

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05348

研究課題名(和文) ペプチドタグ間の化学反応に基づく相互作用検出を利用した薬剤結合蛋白質の網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive screening of drug-binding proteins using a detection method for their interactions based on chemical reactions between reactive peptide tags

研究代表者

高橋 剛 (Takahashi, Tsuyoshi)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：90345380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまでに、化合物-タンパク質間相互作用を酵素活性として読み出す新しい検出方法(IDNCL-ER)を開発してきている。本研究では、薬剤や薬剤候補化合物が相互作用するタンパク質を網羅的に探索するために、合成化合物とタンパク質間の相互作用を簡便に検出する方法の開発を目的とした。そのために、レポーター酵素として、ラクタム環分解酵素であるラクタマーゼ(Lac)を用いた系の構築を試みた。抗生物質耐性の獲得による大腸菌の生存で化合物-タンパク質間の相互作用を判定できると期待した。モデル実験から、化合物-タンパク質間の相互作用について、Lac活性を指標として検出できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、薬剤などの化合物に結合するタンパク質を網羅的に探索する方法を開発する基礎的研究である。開発した方法を用いて、特定の薬剤に結合するオフターゲットタンパク質の探索が可能となれば、副作用などの原因の解明に繋がる可能性が期待できる。それにより、副作用を低減する薬剤開発なども進展すると期待できる。このように本研究は、学術的かつ社会的に意義のある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, IDNCL-ER, a detection system for ligand-protein interactions, has been improved to discover the proteins that bind to drugs and drug candidates. To this purpose, we employed  $\beta$ -lactamase, which is known as an enzyme to break  $\beta$ -lactam ring, as a reporter enzyme. A split intein, which can self-catalyze protein trans-splicing (PTS) reaction, was also employed to develop the detection method. In the detection method, a synthetic ligand such as atorvastatin, a known cholesterol-lowering drug, was conjugated with the short peptide tag containing the C-terminal sequences of split intein and  $\beta$ -lactamase. When the synthetic ligand binds to a target protein, PDE6D, bearing N-terminal sequences  $\beta$ -lactamase and split intein, PTS reaction occurs and active  $\beta$ -lactamase is generated. Using this method, we have assessed the interactions between atorvastatin and PDE6D in vitro, and in *E. coli*.

研究分野：ペプチド工学

キーワード：オフターゲットタンパク質 ドラッグ・リポジショニング ラクタマーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

がんなどの疾患に関連したタンパク質を標的とした化合物探索などにより、様々な分子標的薬が開発され、実際に使われている。しかし狙った分子以外のオフターゲットへの相互作用を完全に抑制することが容易ではないため、ときに薬剤とオフターゲットとの相互作用が重大な副作用を引き起こす。一方、既存の薬剤の中から、本来の標的分子以外に相互作用するオフターゲット分子を積極的に見つけ出すことで、全く異なる作用機序を示す薬剤としての利用が期待されている。そのようなオフターゲット分子を見つけ出すためには、特定の化合物と相互作用するタンパク質を網羅的に探索し、弱い相互作用も含めて拾い上げることが重要である。

当研究室ではこれまでに、合成化合物とタンパク質間の相互作用を検出する方法として、相互作用依存ペプチド連結反応および酵素再構成 (IDNCL-ER) システムの開発を行ってきた。この方法では、合成化合物とタンパク質間の相互作用に依存して native chemical ligation (NCL) 反応が進行し、生成したペプチド断片と別の酵素断片との相互作用による酵素再構成により、活性型酵素が生成する。一方、タンパク質トランススプライシング (PTS) 活性をもつ分割型インテインは、NCL 反応と同様に、検出用のレポータータンパク質が生成する。IDNCL-ER や PTS 反応を利用することで、合成化合物とタンパク質間の相互作用について、酵素活性を指標として検出できる。PTS 反応と抗生物質耐性酵素を組み合わせることで、簡便に合成化合物とタンパク質間の相互作用を調べることができると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、薬剤や薬剤候補化合物が相互作用するタンパク質を網羅的に探索するために、合成化合物とタンパク質間の相互作用を簡便に検出する方法の開発を目的とした。そのために、レポーター酵素として、βラクタム環分解酵素であるβラクタマーゼ (βLac) を用いた系の構築を試みた。抗生物質耐性の獲得による大腸菌の生存で化合物-タンパク質間の相互作用を判定できると期待した (図1)。

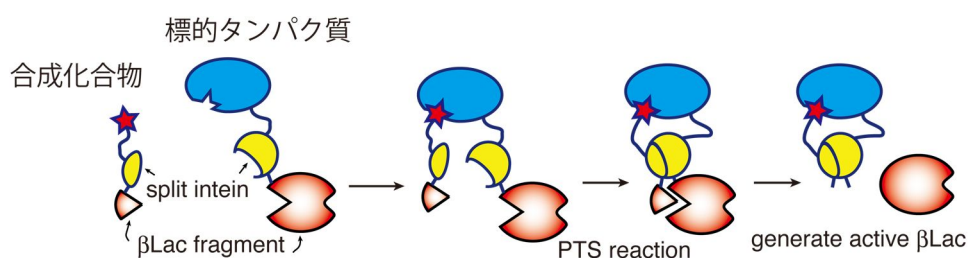


図1. 本研究で構築した化合物と相互作用検出の模式図。

## 3. 研究の方法

### (1) TEM-1 βラクタマーゼ (βLac) をレポーター酵素とした相互作用検出系の構築

合成化合物とタンパク質間の相互作用について、TEM-1 βラクタマーゼ (βLac) をレポーター酵素とした検出系の構築を試みた。βLac は分泌タンパク質であるため、化合物-タンパク質間の相互作用を大腸菌ペリプラズムや外膜表層に発現させることができる。βLac のC末端にある Trp 残基 (Trp290) は、229 残基目の Trp と相互作用しており、立体構造の形成や酵素活性の発現に大きく寄与している。そこでβLac のC末端2残基を欠失したβLacΔC を構築した。βLacΔC のC末端側に、当研究室で開発した Npu DnaE インテイン変異体のN末端断片と標的タンパク

質を配置した。標的タンパク質のモデルとして、リン酸化ペプチドに結合する Src SH2 および高脂血症薬アトルバスタチンと結合する PDE6D を用いた。相手となる合成化合物として、リン酸化チロシン含有ペプチド (pYEEI) とアトルバスタチンを用いた。βLac の C 末端 2 残基 (His-Trp) を Cys-Trp に変更したペプチドの N 末端側に分割インテイン変異体の C 末端断片と pYEEI 配列を配置した。pYEEI ペプチドと Src SH2 が相互作用することで、インテイン断片間が近づき、タンパク質トランススプライシング (PTS) が進行する。それにより、活性型βLac が生成する。このβLac 活性を測定することで、pYEEI と Src SH2 間や、アトルバスタチンと PDE6D 間の相互作用の有無を評価できると期待した。タンパク質は大腸菌を用いて発現し、Ni-NTA カラムおよびゲルろ過により精製した。ペプチドは、Fmoc 固相法により合成し、逆相 HPLC により精製した。

#### (2) βLac 活性測定による合成化合物とタンパク質間の相互作用の検出

合成および精製した各化合物とタンパク質間の相互作用について検討した。SH2 または PDE6D タンパク質 (5 μM) と pYEEI またはアトルバスタチン (10 μM) を混合し、25°C で反応を行った。一定時間ごとにサンプリングし、βLac の基質であるニトロセフィンを用いて、βLac 活性を測定した。また、各タンパク質 (50 nM) に対し、化合物を種々の濃度で混合し、24 時間後に酵素活性を測定した。

#### (3) 標的タンパク質を大腸菌外膜に提示した系の構築と相互作用の検出

標的タンパク質を大腸菌外膜上で発現させることで、合成化合物とタンパク質間の相互作用について、寒天培地上で評価する系の構築を試みた。(1) で設計したインテインおよびβLac 配列を付加した標的タンパク質の N 末端側に、大腸菌外膜に挿入される大腸菌リポタンパク質 (Lpp) と OmpA 配列 (Lpp-OmpA) を付加したタンパク質を設計した。PCR により、Lpp と OmpA 配列を増幅し、目的タンパク質を発現する遺伝子を構築した。構築した遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子に変換した pCold ベクターに挿入した。大腸菌 BL21-pG-Tf2 を形質転換し、isopropyl β-D-galactopyranoside (IPTG) で発現誘導した。合成化合物の溶液を塗布したアンピシリンまたはカルベニシリン含有寒天培地に大腸菌を塗布し、15°C で培養した。

## 4. 研究成果

#### (1) TEM-1 βラクタマーゼ (βLac) をレポーター酵素とした相互作用検出系の構築

アトルバスタチンは、通常のペプチド合成における脱樹脂・脱保護条件である trifluoroacetic acid (TFA) で分解するため、アトルバスタチンを導入する前のペプチドを脱樹脂・脱保護を行った後、溶液中でペプチドの N 末端にアトルバスタチンを導入することで合成した。一方、SH2 や PDE6D を担持したタンパク質は、ペリプラズムまたは細胞質内で発現させることで、目的のタンパク質が得られた。Superdex 200 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより、高純度のタンパク質を獲得した。

#### (2) βLac 活性測定による合成化合物とタンパク質間の相互作用の検出

反応時間依存性を調べた結果、βLac の酵素活性は、pYEEI-SH2、アトルバスタチン-PDE6D の組み合わせとともに、約 48 時間でほぼ一定となった。この変化は、SDS-PAGE で PTS 反応の進行を調べた結果とよく一致した。また、合成化合物の濃度を变化させた実験では、合成化合物の濃度の増加に伴い、βLac 活性が増加、一定となった。得られた酵素活性をもとに、合成化合物と標的タンパク質間の解離定数を算出したところ、妥当な値となった (図 2)。これらの結果から、設計通りに、合成化合物とタンパク質間の相互作用に依存して、PTS 反応が進行し、活性型のβLac が生成していることが明らかとなった。

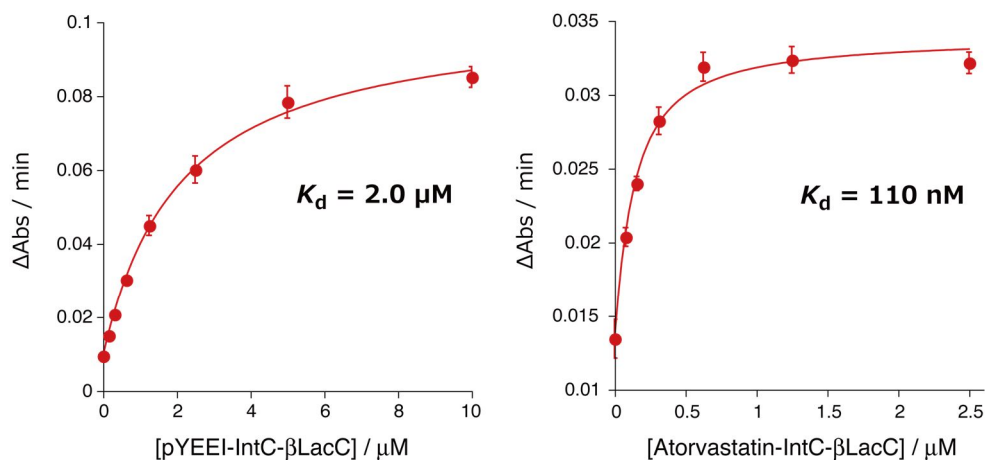


図 2. 活性型 $\beta\text{Lac}$  の生成を指標とした相互作用検出の結果 . ( 左 ) pYEEI と SH2 間の相互作用、( 右 ) アトルバスタチンと PDE6D 間の相互作用 .

### ( 3 ) 標的タンパク質を大腸菌外膜に提示した系の構築と相互作用の検出

大腸菌の外膜に提示した標的タンパク質と、寒天培地に塗布した合成化合物が相互作用することで、大腸菌外膜上に活性型 $\beta\text{Lac}$  が生成すると期待した。実際に、 $\beta$ ラクタム系抗生物質であるアンピシリンやカルベニシリンを含む培地中において、相互作用する組み合わせのときのみ、大腸菌が生育することが明らかとなった。今後はこの条件をもとに、実際にタンパク質ライブラリなどを用いた実験を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawase Misaki、Fujioka Meiko、Takahashi Tsuyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Activation of Protease and Luciferase Using Engineered Nostoc punctiforme PCC73102 DnaE Intein with Altered Split Position	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 577 ~ 584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202000609	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 Tsuyoshi Takahashi	4. 巻 92
2. 論文標題 Generation of Active Protease Depending on Peptide-Protein Interactions Using Interaction-Dependent Native Chemical Ligation and Protein Trans-Splicing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bull. Chem. Soc. Jpn.	6. 最初と最後の頁 1767-1772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20190159	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 Takahashi Tsuyoshi、Hagiwara Hiroaki	4. 巻 57
2. 論文標題 Detecting ligand-protein interactions inside cells using reactive peptide tags and split luciferase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 9906 ~ 9909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1CC03556H	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18件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高橋剛
2. 発表標題 反応性ペプチドタグを用いた合成化合物 - タンパク質間相互作用の酵素活性による検出
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋剛、萩原弘顕
2. 発表標題 Detection of ligand-protein interactions using reactive peptide and/or intein tags capable of activating reporter enzymes
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩淵泰世、高橋剛
2. 発表標題 分割型大豆由来ペルオキシダーゼと分割型インテイン融合体の構築
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋剛
2. 発表標題 インテインタグを用いた合成化合物 - タンパク質間相互作用の検出
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩原弘顕、藤井絵里帆、石川佳歩、高橋剛
2. 発表標題 合成化合物 - タンパク質間相互作用に依存したラクタマーゼ生成系の構築
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋原弘顕、藤岡芽生子、高橋剛
2. 発表標題 ペプチドタグの連結とNanoLuc 再構成を利用したアトルバスタチンターゲットタンパク質間相互作用の検出
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋剛
2. 発表標題 人工分割インテインの相補的応用を用いたNanoLucルシフェラーゼ生成システムの構築
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋剛、秋原弘顕
2. 発表標題 ライゲーション反応とレポーター酵素再構成を利用したリガンド-タンパク質間相互作用の検出
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋原弘顕、高橋剛
2. 発表標題 リガンド-タンパク質間相互作用に依存したタンパク質スプライシングを利用した活性型酵素生成系の構築
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋剛、萩原弘顕
2. 発表標題 ペプチドタグ間のライゲーションとNanoLucレポーターを用いた合成化合物 - タンパク質相互作用の細胞内検出
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤岡芽生子、荒井 将吾、高橋剛
2. 発表標題 IDNCL-ER法を用いたがん関連タンパク質に結合するペプチドの探索
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋剛
2. 発表標題 NanoLucレポーターを用いたIDNCL-ERの構築とリガンド - タンパク質間相互作用の検出
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Meiko Fujioka, Tsuyoshi Takahashi
2. 発表標題 Screening of KRAS-Binding peptides from Positional-Scanning Library using IDNCL-ER Detection System
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Tsuyoshi Takahashi
2. 発表標題 Generation of Reporter Enzymes Triggered By Protein Trans-Splicing Employing Engineered Split Intein and Synthetic Peptide
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萩原弘顕、岩淵泰世、藤井絵里帆、高橋剛
2. 発表標題 合成化合物-タンパク質間相互作用に依存した ラクタマーゼ生成系の構築
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩淵泰世、高橋剛
2. 発表標題 Construction of curculary permutated soybean peroxidase
3. 学会等名 58th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 巻本亜樹、高橋剛
2. 発表標題 反応性タグを用いた相互作用検出系による翻訳後修飾ペプチドとSkp1-Fboxタンパク質複合体との相互作用の検出
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺雄太郎、高橋剛
2. 発表標題 分割インテインとカナマイシンキナーゼ k の再構成を利用したペプチド-タンパク質間相互作用の大腸菌内での検出
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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