

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06553

研究課題名(和文) 高機能ペプチドとAFM分子計測・操作による増殖因子受容体の活性化機構の解明と制御

研究課題名(英文) Mechanism and manipulation of growth factor receptors by bioactive peptides and AFM

研究代表者

酒井 克也 (Sakai, Katsuya)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：10523318

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)：増殖因子受容体活性化の構造基盤の解明と高度な受容体制御を達成するために、以下の研究を進めた。1) 生細胞膜上で短時間ごく微量に形成される増殖因子-受容体のnativeな活性複合体の構造を解析するために、native複合体を化学架橋によって固定し分離精製する系を確立し、AFM観察およびクライオ電子顕微鏡による高解像度の構造解析を進めている。2) 環状ペプチド固相化AFMプローブを使用して非標識受容体をリアルタイムかつ実空間で認識する方法を検証し開発した。3) 抗体Fcのループ構造に受容体結合環状ペプチドを提示することで、半減期が長い、血液脳関門を通過する増殖因子ミメティックの作成を可能にした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) 本研究で確立した手法はこれまで困難であった受容体活性化複合体の構造解析を可能にし、この構造情報は創薬などに役立つと考えられる。2) タンパク質結合環状ペプチドを固定したプローブを用いたHS-AFMによって非標識タンパク質をリアルタイムかつ実空間で認識する方法は、nativeな状態で分子認識を可能にし、広範な応用が考えられる。3) 受容体結合環状ペプチドを抗体Fc内に提示することによって血中半減期が短い、脳内に到達しないといた増殖因子の欠点を克服する増殖因子ミメティックの作成を可能にした。この成果は増殖因子の治療適応を拡大する技術基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the structural basis of growth factor receptor activation and to regulate receptor, the following studies have been conducted: 1) To analyze the structure of native active complexes of growth factor receptors that are formed on living cell membranes in very small amounts for a short time, a system to fix and purify the native complexes by chemical cross-linking was established. We are now analyzing its structure at high resolution by AFM observation and cryo-EM. 2) We have verified and developed a method to recognize unlabeled receptors in real time and in real space by using cyclic peptide coated AFM probes. 3) By presenting a receptor-binding cyclic peptide in the loop structures of the antibody Fc, we were able to create a growth factor mimetic that has a long half-life and crosses the blood-brain barrier.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：受容体 リガンド 環状ペプチド mRNA display タンパク質工学 HS-AFM HGF-MET

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

増殖因子/サイトカイン受容体は様々な細胞応答を制御する重要な受容体である。しかし、ほとんどの受容体において活性化の構造基盤は不明である。また、受容体機能を高度に制御することは、受容体やシグナル伝達の分子機構・生理機能の解明と治療に貢献するが、人為的制御技術は十分に達成されていない。

2. 研究の目的

本研究は、HGF-MET 受容体を標的分子例として、高速 AFM の 1 分子動態計測・操作と、高機能環状ペプチドを増殖因子-受容体研究に展開することで、従来の研究法、技術では困難であった受容体活性化の分子機構の解明と受容体の人為制御を達成する。これによって、様々な細胞膜受容体の分子機構・生理機能の理解と、受容体を標的とする治療学への応用に普遍的に貢献する技術基盤を検証・確立することを目的とする。

3. 研究の方法

1) MET 活性化の構造基盤解明とがん病態との関連

生細胞膜上で短時間ごく微量に形成される増殖因子 - 受容体の native な活性複合体の構造を解析するために以下の研究を行った。

- 生細胞膜上で形成された native 複合体を化学架橋によって固定し分離精製する系を確立
- native 複合体の高速原子間力顕微鏡観察
- 分割ルシフェラーゼ融合 MET タンパク質を用いた二量体化の生化学的検出・定量
- 複合体のクライオ電子顕微鏡による構造解析

2) 環状ペプチド固相化 AFM プロープによる受容体の空間力学制御

標的タンパク質に高親和性でかつ修飾許容度が高い環状ペプチドを固定化した AFM プロープによって標的受容体を特異的に認識し、集積や活性化を制御する技術を開発するために、以下の研究を行った。

- 環状ペプチド固定化 AFM プロープの作製。固定化法、固定化量とリンカーの最適化。
- 脂質二重膜上の MET タンパク質を再構築した系において、環状ペプチド固定化 AFM プロープを用いた標的タンパク質の検出および空間制御された集積の検証。

3) 分子ツールと治療を志向した環状ペプチド提示抗体による受容体制御

環状ペプチドと抗体を融合することで、両方の機能・特性を融合した革新的な分子ツール、創薬候補分子を創出するために、以下の研究を行った。

- ヒト IgG1 抗体の Fc 表面のループ 8 箇所 MET 受容体結合環状ペプチドの cDNA を組み込むことで、MET 受容体結合環状ペプチド提示抗体を作製。
- ペプチド提示抗体による MET 受容体活性化の *in vitro*, *in vivo* 検証
- ペプチド提示抗体による MET 受容体活性化の構造解析- ペプチド提示抗体の血中半減期
- 抗トランスフェリン受容体抗体 Fc 領域へのペプチド提示による血液-脳関門通過性 Met アゴニストの作成

4. 研究成果

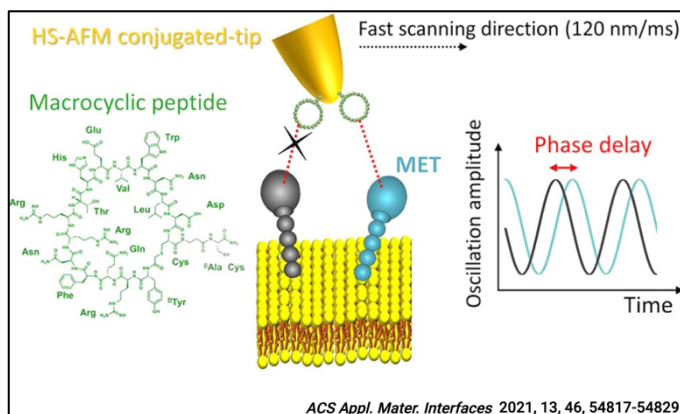
1) MET 活性化の構造基盤解明とがん病態との関連

生細胞膜上で形成された native 複合体を化学架橋によって固定し分離精製する系を確立した。この native 複合体の高速原子間力顕微鏡観察によって得られた構造的知見を生化学的検証で確認した。さらにクライオ電子顕微鏡による高解像度の構造解析を進めている。

2) 環状ペプチド固相化 AFM プロープによる受容体の空間力学制御 (文献 1)

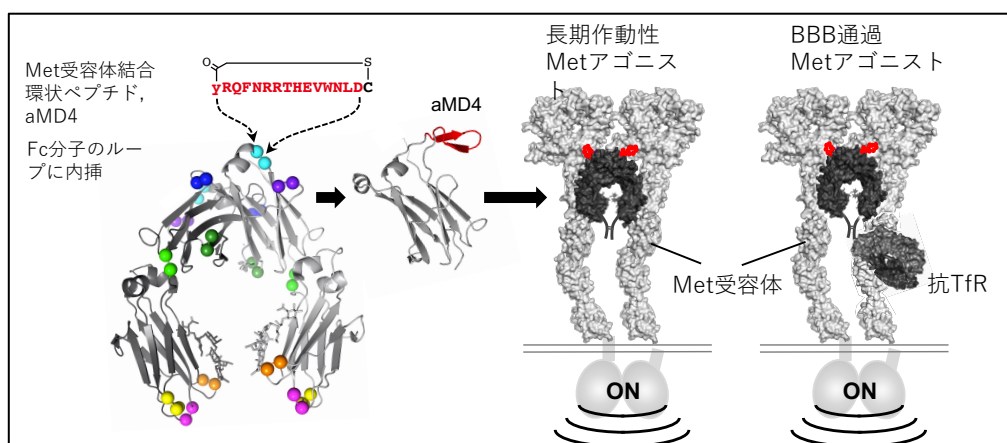
ナノメートルスケールの分子を標識なしで高速かつ選択的に認識する技術が望まれている。本研究では高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いて、小さな合成大環状ペプチドを結合させたチップを用いて、標識されていない膜受容体をリアルタイムかつ実空間で認識することを示した。本研究では、大環状ペプチド aMD4 に選択的に結合するヒト肝細胞増殖因子受容体 (hMET) を用いた実験により 1 分子認識法を検証した。長さや剛性の異なるリンカーで合成した aMD4 を比較検討することで、マイカ表面や支持脂質二重膜に添加した hMET と機能化チップの相互作用を最大

化した。HS-AFM による位相差イメージングにより、標識されていない hMET と aMD4 と結合しないマウス MET ホモログを識別することができた。さらに、小さなサイズのリガンドやリンカーを用いることで、同時トポグラフィイメージングにおける空間分解能の劣化を最小限に抑えることができた。膜受容体選択性大環状ペプチドを HS-AFM プローブに用いることで、高い選択性を持った高速イメージングによって、標識なしで分子認識する手法を確立した。



3) 分子ツールと治療を志向した環状ペプチド提示抗体による受容体制御 (文献2)

サイトカインや成長因子は、一般的に循環半減期が短く、血液-脳関門 (BBB) を通過しにくいいため、慢性疾患や脳疾患の治療においてその有用性が制限される。本研究は、大環状ペプチドファーマコフォアを免疫グロブリン Fc のオプションループに機能的に挿入することで、長い循環寿命と BBB 透過性を持つ Fc または抗体ベースの受容体アゴニストを生成することを立証した。本方法をラソグラフト (投げ縄移植) と呼ぶ。Met 受容体結合ペプチドを含む二価のラソグラフト Fc は Met を二量化し、天然のリガンドである肝細胞増殖因子 (HGF) に匹敵する生物学的応答を誘導する。重要なことに、ペプチドを Fc 内に挿入することによって Fc の長い半減期をもたらす新生児 Fc 受容体 (FcRn) に対する親和性や、Fc の高発現量は維持することが可能であった。さらに、抗トランスフェリン受容体抗体をラソグラフトすることで、全身投与後に脳実質に到達可能な Met アゴニストを作成することができた。このように、ラソグラフトは、物理化学的に安定で薬物動態を制御できるタンパク質治療薬の設計や、複数の機能を持つ抗体の迅速なエンジニアリングを可能にする。



[引用文献]

1. Puppulin L, Kanayama D, Terasaka, N, Sakai K, Kodera N, Umeda K, Sumino A, Marchesi A, Weilin W, Tanaka H, Fukuma T, Suga H, Matsumoto K, Shibata M. Macrocylic Peptide-Conjugated Tip for Fast and Selective Molecular Recognition Imaging by High-Speed Atomic Force Microscopy. *ACS Appl Mater Interfaces* 13, 54817-54829 (2021)
2. Sakai K, Sugano-Nakamura N, Mihara E, Rojas-Chaverra NM, Watanabe S, Sato H, Imamura R, Voon DCC, Sakai I, Yamasaki C, Tateno C, Shibata M, Suga H, Takagi J, Matsumoto K. Designing receptor agonists with enhanced pharmacokinetics by grafting macrocylic peptides into fragment crystallizable regions. *Nat Biomed Eng.* 7, 164-176 (2023)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sakai K, Sugano-Nakamura N, Mihara E, Rojas-Chaverra NM, Watanabe S, Sato H, Imamura R, Voon DCC, Sakai I, Yamasaki C, Tateno C, Shibata M, Suga H, Takagi J, Matsumoto K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Designing receptor agonists with enhanced pharmacokinetics by grafting macrocyclic peptides into fragment crystallizable regions.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 164-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41551-022-00955-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hino N, Matsuda K, Maryu G, Sakai K, Imamura R, Matsumoto K, Aoki K, Terai K, Hirashima T, Matsuda M.	4. 巻 57
2. 論文標題 A feedback loop between lamellipodial extension and HGF-ERK signaling specifies leader cells during collective cell migration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 2290-2304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2022.09.003	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 該当する
1. 著者名 Puppulin L, Kanayama D, Terasaka, N, Sakai K, Kodera N, Umeda K, Sumino A, Marchesi A, Weilin W, Tanaka Hideo, Fukuma T, Suga H, Matsumoto K, and Shibata, M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Macrocyclic Peptide-Conjugated Tip for Fast and Selective Molecular Recognition Imaging by High-Speed Atomic Force Microscopy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Appl. Mater. Interfaces	6. 最初と最後の頁 54817-54829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmi.1c17708	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 Komatsu, Y. Terasaka N, Sakai K, Mihara E, Wakabayashi R, Matsumoto K, Hilvert D, and Suga H.	4. 巻 24
2. 論文標題 De novo peptide grafting to a self-assembling nanocapsule yields a hepatocyte growth factor receptor agonist.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103302
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.103302	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 該当する

1. 著者名 Yumiko Tahira, Katsuya Sakai, Hiroki Sato, Ryu Imamura, and Kunio Matsumoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Dimer interface in natural variant NK1 is dispensable for HGF-dependent Met receptor activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22179240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Emiko Mihara, Satoshi Watanabe, Nasir K. Bashiruddin, Nozomi Nakamura, Kyoko matoba, Yumi Sano, Rumit Maini, Yizhen Yin, Katsuya Sakai, Takao Arimori, Kunio Matsumoto, Hiroaki Suga and Junichi Takagi.	4. 巻 12
2. 論文標題 Lasso-grafting of macrocyclic peptide pharmacophores yields multi-functional proteins.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21875-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Masataka Umitsu, Katsuya Sakai, Keiko Tamura-Kawakami, Kunio Matsumoto, Junichi Takagi	4. 巻 167
2. 論文標題 The constitutive high-affinity Met-binding site in the kringle domain is dispensable for the signalling activity of hepatocyte growth factor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of biochemistry	6. 最初と最後の頁 577-586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsuya Sakai, Takumi Nishiuchi, Shoichiro Tange, Yoshinori Suzuki, Seiji Yano, Minoru Terashima, Takeshi Suzuki, Kunio Matsumoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteasomal degradation of polycomb-group protein CBX6 confers MMP-2 expression essential for mesothelioma invasion.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 16678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72448-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroki Sato, Ryu Imamura, Hiroaki Suga, Kunio Matsumoto, Katsuya Sakai	4. 巻 21
2. 論文標題 Cyclic Peptide-Based Biologics Regulating HGF-MET.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217977	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 5件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 1. 酒井克也, Rojas-Chaverra NM, 揚山直英, 片貝祐子, 高木淳一, 菅裕明, 松本邦夫
2. 発表標題 ラソグラフトを用いた人工成長因子による治療可能性の拡大
3. 学会等名 霊長類医科学フォーラム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 酒井克也, 三原恵美子, 中村希, 渡邊咲耶子, 佐藤拓輝, 今村龍, 菅裕明, 高木淳一, 松本邦夫
2. 発表標題 環状ペプチドファルマコフォア内挿型の組換えアゴニストによる組織再生治療の試み
3. 学会等名 第94回生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井克也
2. 発表標題 Peptide-grafted Proteins and Nanometorology for Targeting and Understanding of Growth Factor Receptor
3. 学会等名 1st WPI NanoLSI-iCeMS Joint Symposium(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井克也, 高木淳一, 菅裕明, 柴田幹大, 松本邦夫
2. 発表標題 MET受容体の人為制御と構造基盤
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井克也
2. 発表標題 環状ペプチドとタンパク質エンジニアリングに基づく人工Met受容体アゴニスト
3. 学会等名 第15回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 人工タンパク質及び医薬組成物	発明者 佐古佑介, 平井秀 憲, 松本邦夫, 酒井 克也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許出願番号2022-137338	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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