファクターの SMAD2/3 結合領域を融合させることによって、SMAD2/3 に対しより強く結合するペプチドアプタマーを設計・開発しようと試みた。具体的には、SMAD2/3 のより多くのコファクター結合面を経由できるようにキメラタンパク質を設計し、大腸菌の異種タンパク質発現系を利用して大量調製した。これまでに、チオレドキシントグ融合型タンパク質として、転写因子 FOXH1 等の発現に成功していたので、同様の系を用いてキメラタンパク質の調製を行った。また、相互作用解析に用いるヒト由来 SMAD2 及び SMAD3 は、大腸菌を利用した異種発現系を利用して調製した。

SMAD2/3 のコファクターとして知られている SKI (転写のコリプレッサー) 等の SMAD2/3 結合領域 (ともに 20 残基程度) を利用し、キメラタンパク質を作製した。また、SMAD2/3 のリン酸化を促進するコファクター-SARA と FOXH1 のキメラタンパク質も作製した。これらのタンパク質

は、チオレドキシシン融合型タンパク質として大量調製を行った。

得られたキメラタンパク質の SMAD2/3 結合能を、表面プラズモン共鳴法によって評価した。具体的には、ヒスチジンタグを用いて NTA チップ上に SMAD2/3 を固定化し、作製したキメラタンパク質との相互作用を解析した。

(2) 構造に基づいたキメラタンパク質の最適化

SMAD2/3 に対し結合するコファクター及びキメラタンパク質と SMAD2/3 の複合体を調製し、X線結晶構造解析法による構造決定を試みた。得られた複合体構造情報をもとに、SMAD2/3 に対しより強く結合するキメラタンパク質を設計し、その SMAD2/3 結合能を表面プラズモン共鳴法等によって評価することを目指した。

4. 研究成果

(1) SMAD2/3 によるコファクター認識機構の解明

SMAD2/3 に対して結合が競合しないコファクターのキメラ化を行うためには、SMAD2/3 によるコファクター認識機構をより詳細に理解する必要があった。そこで、本研究で研究対象としていた FOXH1、SKI、SMAD2/3 の大量調製と、SMAD3-FOXH1 複合体の結晶化及び SMAD2-SKI 複合体の結晶化を行った。大型放射光施設 Photon Factory にて、得られた結晶の X 線回折実験を行ったところ、それぞれ構造解析可能な良好な X 線回折データを取得することに成功し、構造が既知の SMAD2/3 構造をモデルとした分子置換法によって、複合体の構造を決定した。得られた複合体構造を解析したところ、SMAD2/3 分子表面上には、コファクター結合性の疎水性パッチが複数存在することが明らかになった (Science Signaling, 2018)。各コファクターは、これらの疎水性小領域の一つないし複数を選択し、それらをつなぎ合わせることで SMAD2/3 に対し結合することが予想された (図 2)。コファクターのキメラ化は、このモデル (SMAD cofactor code) を基に設計した。

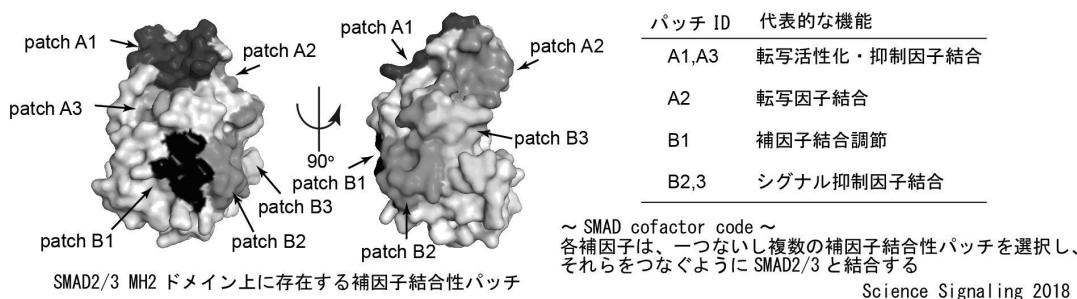


図 2 : SMAD2/3 MH2 ドメイン分子表面上に存在するコファクター結合性疎水性パッチ

(SMAD2/3 MH2 ドメイン上には、A1-A3 及び B1-B3 の疎水性パッチが存在する)

(2) コファクターのキメラ化

図 2 で示すコファクター結合性の疎水性パッチをより長く経由するようにコファクターのキメラ化を行った。転写因子 FOXH1 は、図 2 のパッチ A2-B3-B2 に結合するコファクターである。この FOXH1 に対し、図 2 のパッチ A1-B1 に対して結合する SARA を融合したキメラタンパク質を作製した。FOXH1 及びキメラタンパク質 (SARA-FOXH1) の SMAD2/3 に対する結合を表面プラズモン共鳴法により調べたところ、SMAD2 および SMAD3 に対する FOXH1 の解離定数 (K_D) は、それぞれ $4.82 \mu\text{M}$ および $8.00 \mu\text{M}$ と計算された。一方、SMAD2 および SMAD3 に対する SARA-FOXH1 の K_D は、 $0.482 \mu\text{M}$ および $0.539 \mu\text{M}$ と計算され、キメラ化を行う前と比較し、結合が 10 倍近く増強されることが明らかになった (図 3)。

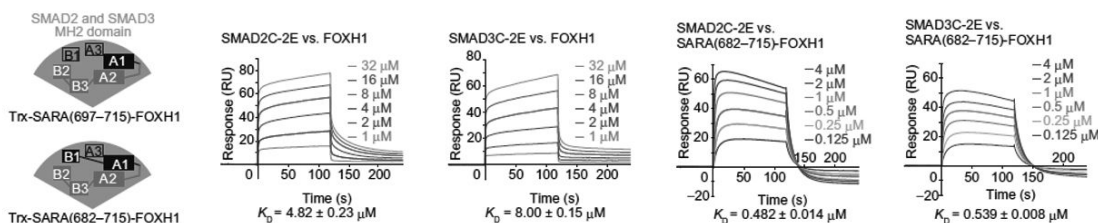


図 3 : コファクターのキメラ化による結合力の増強 (表面プラズモン共鳴による測定)

SMAD2/3 は 3 量体を形成して機能を発揮するタンパク質である。そこで次に、複数の SMAD2/3 を経由するようにキメラタンパク質を設計し、その SMAD2/3 に対する結合力を表面プラズモン共鳴法により評価した。三つのコファクターを融合させたキメラタンパク質 SARA-FOXH1-SKI は二つの SMAD2/3 を経由して結合することが予想される (図 4)。SARA-FOXH1-SKI キメラタン

パク質の SMAD2/3 に対する解離定数を求めたところ、SMAD2 に対しては 4.9 nM、SMAD3 に対しては 4.5 nM となり、SARA-FOXH1-SKI キメラタンパク質は SMAD2/3 に対してきわめて強く結合することが明らかになった(図4)。このキメラタンパク質は、SMAD2/3 に結合する多くのコファクターと競合し、その機能を抑制することができるかと期待される。

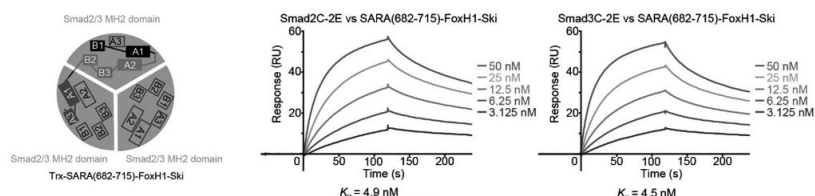


図4：SMAD2/3 に対する SARA-FOXH1-SKI の結合 (表面プラズモン共鳴による測定)

(3) 構造に基づいたキメラタンパク質の最適化

これまでに作製した SMAD2/3 に対して強い結合力を持つ SARA - FOXH1 - SKI 融合ペプチドの構造基盤を解明するため、SMAD2/3 と SARA - FOXH1 - SKI 融合ペプチドの複合体結晶構造解析を行った。しかしながら、SMAD2/3-SARA - FOXH1 - SKI 融合ペプチド複合体は、溶解度が極めて悪く、複合体の結晶化を行うことができなかった。一方、SMAD2/3 と相互作用する別のコファクター MAN1 の SMAD2 複合体構造解析に成功し、その構造基盤を論文として発表した (Nucleic Acids Research, 2018)。これにより、SMAD2/3 に対して相互作用するコファクターの構造基盤がより詳細に明らかになった。得られた構造情報を基に、より強く SMAD2/3 と結合できるペプチドアプタマーの設計開発を進めることができると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Miyazono K, Ohno Y, Wada H, Ito T, Fukatsu Y, Kurisaki A, Asashima M, Tanokura M. Structural basis for receptor-regulated SMAD recognition by MAN1. *Nucleic Acids Res.* 46, 12139-12153 (2018), DOI: 10.1093/nar/gky925

Miyazono K, Moriwaki S, Ito T, Kurisaki A, Asashima M, Tanokura M. Hydrophobic patches on SMAD2 and SMAD3 determine selective binding to cofactors. *Sci. Signal.* 11, ea07227 (2018), DOI: 10.1126/scisignal.aao7227

[学会発表](計 2件)

宮園健一、森脇沙帆、大野陽介、和田ひかる、伊藤友子、栗崎晃、浅島誠、田之倉優 TGF-シグナル伝達系における主要転写因子 SMAD2/3 の補因子選択機構 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日(火)~30日(金) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

宮園健一、森脇沙帆、大野陽介、和田ひかる、伊藤友子、栗崎晃、浅島誠、田之倉優 TGF-シグナル伝達系における主要転写因子 SMAD2/3 の補因子選択機構 日本結晶学会 2018年度年会および総会 2018年11月10日(土)~11日(日) 東京工業大学・大岡山キャンパス(東京都目黒区)

[図書](計 2件)

宮園健一、田之倉優『シグナリングに載った日本人研究者』コスモ・バイオ株式会社、2019 Issue、§「SMAD2 および SMAD3 によるコファクターの選択は多様な疎水性パッチの組み合わせによって決定される」

宮園健一・田之倉優『実験医学』羊土社、2018 9月号、§カレントトピックス TGF-シグナルの主要転写因子 SMAD2/3 によるコファクター選択機構

[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

<https://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/2018/20180328-1.html>

6. 研究組織

研究代表者のみ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。