

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19390032

研究課題名（和文）創薬を目指したコラーゲンのケミカルバイオロジー

研究課題名（英文）Chemical biology of collagen toward drug development

研究代表者

小出 隆規（KOIDE TAKAKI）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：70322253

研究成果の概要（和文）：コラーゲン結合性をもつ種々の生理活性タンパク質に対する阻害剤を取得するための high-throughput screening 系を確立した。この系を用いて、シャペロン HSP47、血液凝固に関わる Glycoprotein VI (GPVI)、von Willebrand 因子(VWF)、血管新生阻害活性をもつ色素上皮由来因子(PEDF)、クロストリジウム菌コラゲナーゼに対する阻害剤候補化合物を得た。PEDF に結合性を示したペプチドの構造 - 活性相関研究から、PEDF の血管新生阻害活性の発現におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have developed a facile high-throughput screening system to obtain inhibitors for collagen-protein interactions. By using this system, we obtained inhibitors for HSP47 (collagen-specific chaperone), GPVI (platelet collagen receptor), VWF (blood coagulation factor), and clostridial collagenase (exotoxin causing gas gangrene). Results obtained from a structure-activity relationship study of PEDF-binding peptides have implied involvement of heparan sulfate proteoglycans in PEDF's anti-angiogenic activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：蛋白質化学・生化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計、ペプチド、コラーゲン、スクリーニング、タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

コラーゲンは一般には構造タンパク質に分類され、生物的には不活性であるかのような印象を持たれがちである。しかし、コラーゲンは、その3重らせん構造上に提示された様々なアミノ酸配列（=機能配列）を認識する数十種類のタンパク質と結合することに

よって、多彩な生物機能を発揮している。

また、コラーゲン結合タンパク質の中には、疾患の原因となっているものや、病態の進行と密接に関わっているものも多数知られている。以下に代表的なものを列挙する。

- HSP47（コラーゲンの産生の促進）
- Glycoprotein VI（GPVI）および von

Willebrand 因子 (VWF) (共に血液凝固因子)  
・色素上皮由来因子 (PEDF: 血管新生阻害)  
・Matrix metalloproteinase I (癌転移促進)  
・細菌性コラゲナーゼ (感染症における組織障害および壊死)

したがって、これらタンパク質とコラーゲンとの結合阻害剤は創薬のリードとして有用であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ペプチド・タンパク質科学に基礎を置く独自の方法論を利用して、これらタンパク質とコラーゲンとの結合を、アミノ酸残基レベルで詳細に検討する。それにより、タンパク質-コラーゲン相互作用インターフェイスに関する構造情報を得、創薬リードの創出につなげる。

また、コラーゲン-タンパク質相互作用の阻害剤を探索するために独自に開発した *in vitro* high-throughput screening 系を確立する。それをもちいて網羅的な解析を行い複数のコラーゲン結合タンパク質に対する低分子量阻害剤を取得し、創薬リード化合物として提供する。

## 3. 研究の方法

大腸菌を宿主として産生したリコンビナント HSP47、GPVI-D1D2 ドメイン、VWF-A3 ドメイン、PEDF、クロストリジウム菌コラゲナーゼのコラーゲン結合ドメインを材料として、これらタンパク質とコラーゲンとの結合を阻害するペプチド性および低分子量化合物のスクリーニングを行った。

スクリーニングには、タンパク質の結合により試験管内でのコラーゲンの線維化が抑制されるという現象を利用した、384 プレート上での濁度測定アッセイを確立し、これを利用した。

ペプチド性のヒット化合物が得られた場合には、アミノ酸置換したペプチドを用いた構造-活性相関研究を *in vitro* で行い、最小の配列モチーフの同定を行った。

## 4. 研究成果

(1) コラーゲン結合タンパク質阻害剤取得のための high-throughput screening 系の確立

コラーゲンとタンパク質との結合阻害物質を獲得するためのスクリーニング系として、384-well プレートフォーマットで実施できる安価かつ簡便な方法を確立した。この系は、調べたすべてのコラーゲン結合タンパク質において共通に利用することができる汎用性の高いものである。また、ある化合物の活性を複数のタンパク質に対して共通のフォーマットで測定できるため、取得した化合物の特異性の評価にも有用であることを示

した。

(2) HSP47 のコラーゲン認識機構および HSP47 阻害剤のスクリーニング

すでに得ていた HSP47 結合性コラーゲン様ペプチドをリード化合物として、異常アミノ酸を含むアミノ酸置換による徹底した構造-活性相関研究を実施した。その結果、HSP47 は、コラーゲン 3 重らせん上に提示された 2 つのアミノ酸残基の側鎖を認識して結合していることが強く示唆された。

また、低分子量化合物のスクリーニングから、脂肪酸誘導体およびトリペプチド誘導体が活性化化合物として得られた。脂肪酸誘導体については今後、構造-活性相関研究を行う。また、トリペプチド誘導体については、検体に微量に混在していた別の化合物が活性本体であることが明らかになったため、今後活性本体化合物の分離と構造決定を進める。

(3) GPVI により認識されるペプチドの取得

コラーゲン様 3 重らせんペプチドのスクリーニングから、GPVI とコラーゲンとの結合を阻害するペプチドを得た。その後の解析から、このペプチドは GPVI と混合すると複合体の不溶性沈殿を形成し、また、血小板凝集に対して agonistic に働くことが明らかになった。

(4) PEDF が認識するコラーゲンの構造

3 重らせんペプチドのスクリーニングから PEDF とコラーゲンとの結合を特異的に阻害するペプチドを得た。アミノ酸置換による構造-活性相関研究の結果から、PEDF が認識するコラーゲンの構造モチーフは 3 重らせん上の KGXRGFXGL であることが明らかになった。このモチーフは既知のヘパリン/ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合配列である KGHR と重複していたため、ヘパリン/ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合についても精査した。その結果、ヘパリン/ヘパラン硫酸はより高い特異性を持ったコラーゲン認識をしていることが明らかとなり、その結合モチーフは KGHRG(F or Y) と決定された。

さらに、PEDF は *in vitro* でコラーゲン上ヘパリンと競合することが示された。このことは、PEDF の血管新生阻害活性の発現において、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、コラーゲンとの 3 者の相互作用が重要であることを示唆している。

(5) コラーゲンの線維形成を阻害する低分子量化合物の取得

コラーゲン結合タンパク質に対する阻害剤獲得のためのスクリーニングの過程で、コラーゲンに直接作用して、その線維形成を阻害する数種の化合物が得られた。そのうちひ

とつは抗ガン剤として使用されているシスプラチンであった。しかし、シスプラチンそのものにはコラーゲンに対する効果はなく、スクリーニング検体の溶媒として用いていたジメチルスルホキシド(DMSO)とシスプラチンとの反応生成物(シスプラチン-DMSO 錯体)が活性の本体であることが分かった。また、シスプラチン-DMSO 錯体は3重らせんを形成したコラーゲン上に数か所の特異的な結合部位を持つことを明らかにした。

シスプラチン-DMSO 錯体は、細胞に対する毒性をほとんど消失していたことから、新しいタイプの線維化阻害剤の候補として有望であると考えられる。

#### (6) その他

VWF および細菌由来コラゲナーゼを対象とした阻害化合物のスクリーニングからは新規の活性物は得られなかった。

しかし、クロストリジウム菌由来コラゲナーゼが認識する3重らせんペプチドにスピンドラベル化剤 Proxyl を結合したペプチドを用いた NMR 解析から、コラゲナーゼはコラーゲン3重らせんを1方向でのみ結合することができることが明らかになるとともに、3重らせんが緩んだ領域を認識することも示唆された。

#### (7) 総括

本研究は、創薬ターゲットとしてのポテンシャルをもつ複数のコラーゲン結合タンパク質をターゲットとして、従来行われてこなかった新しい切り口からの創薬研究として実施された。

とくに、本研究で確立したコラーゲンとタンパク質との結合阻害剤を獲得するためのスクリーニング系を用いることによって、高効率に研究が実施でき、多くの知見が得られた。ペプチドを用いた研究成果からは、コラーゲン結合タンパク質のコラーゲン認識機構および作用メカニズムの解明につながる有益な情報が得られ、今後の創薬基礎研究につながるものとなった。

また、本研究からは複数の低分子量化合物が得られており、これらは今後の創薬リード化合物の創出につながるものと期待できる。さらに、本研究で実施したスクリーニングが本格的な創薬のためのスクリーニングとしても利用できることが示されたため、今後、ターゲットタンパク質を拡大するとともに、スクリーニング検体の質および量を増大させることによって、さらなる創薬リードの発掘にも貢献できるものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① 小出隆規、コラーゲン様三重らせんペプチドを利用した生化学研究、生化学、査読有、82巻、2010、474-483
- ② Y. Nishikawa, Y. Takahara, S. Asada, A. Shigenaga, A. Otaka, K. Kitagawa, T. Koide, A structure-activity relationship study elucidating the mechanism of sequence-specific collagen recognition by the chaperone HSP47, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 18, 2010, pp. 3767-3775
- ③ C. M. Yamazaki, Y. Kadoya, K. Hozumi, H. Okano-Kosugi, S. Asada, K. Kitagawa, M. Nomizu, T. Koide, A collagen-mimetic triple helical supramolecule that evokes integrin-dependent cell responses, *Biomaterials*, 査読有, 31, 2010, pp. 1925-1934
- ④ H. Okano-Kosugi, O. Matsushita, S. Asada, A. B. Herr, K. Kitagawa, T. Koide, Development of a high-throughput screening system for the compounds that inhibit collagen-protein interactions, *Anal. Biochem.*, 査読有, 394, 2009, pp. 125-131
- ⑤ C. M. Yamazaki, S. Asada, K. Kitagawa, T. Koide, Totally synthetic collagen-like gels by intermolecular folding of designed peptides, (Proceeding for 30th European Peptide Symposium), *Peptides 2008*, 査読無, 2009, pp. 458-459
- ⑥ S. T. L. Philominathan, T. Koide, K. Hamada, H. Yasui, S. Seifert, O. Matsushita, J. Sakon, Unidirectional binding of clostridial collagenase to triple helical substrates, *J. Biol. Chem.*, 査読有, 284, 2009, pp. 10868-10876
- ⑦ C. M. Yamazaki, S. Asada, K. Kitagawa, T. Koide, Artificial Collagen Gels via Self-assembly of De Novo Designed Peptides, *Biopolymers (Peptide Science)*, 査読有, 90, 2008, pp. 816-823

[学会発表] (計13件)

- ① 小出隆規、シスプラチン誘導体はコラーゲンの in vitro 線維化を阻害する、日本薬学会 第131年会、2011年3月31日、静岡
- ② Shunsuke Matsui, Surface-modifiable two-dimensional films containing the

- collagen-like triple-helical peptides, 5th International Peptide Symposium, 2010年12月7日, Kyoto
- ③ Atsushi Sekiya, Elucidation of sequence-specific collagen recognition mechanisms by anti-angiogenic factor; pigment epithelium-derived factor, 31' st European Peptide Symposium, 2010年9月7日, Copenhagen
  - ④ Takaki Koide, Collagen-like peptide supramolecules that regulate cell adhesion, 31' st European Peptide Symposium, 2010年9月8日, Copenhagen
  - ⑤ 関谷敦志、血管新生阻害活性を示す色素上皮由来因子 (PEDF) の配列特異的なコラーゲン認識機構解明、第42回日本結合組織学会学術大会・第57回マトリックス研究大会 合同学術集会、2010年8月20日、秋田
  - ⑥ 全田未悠、コラーゲンの線維化を阻害する低分子量化合物の探索、第42回日本結合組織学会学術大会・第57回マトリックス研究大会 合同学術集会、2010年8月19日、秋田
  - ⑦ 小出隆規、色素上皮由来因子 (PEDF) の配列特異的なコラーゲン認識とその意義、日本薬学会第130年会、2010年3月29日、岡山
  - ⑧ C. M. Yamazaki, Development of artificial collagen that controls receptor-specific cell adhesion, 第46回ペプチド討論会、2009年11月4日、北九州
  - ⑨ 関谷敦志、色素上皮由来因子 (PEDF) による特異的なコラーゲン認識、第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸
  - ⑩ H. Kosugi, A 384-plate screening of the compounds that inhibit collagen-protein interactions, 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009年6月6日、横須賀
  - ⑪ C. M. Yamazaki, Integrin-dependent cell adhesion to the peptide-based artificial collagen, 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2009年6月5日、横須賀
  - ⑫ C. M. Yamazaki, Totally synthetic collagen-like gels by intermolecular folding of designed peptides, 30th European Peptide Symposium, 2008年9月1~6日、Helsinki, Finland
  - ⑬ 小杉日登美、コラーゲン3重らせん上に存在するタンパク質結合配列の探索、第55回マトリックス研究会大会、2008年5

月30日、東京

[その他]

ホームページ

<http://www.chem.waseda.ac.jp/koide/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小出 隆規 (KOIDE TAKAKI)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号：70322253

### (2) 研究分担者

北川 幸己 (KITAGAWA KOUKI)  
新潟薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：60093853

浅田 真一 (ASADA SHINICHI)  
新潟薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：50424883