

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19750145
 研究課題名 (和文) ファージディスプレイ法で同定した医薬小分子の新規相互作用の検証
 研究課題名 (英文) Validation of protein-drug interactions identified by the phage display technology
 研究代表者
 高草木 洋一 (TAKAKUSAGI YOICHI)
 東京理科大学・理工学部・助教
 研究者番号： 60439916

研究成果の概要： 本研究では、ファージディスプレイ (PD) 法による予備試験において同定された医薬小分子の新規相互作用について検証し、それらの結合を確認した。1) 抗生物質ロキシシスロマイシン (RXM) と RXM のがん血管新生阻害作用の原因タンパク質の候補であるアンジオモチン (Amot)。2) 抗腫瘍活性物質カンプトテシン (CPT) の結合候補タンパク質であるヒトプロスタグランジン E2 受容体 (hEP1) およびスプライシングファクター hnRNP A3。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	150,000	1,950,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：受容体化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 医薬品開発研究の行き詰まり

医薬品の研究開発において、医薬小分子の結合することは重要である。しかし、ゲノムシーケンスの完了により遺伝子データベースの整備が進んだ一方、近年の創薬研究では、その基盤となる「優れた標的」および相互作用に関する情報が不足しており、真に新しいと評価される成果はほとんど得られていない。その最たる要因として以下のことが考えられる。

- ・従来のプロテオミクス的手法や機器分析法で同定可能な標的はほぼ出尽くし、頭打ち

となった。

- ・動的作用機構など、伝統的な手法では検出困難な標的や、考慮されていない作用機構様式が数多く存在する。

(2) ファージディスプレイ (PD) 法の特徴

PD 法は 1985 年に報告された相互作用検出法であり、ファージの生活環を利用してバイオパニングと呼ばれる選抜操作を繰り返し、目的の物質 (bait) に結合するペプチドおよびタンパク質 (ファージの外殻タンパク質に提示) をファージライブラリーの中から効率的に同定することが可能である。近年、我々のグループを含め、医薬小分子の標的的同定に PD 法を応用した研究が展開されてお

り、成功例がいくつか報告されている。本法は、従来より汎用されているプロテオミクス的手法とは異なり、以下のような利点を有する。

- ・タンパク質そのものを取り扱わず、同定された結合ペプチドの一次配列をベースとして、標的タンパク質を結合部位とともに特定可能。
- ・したがってタンパク質の性質や発現量に依存しない探索が可能。
- ・得られたファージを自由かつ迅速に増幅し、別の実験に供与可能。

(3) PD 法による標的特定研究の現在までの成果と傾向

PD 法の成功例から見いだされる医薬小分子の標的の傾向 (1~3) および相互作用様式の傾向 (4,5) を以下に記述した。伝統的な手法では特定困難もしくは不可能であったと考えられる項目を多く含む。

- ① プロテオミクスの戦略では同定困難な膜タンパク質や不安定なタンパク質、発現量の低いタンパク質
- ② X 線結晶構造解析や NMR 解析において構造が特定されない無秩序なループ (構造を持たない部位)
- ③ DNA や RNA などの核酸結合部位
- ④ タンパク質-タンパク質の表面相互作用を妨害する様式
- ⑤ ①-④ のような特徴を持つタンパク質および領域に結合し、タンパク質の構造変化をもたらす様式

これらの特徴はさらに次の 2 つに集約され、PD 法のみから獲得される特筆すべき標的情報と言える。

- ・取扱いが困難もしくは不可能であり、相互作用試験に供することがほぼ不可能なタンパク質群
- ・一定の構造を持たず、絶えず無秩序であったり、ダイナミックな構造変化を示す部位およびこれらの部位に医薬小分子が結合することでもたらされるタンパク質自体の構造変化

2. 研究の目的

本研究では、T7 PD 法により同定されたいくつかの優れた抗腫瘍活性物質 (すでに臨床適用されているという点で優れた化合物) の結合タンパク質候補群に関して、それぞれの相互作用を詳細に検証する。以下に記述する 2 種類の化合物に関し、T7 PD 法およびそれ

ぞれの生物活性情報に基づいて新規結合タンパク質候補の特定に成功している。いずれも PD 法以外の手法では同定困難なタンパク質である。

(1) ロキシスロマイシン (RXM) の血管新生阻害作用に關与する原因タンパク質

RXM は 14 員環マクロライド抗生物質であるが、1998 年に血管新生阻害作用を有することが報告されており、抗腫瘍薬としての応用性が示唆されていた。これまでの研究により以下の知見を得ている。

- ・RXM のビオチン化誘導体を合成して T7 PD 法を試み、アンジオモチン (Amot) と呼ばれる膜タンパク質を RXM 結合候補タンパク質として同定した。
- ・Amot はアンジオスタチン (プラスミノーゲンの部分断片であり、血管新生抑制作用を示すタンパク質) の結合タンパク質として 2001 年に酵母ツーハイブリッド法で同定されたが、RXM の推定結合部位は E458-T596 (疎水性で、高次構造を持たない) であり、アンジオスタチンと同一の領域であった。
- ・したがって、RXM は Amot の E458-T596 に結合し、アンジオスタチンと同様の機構により血管新生を阻害する可能性が考えられる。

(2) カンプトテシン (CPT) の抗腫瘍活性に關与するタンパク質群

CPT はトポイソメラーゼ I (top I) を分子標的とする細胞毒性物質であり、我が国においては 1994 年に類縁体であるイリノテカンの臨床使用が認められた。しかし、未知標的の存在を推測させるに足る多くの生物活性や副作用が報告されているため、これまで、T7 PD 法により結合タンパク質の同定を試みてきた。

- ・T7 PD 法において NSSQSARR (8 mer) および NSASRGGGQRGRGEH (15 mer) を CPT 結合ペプチドとして同定した。
- ・NSSQSARR は GPCR である hEP1 (human E prostanoid receptor) 受容体の細胞内第 3 ループ、U2AF35 タンパク質に類似性を示し、いずれも特定の構造を持たない無秩序なループ部分であった。
- ・バイオセンサー (SPR、QCM) による相互作用試験の結果、CPT は hEP1 細胞内第 3 ループと解離定数として 0.01 μM オーダーの強い相互作用を示すことを明らかにした。
- ・NSASRGGGQRGRGEH は、top I の CPT 結合部位および hnRNP A3 タンパク質に類似性を示した。

U2AF 35 や hnRNP A3 はいずれも RNA のスプライシング因子である。バイオセンサーによる相互作用試験を中心に、CPT とこれらの相互作用を検証することを当該期間の目標とする。

3. 研究の方法

(1) RXM と Amot (p80) の相互作用の検証

① Amot の発現、精製

ヒト胃がん由来の MCF-7 細胞株より抽出した total RNA をもちい、RT-PCR により Amot の H343-I675 に相当する cDNA を得た。この配列を大腸菌発現用ベクター pET 42a(+) のマルチクローニングサイトに挿入し、コンピテントセル (BL21 DE3 pLysS) を形質転換して H343-I675 を GST 融合タンパク質 (GST-Amot) として発現させた。さらにグルタチオンセファロースビーズをもちいたアフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーによって精製後、各種結合試験に供した。

② アガロースビーズプルダウン試験

RXM のビオチン化誘導体 (bio-RXM) と GST-Amot を混合し、4 °C で一晩反応後、アビジンアガロースビーズを加えて 1 時間攪拌し、ビオチン-アビジンを結合させた。その後 20400 g で遠心してビーズを沈殿させ、この沈殿を SDS サンプルバッファーと混合して 95 °C で 10 分間反応後、上清を SDS-PAGE にて展開した。展開後のゲルをウェスタンブロッティングに供し、GST-Amot のバンドを抗 GST 抗体で検出することにより、bio-RXM との結合を検出した。

③ 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法による相互作用試験

QCM 装置は、キューベットタイプの AffinixQ (イニシウム) を使用した。セラミック製センサーチップの金電極に GST-Amot を固定し、チップを本体にセットしてセンサーを安定後、緩衝液で満たされたキューベットに RXM を注入して Amot との相互作用をリアルタイムで追跡した。

(2) CPT と hEP1 細胞内第 3 ループ (hEP1-TCL) および hnRNP A3 の相互作用の検証

① Gαq タンパク質の発現、精製

hEP1 受容体を安定発現させ、そのシグナル伝達が機能していることが分かっている、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) から total RNA を抽出し、RT-PCR により Gαq の全長に相当する cDNA を取得した。この配列を大腸菌発現用ベクター pET

28a(+) のマルチクローニングサイトに挿入し、コンピテントセル (BL21 DE3 pLysS) を形質転換して Gαq を GST 融合タンパク質 (GST-Gαq) として発現させた。

② hnRNP A3 タンパク質の発現、精製

ヒト胃がん由来の MCF-7 細胞株より抽出した total RNA をもちい、RT-PCR により hnRNP A3 の全長に相当する cDNA を得た。この配列を大腸菌発現用ベクター pET 28a(+) のマルチクローニングサイトに挿入し、コンピテントセル (BL21 DE3 pLysS) を形質転換して Gαq を His tag 融合タンパク質 (His-Gαq) として発現させた。さらに Ni-NTA アガロースをもちいたアフィニティークロマトグラフィーによって精製後、結合試験に供した。

③ GST プルダウン試験

GST 融合タンパク質として発現させた hEP1-TCL (GST-hEP1-TCL) と His-Gαq を混合し、CPT の存在下および非存在下、4 °C で一晩反応させた。その後、グルタチオンセファロースビーズを加えて 1 時間攪拌し、複合体を形成させた。その後 20400 g で遠心してビーズを沈殿させ、この沈殿を SDS サンプルバッファーと混合して 95 °C で 10 分間反応後、上清を SDS-PAGE にて展開した。展開後のゲルをウェスタンブロッティングに供し、His-Gαq のバンドを抗 His 抗体で検出することにより、CPT が TCL と Gαq の相互作用に及ぼす影響を調べた。

④ hEP1 シグナル阻害試験

hEP1 受容体を安定発現させた CHO 細胞内に蛍光プローブ Fluo-4 をロードし、1 μM の PGE₂ の注入によって生じるカルシウムイオンの細胞内流入を、CPT の存在下および非存在下、プレートリーダー (Wallac 1420, PerkinElmer) で追跡した。

⑤ キイロショウジョウバエの RNP 遺伝子ノックアウトにおける CPT の感受性変化

キイロショウジョウバエの野生株および、hnRNP A3 のホモログである Hrb87F ノックアウト株を羽化させ、羽化後 72 時間以内の成虫 20 匹を管ビンに移した。24 時間後に成虫を除き、25 °C で 2 日間放置した後、残された卵に 250 μl の CPT 溶液 (4% エタノール、5% DMSO) を添加してさらに 25 °C で 15 日間放置した。15 日後の管ビン内の成虫数を計数することにより、CPT の及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) RXM と Amot の相互作用

T7 フェージディスプレイ法をもちいた RXM 結合タンパク質の予備スクリーニングの結果、RXM は Amot の BIG3 ドメイン (E458-T596) に結合することが示唆されていた。そこで、BIG3 ドメインを含む Amot の C 末端 (H343-I675) を GST-融合タンパク質として発現させ、RXM との結合を試験した。

アガロースビーズプルダウン試験による RXM と Amot の相互作用の結果を図 1 に示した。アビジンビーズに固定した bio-RXM の濃度に依存して GST-Amot のバンドが検出されたことから bio-RXM と GST-Amot が相互作用することが示唆された。

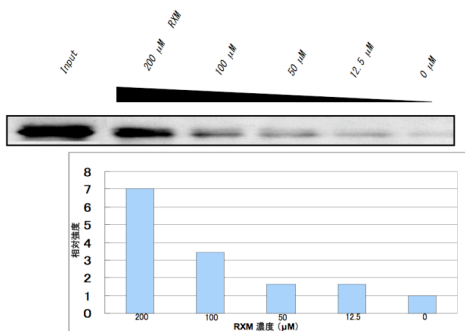


図 1 アガロースビーズプルダウン試験の結果

次に QCM 装置をもちいた相互作用試験を実施した。図 2 にセンサーグラムを示した。キュベット緩衝液へ RXM を注入することにより振動数の減少が見られたことから、金電極に固定した GST-Amot と RXM の結合が確認された。

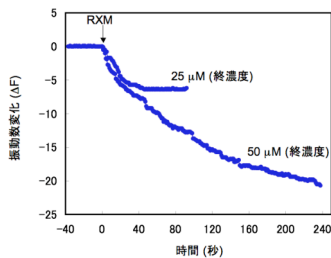


図 2 QCM センサーグラム

さらに、BIG3 ドメインにおける、RXM との結合に重要なアミノ酸残基を推測するため、QCM 装置およびランダムペプチド T7 フェージライブラリーをもちいて RXM 結合ペプチド群をスクリーニングし、同定した 18 種類のペプチドと BIG3 との類似性を RELIC/MATCH プログラム (<http://relic.bio.anl.gov/>) にて解析した。その結果、A507, P512, A545, V550, P564 が RXM との結合に重要であることが推測された (図 3)。

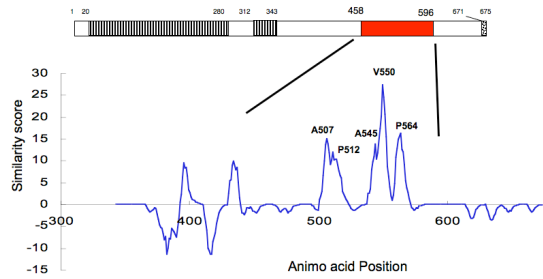


図 3 RXM 結合ペプチドと Amot の類似性プロット

RXM と Amot の相互作用は初めての知見である。実験結果を基に RXM との結合において重要なアミノ酸残基を調べている。

また、QCM 装置とランダムペプチド T7 フェージライブラリーをもちいたスクリーニング法は、医薬小分子の結合タンパク質の同定法として効果的であり、RELIC プログラムと組み合わせることで結合に重要なアミノ酸残基をピンポイントで推測可能とした。結合タンパク質の迅速かつ高性能なスクリーニング法としてその利用が期待される。

(2) CPT の hEP1-TCL への結合が及ぼす影響

T7 フェージディスプレイ法をもちいた CPT 結合タンパク質の予備スクリーニングの結果、CPT は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である hEP1 の細胞内第 3 ループ (TCL) に結合し、SPR 解析の結果、 K_D 値として $0.092 \mu\text{M}$ の強い親和性を示すことを明らかとした。この結合が TCL と $G\alpha_q$ の共役に及ぼす影響について調べた。

GST プルダウン試験の結果を図 4 に示した。GST-hEP1-TCL は、His- $G\alpha_q$ と結合することが確認された。これらの結合は $100 \mu\text{M}$ の CPT 存在下では完全に阻害された。したがって、CPT は hEP1 の TCL に結合し、 $G\alpha_q$ タンパク質との共役を阻害する脱共役剤としてはたらく可能性が示唆された。

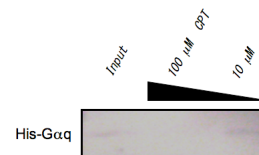


図 4 GST プルダウン試験の結果

次に、hEP1 受容体を安定発現させた CHO-K1 細胞をもちい、CPT が hEP1 シグナリングへ与える影響を蛍光プローブ Fluo-4 によりモニターした。

図 5 に結果を示した。 $1 \mu\text{M}$ の PGE_2 刺激によって引き起こされる Ca^{2+} イオンの細胞内流入は、 $10 \mu\text{M}$ の CPT 存在下で減少した。

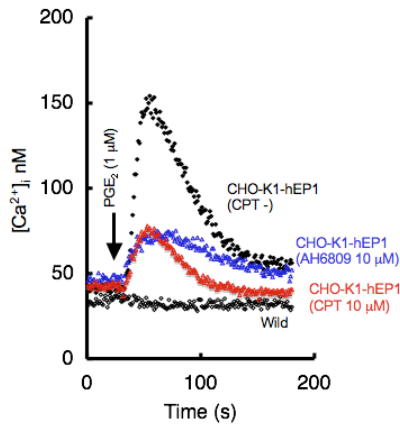


図 5 CPT の hEP1 シグナリングへの影響

以上の結果から、CPT は hEP1-TCL へ強く結合し、TCL と $G\alpha_q$ の共役を阻害することにより、セカンドメッセンジャーである Ca イオンの細胞内流入を減少させることが示唆された。CPT がプロスタグランジンカスケードへ作用することは以前の報告から示唆されていたが、本研究により CPT の直接の作用部位をはじめて明らかとした。

hEP1 シグナリングは、ある種の癌の悪性化に重要な役割を担っていることが報告されており、hEP1 ノックアウトマウスでは大腸におけるポリープ形成率の低下が報告されている。したがって本研究の結果より、CPT の抗腫瘍活性作用のメカニズムの説明として、hEP1 への作用がその一つであると推測される。このような膜タンパク質に対する医薬小分子の作用部位の特定は、従来のプロテオミクス的手法では検出困難と考えられ、PD 法によるアプローチでなければ達成されなかった、新規相互作用の同定例であると言える。今後、TCL を標的とした化合物の取得や設計など、癌治療薬の開発に向けた新たな知見としてその利用が期待される。

(3) CPT の hnRNP A3 への相互作用の検証と遺伝子ノックアウトによるキロシヨウジョウバエの感受性変化

T7 PD 法によるスクリーニングの結果、CPT の分子標的であるトポイソメラーゼ I の CPT 結合部位に類似する 15 mer のペプチド NSASRGGSQGRGEH を同定した。この部分配列は、スプライシングファクター hnRNP A3 と 100% 一致していたことから、CPT の結合タンパク質である可能性が示唆されたため、その相互作用を検証した。

図 6 に QCM 装置をもちいた相互作用試験の結果を示した。キュベット緩衝液へ CPT を注入することにより振動数の減少が見られたことから、金電極に固定した His-hnRNP A3 と CPT の結合が確認された。速度論解

析の結果、解離定数は $91.5 \mu\text{M}$ と評価された。

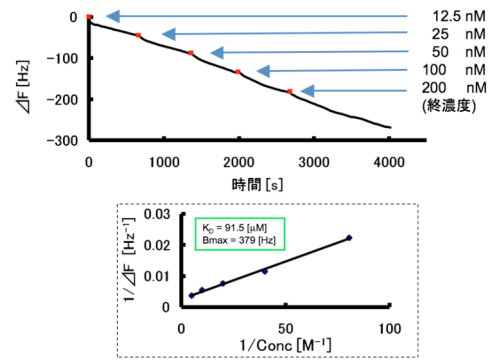


図 6 QCM センサーグラム (上) と両逆数プロット (下)

次に、キロシヨウジョウバエの RNP 遺伝子ノックアウトにおける CPT の感受性変化について調べた。図 7 および 図 8 に結果を示した。CPT は、野生株および U2AF35 のホモログである U2af38 の遺伝子ノックアウト株の成長に対しては影響を及ぼさなかったが、RNP のホモログである Hrb87F の遺伝子ノックアウト株では、50-100 μM の CPT の処理によりすべての幼虫が致死となった。

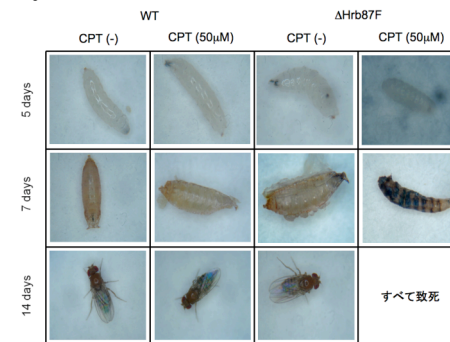


図 7 ショウジョウバエの生育に対する CPT の影響

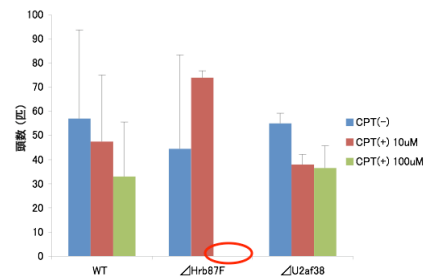


図 8 ショウジョウバエの生育に対する CPT の影響

以上の結果から、hnRNP A3 (Hrb87F) の遺伝子ノックアウトにより、CPT の感受性が上昇することが示唆された。現在、そのメカニズムの詳細について検討を進めている。

スプライシングファクター RNP を標的とした医薬小分子に関してはこれまでに報告

されておらず、CPT の抗腫瘍活性に関与する可能性が考えられる。RNP タンパク質は発現量が低く、安定性も低いことから従来のアプローチによる同定は困難と考えられ、PD 法を利用することによって同定された新規相互作用であると言える。

また、医薬小分子の *in vivo* における活性評価にキイロショウジョウバエが利用可能であることを示した。医薬小分子の活性を評価する際、*in vivo* における作用評価は必須であるが、哺乳動物をもちいた実験では多くの時間が費やされる。しかし、キイロショウジョウバエをもちいた実験は、比較的短時間でその活性を評価することが可能であり、実験自体も簡便である。また、ヒトとショウジョウバエの遺伝子相同性は 65-70% 程度と言われていることから、ヒトのモデルとしての利用能が充分あると考えられる。今後、本手法がさまざまな医薬小分子の活性評価へ利用されることが期待される。

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 6 件)

- ① Yoichi Takakusagi, Kaori Takakusagi, Kouji Kuramochi, Susumu Kobayashi, Fumio Sugawara, Kengo Sakaguchi “Identification of C10 biotinylated camptothecin (CPT-10-B) binding peptides using T7 phage display screen on a QCM device.” *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 7590-7598 (2007) 査読有
- ② Yoichi Takakusagi, Yuki Kuroiwa, Fumio Sugawara, Kengo Sakaguchi “Identification of a methotrexate-binding peptide from a T7 phage display screen using a QCM device.” *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 7410-7414 (2008) 査読有
- ③ Yoichi Takakusagi, Kouji Kuramochi, Manami Takagi, Tomoe Kusayanagi, Daisuke Manita *et al.* “Efficient one-cycle affinity selection of binding proteins or peptides specific for a small-molecule using a T7 phage display pool.” *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 9837-9846 (2008) 査読有
- ④ Yoichi Takakusagi, Aiko Suzuki, Fumio Sugawara, Kengo Sakaguchi “Self assembled monolayer (SAM) of small-molecule to efficiently select binding-peptide from phage library using a quartz-crystal microbalance (QCM) device.” *Proc. of ICCE-17* (2009) in press 査読有

他 2 件 (査読有)

[学会発表] (計 33 件)

- ① Fumio Sugawara, Kouji Kuramochi, Yoichi Takakusagi “Drug-Target Identifications: (1) Affinity Purification of Proteins by Specific Ligand Immobilized on Resins, (2) T7 Phage Display Cloning of Drug-targeting Molecules.” BIT's 5th Anniversary Congress of International Drug Discovery Science and Technology (IDDST) May 2007, Shanghai, China
- ② Fumio Sugawara, Yoichi Takakusagi, Kouji Kuramochi, “High-throughput and High-accuracy Drug-Target Identifications.” The 4th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaScience: On the Frontiers of Chemical Biology December 2007, Tokyo, Japan
- ③ 真仁田大輔、高草木洋一 他 「キイロショウジョウバエによる医薬標的分子の評価」 BMB2008 2008 年 12 月 神戸
- ④ 鈴木愛こ、高草木洋一 他 「T7 phage display 法を用いたロキシスロマイシン結合タンパク質の探索」 BMB2008 2008 年 12 月 神戸
- ⑤ 高草木洋一 他 「QCM-PD 法で同定した医薬小分子結合ペプチド群からの医薬小分子-標的タンパク質三次元結合様式の推測」 BMB2008 2008 年 12 月 神戸
- ⑥ Yoichi Takakusagi et al. “Camptothecins : Inhibition of the E-prostanoid receptor subtype 1 (EP1) signaling pathways and its' mechanistic aspects.” The 50th Anniversary Meeting of the American Society of Pharmacognosy June 2009, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑦ Yoichi Takakusagi et al. Self-assembled monolayer (SAM) of small-molecule to efficiently select binding-peptide from phage library using a quartz-crystal microbalance (QCM) device. ICCE-17 July 2009, Honolulu, Hawaii, USA

他 26 件

[図書] (計 1 件)

高草木洋一、高草木香織、菅原二三男、坂口謙吾 共立出版 蛋白質 核酸 酵素 7 月号 新実験講座 (2009) 7 ページ 査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

高草木 洋一 (TAKAKUSAGI YOICHI)
東京理科大学・理工学部・助教
研究者番号：60439916