

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19054

研究課題名（和文）膜タンパク質のノックダウンを可能にする新しい創薬概念の提案

研究課題名（英文）Proposal of a New Drug Discovery Concept Enabling Membrane Protein Knockdown

研究代表者

森 健（Mori, Takeshi）

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：70335785

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、膜タンパク質のプロテインノックダウン技術の開発を目的とした。マイルストーンとして、適切な膜貫通部およびクラスリン認識部の開発がある。膜貫通部として酸性pH応答性ペプチドに注目した。既存のペプチド（pHLIP）はバクテリア由来であり、抗原性が危惧される。そこで、ヒト由来のプロテオームから探索した。pHLIPの特徴を列挙してこれらを必要条件として、全膜貫通タンパク質の膜貫通領域を候補として（10万種以上）探索したところ、20種類程度が条件を満たした。このうち4つペプチドについて評価し、そのうち1つがpHLIPと同等の細胞集積能を示した。今後、クラスリン認識部を開発して、技術の実現を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんをはじめとする様々な疾患の原因はタンパク質にあり、標的タンパク質を自在に破壊（ノックダウン）する技術の開発は、これら疾患の治療薬となるのみならず、それらのタンパク質の生物学的な機能を明らかにすることができる。これまで、細胞内のタンパク質に対するノックダウン技術が開発されてきたが、膜タンパク質に対する開発は遅れていた。本研究ではこれを目指し、最初のマイルストーンである膜貫通部のペプチドを見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to develop a protein knockdown technique for membrane proteins. Milestones include the development of appropriate transmembrane and clathrin recognition sites. We focused on acidic pH-responsive peptides as transmembrane parts. The existing peptide (pHLIP) is of bacterial origin, and its antigenicity is of concern. Therefore, we searched the human proteome for pHLIPs. pHLIPs were searched for the transmembrane region of all transmembrane proteins as candidates (more than 100,000 species) by listing the characteristics of pHLIPs and using these as necessary conditions, about 20 peptides satisfied the conditions. Of these, four peptides were evaluated, and one of them showed cell-accumulating ability equivalent to pHLIP. In the future, we aim to develop the clathrin recognition part and realize the technology.

研究分野：医用化学

キーワード：ケミカルノックダウン 膜タンパク質 エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

本研究は、これまでに例のない膜タンパク質のノックダウンを可能にする医薬を創成するものである。膜タンパク質はヒトプロテオームの27%を占め、シグナル伝達の開始などの重要な機能を有し、種々の疾患の発現に関与している。しかし、従来のユビキチンリガーゼ E3 とプロテアソームに依存する PKD 法は、膜タンパク質を標的にできておらず、本法によりこれを達成する意義はきわめて大きい。

ただし、従来の PKD 法でも、原理的には、膜タンパク質のユビキチン化と、それによるリソソーム移行が可能と考えられる。しかし、従来法は、膜タンパク質のノックダウンに適した E3 の選定および、E3 に対するリガンドの探索に大きな労力を要する。それに対して、本法は、膜タンパク質の種類によらず適用できる、という非常に大きな利点がある。

本法は、より大きく捉えると、『標的タンパク質を発現する細胞に対して細胞内シグナルを誘導する』ことである。これは、新しい創薬の概念であり、タンパク質のノックダウンに限らず、さまざまな展開が期待される。標的細胞のシグナル伝達を外部から任意に制御できる、「シグナル制御薬」とも呼ぶべき、新しい創薬の端緒になると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、これまで不可能であった膜タンパク質に対するプロテイン・ノックダウン (PKD) 技術を開発することを目的とする (図1)。膜タンパク質は、細胞内シグナル伝達の最上流に位置し、がんをはじめとする種々の疾患の治療標的である。したがって、膜タンパク質に対する PKD を開発できれば、これらの疾患に対する新しい医薬となるため、その意義は非常に大きい。一般に、膜タンパク質の分解は、その細胞内ドメインに存在するシグナルペプチドによって、エンドサイトーシスの後に、リサイクル経路ではなく、リソソーム経路に仕分けられることで起こる。本研究で開発する PKD 分子は、標的の膜タンパク質を細胞外で認識した後、細胞内に向けてリソソーム経路に移行するシグナルペプチドを提示する。これにより、標的タンパク質をエンドサイトーシスさせ、さらにリソソームへ送達・分解できると期待される。

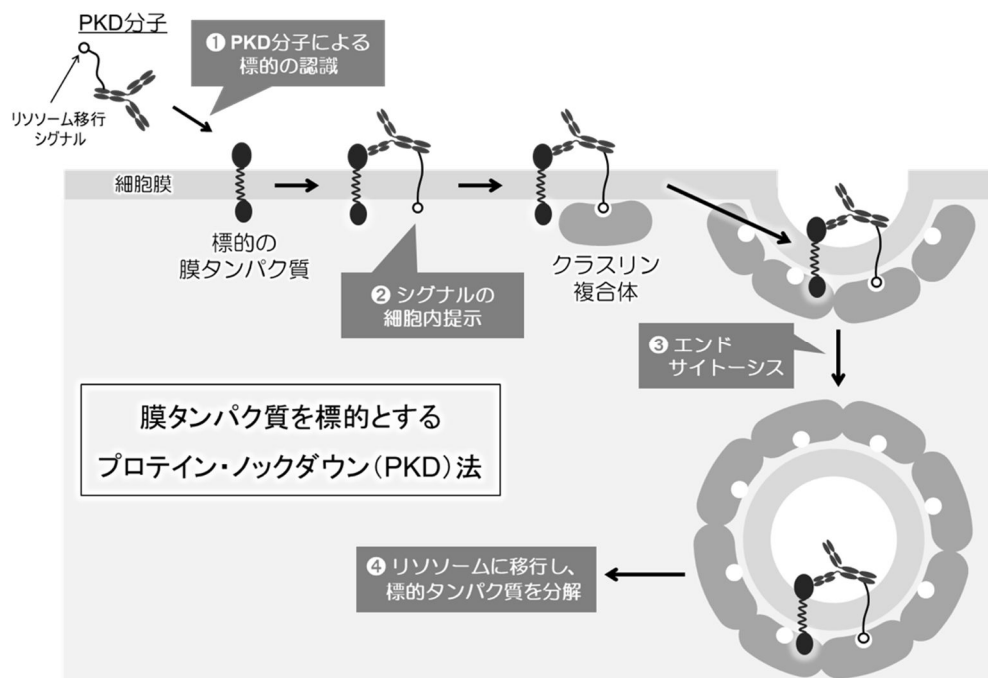


図1. 提案する膜タンパク質のケミカルノックダウン法

3. 研究の方法

分子設計：膜タンパク質の PKD を達成する分子は、図2の①～③の部分からなる。①標的タンパク質の細胞外ドメインを認識する部位としては、特に制約はなく、低分子化合物からタンパク質まで利用できる。本研究では、細胞外ドメインを認識する分子として多様なものが入手できる抗体を用いることにする。②膜貫通する膜タンパク質様の部位としては、これまで報告されたただ二つの膜貫通分子を候補とする。すなわち、申請者が開発した膜電位に依存して細胞膜を貫通する人工分子と、エール大学の Engelman により開発された細胞内外の pH 差に依存して膜貫通する pHILIP と呼ばれる 35 量体のペプチドを用いる。③細胞内ドメインとしては、エンド

サイトーシスとリソソーム移行を担うシグナルペプチドである二つのモチーフ、YXXΦ (Φ は疎水性アミノ酸) および [DE]XXX[LI] を候補とする。いずれのモチーフともに、膜貫通領域から 6 残基程度離れていれば、クラスリンに対するアダプタータンパク質である AP-2 のリガンドとして機能することができ、また比較的疎水性であるため、②の膜貫通部位とともに膜貫通できると考えられる。これらのシグナルペプチドは、実際に、pHLIP により細胞内に移行可能な分子の条件 (1 kDa 以下、logP > -2.8) を満足する。

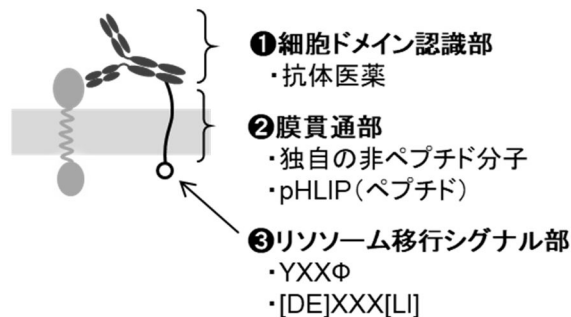
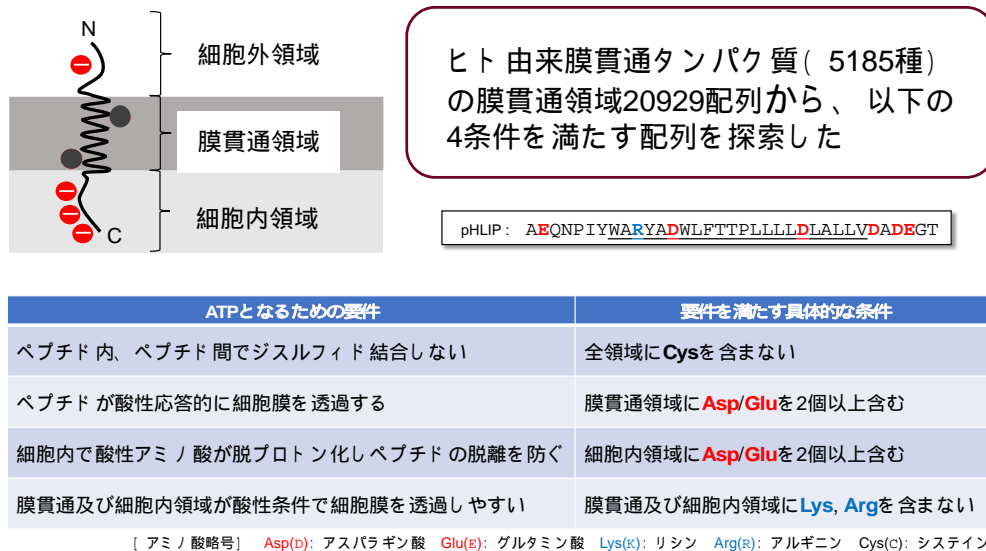


図 2 . PKD 分子の分子設計

4 . 研究成果

本研究は、これまで不可能であった膜タンパク質に対するプロテイン・ノックダウン (PKD) 技術を開発することを目的とする。目的を達成するまでのマイルストーンとして、適切な膜貫通部およびクラスリン認識部の開発がある。

膜貫通部の候補として、合成における拡張性の高さ、腫瘍に対する特異性の高さより、膜貫通ペプチドを用いることにした。実際に PKD 薬を薬として用いる場合、免疫原性の有無が問題となる。本研究で用いる予定であった腫瘍の酸性 pH に応答する pHLIP という既存のペプチドは、バクテリア由来であり、抗原性がある可能性がある。そこで、ヒト由来のプロテオームから、pHLIP と同様の性質を持つものを見出すこととした。pHLIP がユニークな性質を示すために有する分子としての特性を図 3 の通り列挙し、これを新規 pHLIP の必要条件として、データベースから、該当するペプチドを探索した。すべての膜貫通タンパク質の膜貫通領域を候補として (2 万種以上) 条件を満足するものを探索したところ、わずか 20 種類程度が条件を満たすことが分かった。pHLIP のようなペプチドはレアであることが分かった。



ATPとなるための要件	要件を満たす具体的な条件
ペプチド内、ペプチド間でジスルフィド結合しない	全領域にCysを含まない
ペプチドが酸性応答的に細胞膜を透過する	膜貫通領域にAsp/Gluを2個以上含む
細胞内で酸性アミノ酸が脱プロトン化しペプチドの脱離を防ぐ	細胞内領域にAsp/Gluを2個以上含む
膜貫通及び細胞内領域が酸性条件で細胞膜を透過しやすい	膜貫通及び細胞内領域にLys, Argを含まない

[アミノ酸略号] Asp(D): アスパラギン酸 Glu(E): グルタミン酸 Lys(K): リシン Arg(R): アルギニン Cys(C): システイン

図 3 . 酸性応答性膜貫通ペプチドの探索における要件

この 20 種は、進化的に近いペプチドが含まれていたため、なるべく特徴の異なる 4 つペプチドを選び、これを GFP との融合タンパク質として発現させた。in vitro において、酸性 pH に応答する膜結合能を評価したところ、そのうち 1 つの ATP4 が、pHLIP と同等の細胞集積能を持つものを示した (図 4)。諸条件の中で、もっとも重要なのは、電荷を持つアミノ酸の数が多いことであることを見出した。

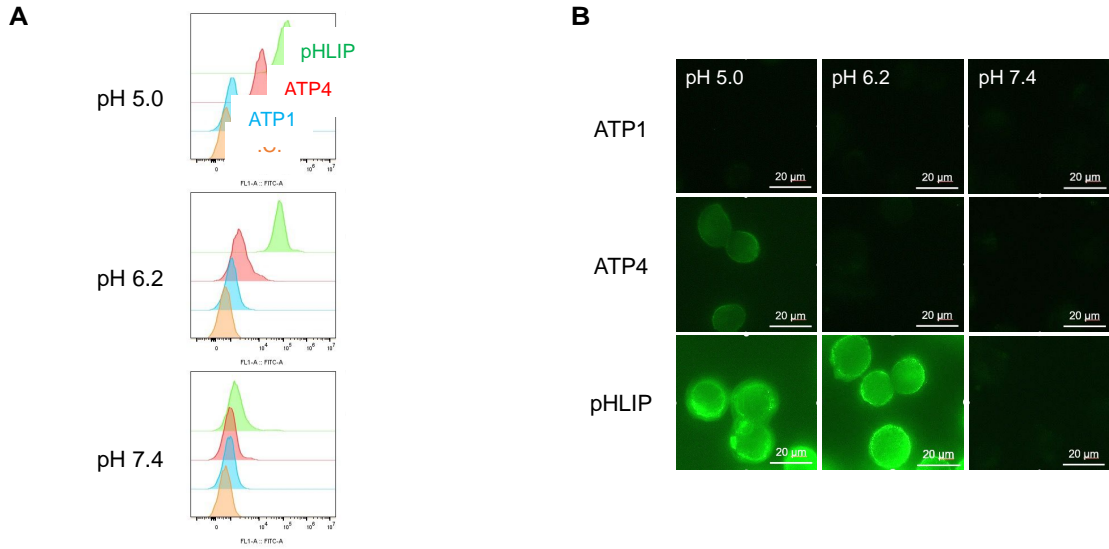


図5 . 探索したペプチドを GFP 融合体の細胞膜への結合

ATP4 について、Cy7 を標識して腫瘍への集積性を調べたと。pHLIP と同様に腫瘍への集積性が確認された (図 6)。

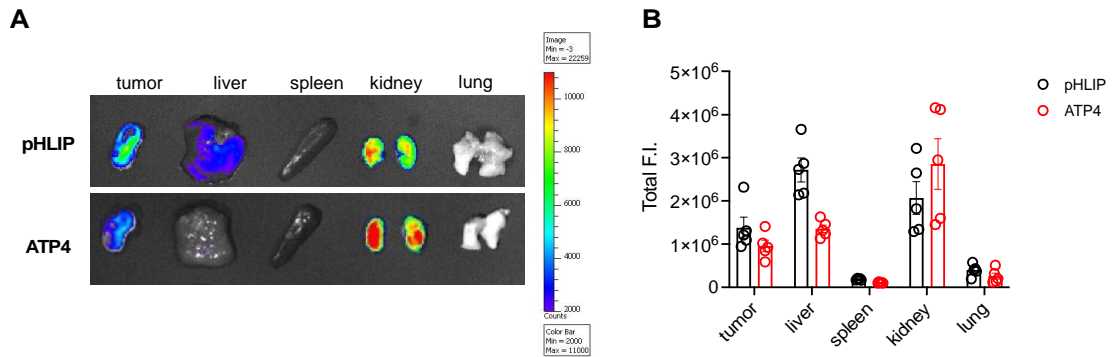


図6 . 蛍光標識ペプチドの組織分布

以上より、最初のマイルストーンである膜貫通部のペプチドを見出すことに成功した。今後は、クラスリン結合物と融合することにより、ノックダウンの証明を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷戸 謙太・田川寛・新居輝樹・岸村顕広・森健・片山佳樹
2. 発表標題 新規膜アンカーペプチド探索のための GFP-pHLIPの腫瘍標的化
3. 学会等名 バイオ高分子研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------