

平成21年 5月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890196
 研究課題名（和文） MIF タンパク質をパイロットケースとした新規ペプチド阻害剤設計法の開発
 研究課題名（英文） A study on the development of a novel method for the design of peptide inhibitors using MIF protein as a pilot case
 研究代表者
 居 弥 口 大 介
 北海道医療大学・薬学部・助教
 研究者番号：00433425

研究成果の概要：本研究は、疾患に関連するターゲットタンパク質を阻害するペプチド剤の合理的かつ汎用性をもった設計法を構築するための基盤研究である。本研究では炎症性サイトカインである MIF タンパク質をパイロットケースとすることにより、ファージディスプレイ法、SPR 法、および X 線結晶構造解析法を組み合わせた新規のペプチド阻害剤設計法を確立するための基盤となる技術的情報を集積することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	1,120,000	0	1,120,000
2008年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,070,000	285,000	2,355,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：マクロファージ遊走阻止因子、MIF、ペプチド阻害剤、X線結晶構造解析、タンパク質結晶

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、さまざまな長さ、配列をもったペプチドを用いた治療薬が広く利用されつつある。ペプチド剤は、化学合成法を用いることにより多様な配列をルーチンで作製することができることが利点である。生体内での分解が速いことが欠点として挙げられるが、糖や PEG の付加、あるいは D 型アミノ酸の導入などにより分解時間の制御は可能である。本研究では、ペプチド阻害剤の合理的な設計法の構築を目的として、ファージディスプレイ法、X線結晶構造解析法、および SPR 法を

使用する。

(2) MIF は、マクロファージの遊走を阻害して局所に止めておく活性をもつリンホカインとして発見された。その後の研究により、免疫系組織のほか腎臓や肝臓、脳など多くの組織が MIF を産生することが報告され、各種炎症反応、免疫応答のほか、細胞の分化・増殖に関与するなど、多種多様な生理的役割を担っているタンパク質であることが明らかとなっている。MIF は生体内で各種重要な生理機能を担っているが、一方では、このタンパク質が過剰に発現することにより過度の

炎症反応を引き起こす。このため、MIF はリウマチ様関節炎や遅延型アレルギーなど、炎症を伴う諸疾患に関与することが明らかとなっている。このことから、MIF 活性を制御することが各種炎症疾患の症状の緩和につながるため、製薬業界においても非常に有用な創薬ターゲットとして注目されている。

2. 研究の目的

本研究課題は、マクロファージ遊走阻止因子 MIF をターゲットとしたペプチド阻害剤の設計を目指すものである。近年、各種タンパク質の阻害剤としてペプチド阻害剤が注目を集めているが、現在のところ合理的かつ系統的な開発手法は構築されていない。本研究は、ファージディスプレイ法、X 線結晶構造解析法、及び SPR 法を用いた新規のペプチド阻害剤開発法を構築するものであり、そのターゲットとして MIF タンパク質に着目する。

3. 研究の方法

(1) リードペプチドの探索

リードペプチド (MIF に結合能をもつペプチド) は、ファージディスプレイ法を用いて探索される。本研究では、この方法により 5 種類のペプチド配列が得られている。

(2) MIF タンパク質の調製

可溶性のヒト由来 MIF タンパク質の生産は、大腸菌による大量発現系を利用する。大量精製法の構築は、各種液体クロマトグラフィーを用いる。必要に応じて His タグを用いたアフィニティークロマトグラフィーもまた利用する。

(3) MIF-ペプチド複合体の結晶化

MIF-ペプチド複合体の結晶化は、複合体形成したサンプルを結晶化する方法 (共結晶化法)、あるいは MIF 単体の結晶にペプチドを浸透させる方法 (ソーキング法) の 2 種類の手法を用いる。結晶化条件については、これまでに知られている条件のほか、スクリーニングキットによる新規の条件検索もまた行う。

(4) 親和性の評価

表面プラズモン共鳴現象を利用した分子間相互作用評価法 (SPR 法、Biacore システム) により、各ペプチドの MIF に対する結合能を評価する。センサーチップは CM5 を使用し、アミンカップリング法により MIF タンパク質を固定化する。各ペプチド溶液を調製し、MIF が固定化されたチップに反応させることにより、MIF に対する解離定数を決定し、各ペプチドと MIF の親和性を評価する。

4. 研究成果

(1) MIF タンパク質の調製

ヒト由来の MIF 遺伝子を pET22b ベクターに挿入することにより発現ベクターを作製した。発現ベクターは、C 末端側に His タグを付加するベクターについてもまた作製した。大腸菌により大量発現された野生型 MIF タンパク質は、陽イオン交換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を用いることにより、高純度の MIF タンパク質溶液を得ることに成功した。また、MIF タンパク質が安定に存在することができるバッファー条件を決定し、約 17 mg/mL まで濃縮することに成功した。

(2) MIF-ペプチド複合体の結晶化

MIF-ペプチド複合体の結晶は、共結晶化法により得られた。MIF 三量体に対してモル比で 1 対 5 になるようにペプチドを混合した。結晶化条件はスクリーニングキットにより決定され、約 1 週間で X 線回折実験が可能なた大きさを有する良質な結晶が得られた (図 1)。

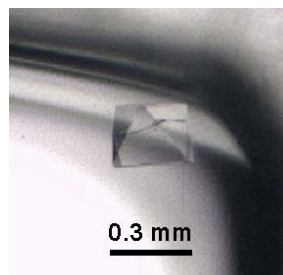


図 1 MIF-ペプチド複合体結晶

(3) 親和性の評価

アミンカップリング法により、MIF タンパク質の CM5 チップへの固定化に成功した (図 2)。

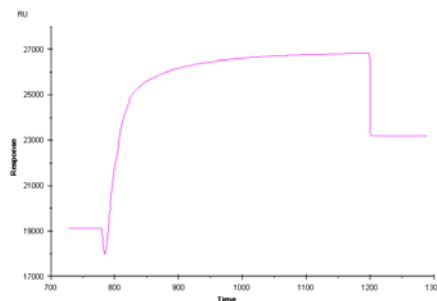


図 2 MIF タンパク質の固定化

5種類のペプチドのMIFに対する親和性をSPR法により評価した結果、これらのペプチドはMIFに対して非常に親和性が高いことが明らかとなった(図3、図4)。

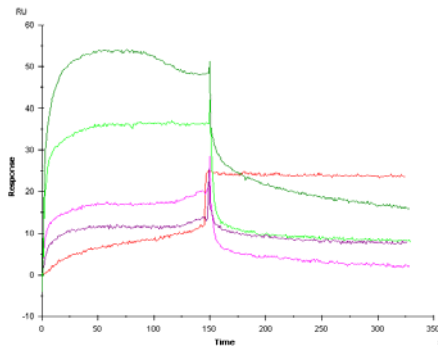


図3 5種類のペプチドのセンサーグラム

	$k_a (10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$k_d (10^{-7} \text{ s}^{-1})$	$K_D (10^{-10} \text{ M})$
A6	4.36	9.61	2.20
A11	2.12	1.65	0.78
A12	4.19	7.79	1.86
B3	4.60	4.36	1.64
G12	4.17	25.2	6.03

図4 5種類のペプチドの親和性の比較

また、これら5種類のうち最も親和性が高いペプチドとMIFの結晶が得られている。これらの実験結果から、ファージディスプレイ法により得られたペプチドがターゲットタンパク質に対して十分な結合親和性を有すること、およびペプチドの結合親和性評価法としてSPR法が効果的であることが明らかとなった。以上の結果から、ペプチド阻害剤の合理的設計法に必要なSPR法および結晶化法における技術的基盤情報が集積され、今後はX線回折データを収集して構造学的情報を得ることにより、ファージディスプレイ法、SPR法、およびX線結晶構造解析法を組み合わせたペプチド阻害剤設計法の基盤構築が可能となる。

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0件)

[学会発表] (計1件)

①発表者名：居弥口 大介

発表タイトル：MIF タンパク質をパイロットケースとした新規ペプチド阻害剤設計法の開発に向けた基盤研究

学会等名：日本薬学会第129年会

発表年月日：平成21年3月27日

発表場所：京都府京都市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

居弥口 大介

北海道医療大学・薬学部・助教

研究者番号：00433425

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者