

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：12612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05287

研究課題名(和文) T型/H型ペプチド構造を持つコバレントバインダーによる標的蛋白質の不可逆的阻害

研究課題名(英文) Irreversible inhibition of target proteins by peptidic covalent binders possessing T-/H-shape

研究代表者

瀧 真清 (Taki, Masumi)

電気通信大学・大学院情報理工学研究所・教授

研究者番号：70362952

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)：拡張T7ファージディスプレイ法の要領で、潜在性warheadにペプチドライブラリーを付与して多様化させた後、同ライブラリーを標的蛋白質(GST)に作用させることで、標的親和性と反応活性とを同時に有するペプチド型コバレントバインダーを迅速選択することに成功した。セクション過程において、GSTとwarhead修飾ペプチドとが適切な位置関係を持って並ぶことで、適切な反応場が構築された時のみ共有結合反応を引き起こし、わずか2ラウンドのバイオパニングにおいて、血清中の様々な蛋白質には共有結合せず、GSTに対してのみ特異的に共有結合しうる配列が濃縮された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体中分子を母骨格としたコバレントバインダーは、化学合成が容易であることに加えて、多点認識により標的蛋白質への高い特異性を持ち、少ない投与量で持続的な薬効を示し、副作用のリスクを大いに低減し得るものと考えており、今回これを進化工学的に取得する技術の確立を行った。ペプチドや核酸のような中分子は、分子量が3万に満たないことに由来する腎排泄および酵素分解による血中安定性の低さが問題となるが、標的蛋白質との共有結合形成によって分子量が増加することに加え、共有結合形成後に酵素分解から逃れて安定性が向上していることも今回確認しており、潜在的に生体内での使用に耐え得ることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We established a rapid selection methodology for finding a peptide-type covalent binder that possesses reaction specificity only to the target. After making a peptide library in which a latent SuFEx-type warhead was introduced, the library was mixed with a target protein (GST) via the extended T7-phage display methodology. In the selection process, a nucleophilic amino acid on GST and the warhead-modified appropriate peptide were aligned in an appropriate geometry, causing the covalent binding reaction only at the matchmaking microenvironment. After two rounds of biopanning, an amino-acid sequence that can conjugate specifically to GST, but not to various proteins in serum, was enriched.

研究分野：進化分子工学

キーワード：warhead SuFEx反応 コンビナトリアルスクリーニング 中分子型コバレントバインダー ファージディスプレイ コバレントドラッグ

1. 研究開始当初の背景：

標的蛋白質に対して特異的に共有結合を形成し半永久的に薬剤効果を発揮するコバレントバインダーの開発が近年脚光を浴びている。コバレントバインダーはその特性から薬剤投与量/頻度を減らす事ができ、患者のquality-of-lifeを向上する次世代の薬剤候補として注目されており、低分子創薬を中心とした分子設計および作用機序に関する研究が急増している (Baillie, *Angew. Chem.*, 13408 (2016) 他多数)。そのような中、我々は新たな分子形態として、潜在的に多点での分子認識能に優れた中分子型コバレントバインダーに着目し、その中でも特にペプチド型のものを自在にコンビナトリアル選択することを目指した萌芽的研究を2013年から行ってきた。コンビナトリアル選択を行うに際し、当初はペプチドライブラリーの構築中またはセレクション操作中の共有結合反応起点 (warhead) の反応性制御が困難であり、バイオロジクス間の非特異的な共有結合の形成を制御できなかった。そのため我々は、warheadを結合させたライブラリーから直接的にペプチド型コバレントバインダーを取得することからいったん離れ、間接的な手法を用いて同バインダーの取得を行った。具体的には、反応性を持たない幾つかの「おとり構造」をwarheadのかわりとして用い、それぞれの構造を含むペプチドライブラリーをT7 フェージ上に構築した。その後、モデル標的蛋白質であるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) に対して選択を行った後、共通して現れたペプチド配列中の「おとり構造」をwarheadに付け替えることで、コンビナトリアルライブラリーからコバレントバインダーを「間接的」に選択するための手法とした (*Bioconjugate Chem.*, 1866 (2018))。しかしながらコバレントバインダーのGSTへの結合には37°Cで一日を要し、結合率も約40%と低いため一般的手法と呼ぶには程遠い状態であった。

2. 研究の目的：

ペプチド型コバレントバインダーを創成する一般的手法を確立することを目的として、本研究を行った。具体的には、①共有結合反応起点 (warhead) の分子構造、②現行ライブラリーペプチドの分子形態および多様性、③warheadと標的蛋白質内の特定アミノ酸との位置関係の全てに課題があると考え、これらを基礎検討して最適化を行う。このことで、性能の良い中分子型コバレントバインダーを、「おとり構造」の付け替えなどを行うことなく「直接的」に選択する手法の確立を目指した。

3. 研究の方法：

① warheadの構造最適化：

複数のwarheadを作製し、反応性の比較検討を行った。具体的には、求核性を持つアミノ酸側鎖 (チロシンなど) と適切な速度で反応し、かつ加水分解などの副反応が最も起きない状態で共有結合を形成しうる新規warheadを決定した。

② バインダーの直接的スクリーニング法の確立：

上記にて決定したwarheadを、拡張T7フェージディスプレイ法の要領でライブラリーペプチド上の特定のシステインに修飾し、標的蛋白質 (GST) に対してバイオパニングを行い、GSTに共有結合するペプチドを濃縮した。

③ バインダーの結合親和性の向上：T型またはH型構造を持つペプチド型コバレントバインダーの取得：

上記にて探索した比較的弱いGST結合親和性を持つ直鎖ペプチドを1次fragmentと見なし、同fragmentを成長(growth)させリードへと展開する過程に相当するスクリーニングを試みた。具体的には、同直鎖ペプチドのN末端をブロモアセチル化することで反応基点を設け、本fragmentとファージ上ライブラリーペプチド内のSH基とを位置特異的に結合することで、T型またはH型構造の2次ライブラリー（多様性： 10^9 ）へと変換することを試みた（図1）。これを用いて拡張ファージディスプレイ法を行うことで、2次ライブラリーの中からGSTに対して特異的に素早く共有結合するものを探索することを意図した。

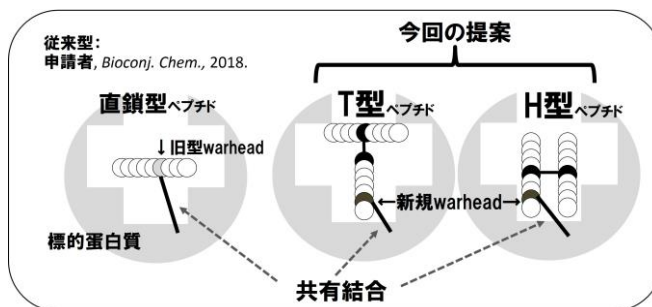


図1. T型またはH型構造を持つペプチド型コバレントバインダー：枝分かれ構造による幅広い作用面積での多点分子認識能を持ち、低濃度でも標的親和性が高く、素早く共有結合する分子を作製することを狙った。

4. 研究成果：

2021年度：

ライブラリー構築中およびセレクション操作中において、非特異的な共有結合を引き起こさないwarheadとして、硫黄-フッ素交換（SuFEx）反応型のものが最適であった。SuFEx型のは、周辺環境依存的な反応性を示すことが知られており（Sharpless, *PNAS*, 18808, 2019）、フッ化スルホニル基（ $R-SO_2F$ ）に対して標的蛋白質中のアミノ酸または水分子が複雑な水素結合等を形成することで初めて、その反応が活性化される。なかでも、アリーールフルオロ硫酸エステル基（ $Aryl-SO_2F$ ）は潜在性warheadとも呼ばれ、水中で一切の加水分解を受けないほど全くの不活性であるにもかかわらず、標的蛋白質の内側に形成される特異的な反応場に適切な配向で結合した場合にのみ反応活性となり、様々な求核性アミノ酸に対して共有結合することが知られている（Sharpless, *PNAS*, 2019）。本潜在性warheadにペプチドライブラリーを付与して多様化させた後、これをモデル標的蛋白質（glutathione-S-transferase; GST）に作用させることで、GSTに対する標的親和性と反応活性とを同時に有するペプチド型コバレントバインダーを迅速選択することに成功した。セレクション過程において、GSTとwarhead修飾ペプチドとが適切な位置関係を持って並ぶことで、適切な反応場が構築された時のみ共有結合反応を引き起こし、わずか2ラウンドのバイオパンニングにおいてGSTに対して特異的な配列が濃縮

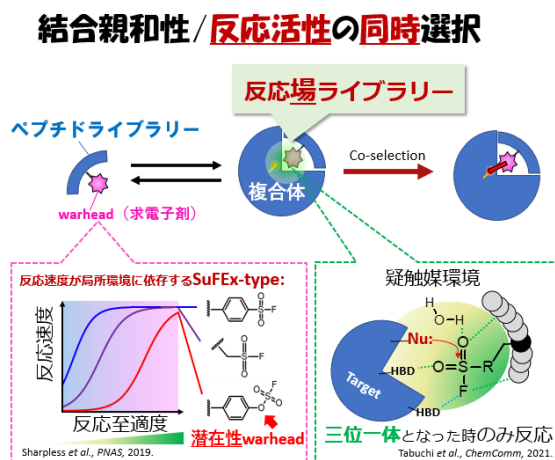


図2. ペプチド型コバレントバインダーの直接的スクリーニング手法の原理。

されることが分かった(図2)。次世代シーケンサーにより、最も濃縮されたペプチド配列 (LESCAWY) を同定し、これを化学合成してwarhead修飾を行うことでペプチド型コバレントバインダーとした。本バインダーは、GSTの酵素活性を時間・濃度依存的に完全に阻害し、300 μ Mという高濃度においても血清中の様々な蛋白質に対して非特異的に共有結合することなく、GSTだけに特異的に共有結合した。以上、目的としていた反応性を持つwarheadが合成でき、これを用いて直接的にペプチド型コバレントバインダーを取得しうるモデルセレクション系が確立できたため、速報誌に報告を行った (*Chem. Commun.*, 5378, 2021; hot and front cover article)。なお、中分子型コバレントバインダーのヒト血清中での加水分解耐性試験を行ったところ、当初の予想以上に共有結合形成に伴う安定性向上が見られ、37°Cで24時間インキュベートしても同ペプチド型コバレントバインダーは加水分解されないことを確認している。

2022年度：

次に、上記で確立したペプチド型コバレントバインダーの直接的な取得法を、本研究課題にて提案したTペプチド型コバレントバインダーの取得へと適用することで、コバレントバインダーのモダリティー拡張を行うことを試みた。具体的には、前年度に取得したGST結合性ペプチド型コバレントバインダー(直鎖状)を一次fragmentとみなし、fragment伸長法の概念で更に結合親和性の高いものを取得すべく、T7ファージ上に提示されているランダムペプチドライブラリーに共有結合させることでT型構造を持つ二次ライブラリーを作製することを行った。しかしながら、fragmentとランダムペプチドライブラリーを提示しているファージとを共有結合させた後の、分離精製を行う際に困難が生じ改善が見られなかったため、中分子コバレントバインダーの更なるモダリティー拡張としては、申請書にてバイパスプランとして述べているDNAアプタマー構造を使用することを優先して、研究を進めることとした。なお、本研究の派生研究として、従来型のfragment伸長法を用いて、性能のよい非共有結合型のペプチド型バインダーを簡易/迅速取得するための蛍光追跡技術を新たに開発したため、更なる原著論文として発表を行っている (*Anal. Bioanal. Chem.*, 4803, 2022)。

DNAアプタマー構造を持つコバレントバインダーが、適切なモダリティーかどうかを予備的に確かめるために、前年度に基礎検討を行ったSuFEx反応型warheadの一つをDNAアプタマーに導入 (*Chem. Commun.*, 2483, 2021; front cover article) したのち、前年度にペプチド構造で行った際と同様の手法で、標的結合に伴う加水分解耐性が向上していることを確認し、結果を原著論文として発表した (*Int. J. Mol. Sci.*, 7778, 2022)。なお、2023年度～現在においては、進化分子工学的手法にて、DNAアプタマー型コバレントバインダーの直接的な取得を行うべく、スクリーニング条件の最適化等を行っている。

2023年度：

前述のように、当初の予定として記載した二次ライブラリーの作製時に問題が生じたため(前年度)、発想を変えて、結合特異性が高い直鎖状ペプチド型コバレントバインダーを血中で安定に存在させる方法を模索した。ペプチド型に限らずコバレントバインダーの薬剤設計指針は、通常の可逆的な結合体のそれとは異なり、全ての標的が不可逆的に占有さ

れるまで平衡が移動しうるため、標的への結合親和性よりも血中の滞在時間が最重要である。そこで結合親和性は劣るものの、標的の多点認識が可能で高い特異性を持つ直鎖状ペプチド型コバレントバインダーに、レトロインバージョン (RI) 法を適用してプロテアーゼ耐性を付与できれば、十分に時間をかけて完全に標的だけを阻害しうると考えた。具体的には、前年度までに配列決定をしたGST結合性の一次fragment配列 (LESC*AWY; C*は潜在型warhead修飾システイン) を元に、二次ライブラリーを作るかわりにRI化してD体ペプチド (配列: ywac*sel) とした。本D体ペプチドが、元の一次fragmentでは見られない加水分解酵素耐性を獲得していること、およびGST内の特定のチロシン残基へ共有結合することをそれぞれ確認したため、今後も論文化に向けて引き続き検討を行う。なお、一次fragment (L体ペプチド) における潜在型warheadの共有結合反応速度(k_{inact})は、予期せずミリ秒オーダーまで向上しており興味深い。潜在型warheadが、標的蛋白質の内側に形成されうる特異的な反応場にどのような配向で結合し、どのように反応活性化されているかを基礎解析するために、L体ペプチドを共有結合させたGSTの結晶化条件を確立し、単結晶X線構造解析を行った。その結果、固い構造を有するGST蛋白質本体は1.8オングストロームの高解像度で明快に原子位置が定まったが、warheadおよびペプチド部分は予想以上の揺らぎがあることが分かった。

※謝辞：年末の極めてお忙しい中、申請書をピアレビューいただきました blinded reviewerの先生方、およびJSPSの関係する方々に心より感謝申し上げます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yang Jay, Tabuchi Yudai, Katsuki Riku, Taki Masumi	4. 巻 24
2. 論文標題 bioTCIs: Middle-to-Macro Biomolecular Targeted Covalent Inhibitors Possessing Both Semi-Permanent Drug Action and Stringent Target Specificity as Potential Antibody Replacements	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3525 ~ 3525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24043525	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 Katsuki Riku, Numayama Tsubasa, Tabuchi Yudai, Sharma Jaiyam, Satake Naohito, Sandhu Adarsh, Taki Masumi	4. 巻 414
2. 論文標題 Solvatochromic peptidic binder obtained via extended phage display acts as a fluororeporter for fragment-based drug discovery (FBDD)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical and Bioanalytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 4803 ~ 4807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00216-022-04128-x	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 Tabuchi Yudai, Yang Jay, Taki Masumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Relative Nuclease Resistance of a DNA Aptamer Covalently Conjugated to a Target Protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7778 ~ 7778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23147778	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 Tabuchi Yudai, Watanabe Takahito, Katsuki Riku, Ito Yuji, Taki Masumi	4. 巻 57
2. 論文標題 Direct screening of a target-specific covalent binder: stringent regulation of warhead reactivity in a matchmaking environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 5378 ~ 5381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1CC01773J	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 Tabuchi Yudai, Yang Jay, Taki Masumi	4. 巻 57
2. 論文標題 Inhibition of thrombin activity by a covalent-binding aptamer and reversal by the complementary strand antidote	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 2483 ~ 2486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CC08109D	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

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 瀧 真清
2. 発表標題 中分子共有結合薬剤(bioTCI):ペプチド型TCIの直接選択とアプタマーのTCI化
3. 学会等名 第17回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koki Matsuzuka, Riku Katsuki, Masumi Taki
2. 発表標題 Complementing stability and affinity of a linear peptidic binder by adapting retro-inverso to a peptidic covalent binder
3. 学会等名 第60回ペプチド討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 M. Taki
2. 発表標題 Design, Selection, and Engineering of Targeted Hybrid-Middle Molecules via 10BASEd-T / NEXT-A Reactions
3. 学会等名 PACIFICHEM2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 中和可能コバレントドラッグ	発明者 田淵 雄大、ヤン ジェイ、瀧 真清	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、7029760	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------