

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651260

研究課題名(和文)細胞外リガンド-受容体相互作用を標的とした新規PPI阻害薬スクリーニングシステム

研究課題名(英文)Development of a novel screening system for PPI-targeted drugs using cutinase fusion strategy

研究代表者

高木 淳一(Takagi, Junichi)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：90212000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、研究代表者が独自に開発した細胞外蛋白質リガンドの標識法(cutinase 融合法)を利用し、細胞挙動を指標するのではなく、受容体への結合を直接かつ簡便に測る方法を用いて、信頼度の高い結果を得る方法論を確立するものである。さまざまリガンドのN末端にcutinaseを融合した分泌融合蛋白質をデザインし、これらがpNPP-biotin, pNPP-AlexaFluoreなどで簡便に1段階標識できることを確認した。つぎに受容体を発現する細胞を樹立し、リガンドの結合を蛍光プレートリーダーで高速に評価する条件を確立した。このシステムを利用し、960化合物についてスクリーニングを実施した。

研究成果の概要(英文)：A wide variety of methods have been developed to detect, analyze, and quantify protein interactions, including SPR, ITC, co-precipitation, affinity chromatography, ultracentrifugation, NMR, mass spectrometry, and ELISAs in vitro. While these methods are widely used to identify protein function, they quickly reach their limits when it comes to addressing the intricate, dynamic mechanics of a biological pathway. In contrast, cell-based PPIs assays are appropriate for wider applications. However, these assays have different limitations such as the low-contrast imaging, using fixed-cells, high-cost and a lot of step experiments. In this study, we have established the PPI assay system which observes the site-specifically labeled target proteins with a binding partner under physiological context in live cells.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：化合物スクリーニング cutinase ケミカルバイオロジー セマフォリン プレキシシ

### 1. 研究開始当初の背景

個体や組織を使ったゲノミクスやプロテオミクス研究、および実験的手法による細胞のシグナル伝達機構研究の急速な進展によって、創薬のターゲットとなる疾患鍵分子、あるいは標的パスウェイが次々に同定されて来るにつれて、以前は酵素-基質相互作用が主体であった低分子化合物による制御ポイントが、受容体やアダプター分子のような非酵素蛋白質の蛋白質-蛋白質相互作用 (Protein-protein interface, PPI) にシフトしてきている (図1)。比較的平坦で広い面積をもつ PPI インターフェースは低分子化合物による阻害には向かないと信じられていたが、最近では footprint overlap や induced fit によってそれが克服可能であることが示され (Wells, Nature

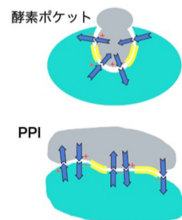


図 1

2009)、PPI をターゲットにした創薬の重要性が認識されつつある。特に、複雑な構造をもつ天然物リガンドは PPI 阻害剤としてのポテンシャルが高く、効率的な探索が急がれている。ところが PPI は文字通り「結合」で評価するしかないので、酵素を標的とした化合物探索に比べて大きな困難をとまう。なかでも蛋白質性の細胞外リガンドと細胞上の受容体の結合は、組み換え蛋白質調製の困難さから、直接これを評価するのではなく、シグナル下流の細胞応答 (例、 $[Ca^{2+}]_i$  変化など) によって間接的に調べるのが一般的だが、擬陽性の多さが大きな問題である。

応募者はこれまで一貫して「細胞外リガンドと受容体の相互作用の構造生物学的研究」に力を注いで来た。蛋白質性細胞外リガンドが細胞の運命と挙動を制御する例が次々と明らかになり、それらと受容体の相互作用が重要な創薬ターゲットとして認識されて行くにつれ、これを直接的に評価して化合物の探索やバリデーションに用いる一般的方法論が欠如していることを痛切に感じるようになった。そこで最近、我々のグループで得意とする動物細胞発現系を用いた高品質蛋白質生産とその結晶構造解析、そして構造に立脚した工学的改変のノウハウを結集し、酵素 cutinase を融合発現することによる細胞外リガンドの共有結合的標識技術確立した。Cutinase は高等生物にはホモログの存在しない細胞外エステラーゼであり、自殺型基質 p-nitrophenyl phosphonate (pNPP) 誘導体と 1 段階で反応して共有結合的標識が完了する (図 2)。活性を保ったまま精製することが困難な細胞外リガンドも、cutinase 融合により未精製のままで蛍光標識することが可能になり、受容体発現細胞との相互作用を、二次的試薬を使わないで可視化、定量できる。この方法はライブセルイメージングにも応用可能であり、PPI 阻害化合物のスクリー

ングだけでなく、天然物リガンドの代表的疾患鍵分子パスウェイにおける標的ポイントの同定や、その作用機序の解明にも有用である。

### 2. 研究の目的

本研究は、蛋白質リガンドと受容体の相互作用を直接かつ簡便に評価できる系の確立を通し、これまで困難であった PPI 阻害化合物の効率的な探索および作用メカニ

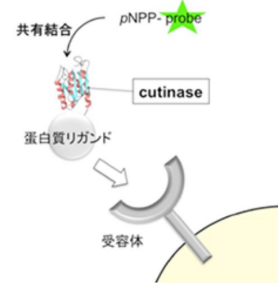


図 2. cutinase 融合標識の原理

ズムの同定、さらには論理的分子設計を可能にする立体構造情報取得の加速を図ることを目的とする。本研究では、cutinase 融合標識法を多くの細胞外リガンドに適用して PPI 阻害評価を行う系としての汎用性を確認すること、レセプター-リガンド系の例として様々な細胞移動を制御する重要なパスウェイであるセマフォリン (Sema)-プレキシン (plexin) 結合系を取り上げてこれを阻害する化合物を創製すること、を達成目標とし、さらに可能であれば領域内の研究者との共同により標識プローブの多様化および適用可能な PPI の拡張 (細胞内反応への対応) を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、酵素 cutinase 融合発現による細胞外リガンドの共有結合的標識技術を PPI 阻害物質の評価系として完成させ、その応用も図る。具体的な実験方法は以下の通り。

#### pNPP-probe の作製

チオール基を持つ pNPP-SH を合成し、このチオール基を利用して、マレイミド構造を持つ各種標識プローブと結合させ、HPLC により反応物の分画を行い、MS スペクトル解析により生成物を同定した。得られたプローブは DMSO に溶解し、10mM のストック溶液を作成した。

#### cutinase 融合リガンドの作成

細胞外リガンドとしては sema6A および sema3A を使い、両者の N 末端に cutinase の配列を融合した。作成したコンストラクトは HEK293T 細胞に一過性にトランスフェクションし、24 時間後の上清を使用した。標識には pNPP-probe を 100nM の濃度で培養上清に加え、37 °C で 15 分インキュベートすることにより行った。

#### 受容体発現細胞の作成

セマフォリン受容体である plexinA2、plexin B1、およびニューロピリン (Nrp)-1 は野生型全長タンパク質あるいは細胞内の C 末端に赤色蛍光タンパク質 DsRed を融合し、

HEK293T 細胞に一過性にトランスフェクションした。化合物スクリーニング用の細胞においては、PlexinA2ΔICD (細胞内の GAP ドメインを欠失した変異体) を安定発現する細胞を、Invitrogen 社の FlpInCHO システムを用いて作製した。

#### リガンド結合の可視化

受容体を一過性に発現する細胞にプローブ化したりガンドを含む培養上清を加え、1 時間後に除去し、PBS で一回洗浄した後にホルムアルデヒド固定を行った。細胞の観察は BioevoVZ-9000 顕微鏡 (キーエンス) を用いて行った。

#### 化合物スクリーニング

化合物は東京大学制御化合物ライブラリーから供与を受けた。まず 384-well plate に PlexinA2ΔICD 安定発現 CHO 細胞を播種した。翌日、細胞に濃縮した Sema6A 発現培養上清 + Alexa488-pNPP + 化合物混合液 (終濃度 100μM) を添加し、37°C で一時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を PBS で洗い、4% ホルムアルデヒドで室温下 15 分間静置し固定化を行った。固定液を除き、PBS で細胞を洗い、各ウェルの蛍光強度をボトムリーディングプレートリーダー (Infinite M200, Tecan 社) で計測した。

#### 4. 研究成果

生細胞上での細胞応答や分子間相互作用を解析するためには、標的分子を特異的に、かつ、簡便に標識する方法が必要である。現在、特定の分子を標識する方法として、GFP などの蛍光蛋白質を目的分子へ遺伝子導入する方法が主流となっているが、GFP は細胞内タンパク質のため、細胞外リガンドの蛍光標識には不向きであり、また蛍光プローブ化合物に比べて蛍光強度が低く、安定性に劣るなどの欠点がある。これにたいし、化学修飾によって長寿命の蛍光物質をコンジュゲートする方法もあるが、一般的なアミンカップリング法などのケミカルな反応では、遺伝子導入法とは異なり、分子を部位特異的に標識化することはできない。またこのような標識には精製タンパク質を用意する必要があり、発現精製の困難な創薬ターゲット蛋白質には適用できない。今回用いるのは GFP の代わりに cutinase という酵素を標的分子に融合する方法である。cutinase そのものが光るわけではなく、Cutinase と共有結合を形成する低分子化合物、p-nitrophenyl phosphonate (pNPP) 誘導体に、標識プローブを結合させ、この pNPP-probe により cutinase 融合分子を標識する方法である (図 2)。

Cutinase とは、枝枯病の病原真菌、Fusarium solani が産生する分子量 21 kDa の球状タンパク質で、活性中心ポケットに、セリンプロテアーゼ様の

Ser-His-Asp の catalytic triad を持つエステラーゼである。Cutinase の N 末端と C 末端は近接していることから、標的分子のドメイン間、さらには、ドメイン内ループに挿入することが可能であり、また、哺乳動物中に Cutinase 相同タンパク質が存在しないことから、細胞を用いた場合にバックグラウンドが低いという利点がある。まず pNPP-Alexa488 を作製した。pNPP-SH と Alexa488-マレイミドを 4 で一晩反応させ、反応液の HPLC 分画を行ったところ、反応液中に、Alexa488-マレイミドのみのピークは消失し、両者のピークではない溶出時間に、新たなピークが現れた。このピークの MS スペクトル解析を行ったところ、予測していた分子量と一致したことから、pNPP-Alexa488 であると同定した (図 3)。

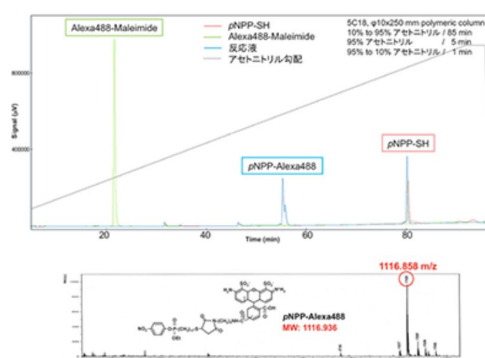


図 3 pNPP-probe (pNPP-Alexa488) の作製  
上段：逆相HPLCによる反応生成物の分析  
下段：質量分析による生成物 (retention time=55.62min) の同定

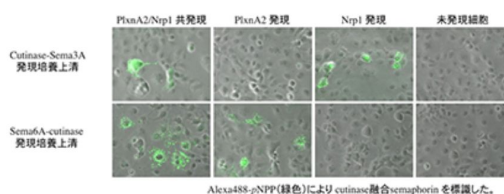


図4 cutinase融合セマフォリンリガンドの受容体への特異的結合。cutinase-Sema3A (上段) および cutinase-Sema6A (下段) をAlexa488-pNPP標識し、様々な受容体を一過性発現させた細胞と反応させた。Sema3AとSema6Aはそれぞれの高親和性受容体であるNrp-1とPlexinA2を発現した細胞のみに結合することがわかる。

次に、細胞培養上清中に分泌された Cutinase 融合リガンドに対して上記の標識プローブを反応させた結果、100nM の終濃度で加えた場合 37、15 分という条件で反応が完了した。これによって、細胞培養液中という夾雑物の極めて多い条件下で目的分子を一段階で標識できることがわかった。次にこの標識リガンド含有上清を受容体発現細胞に加えた結果、それぞれのリガンドに対応する受容体を発現する細胞のみに蛍光の集積がみられ、特異的な結合が検出可能であった (図 4)。

次に、リガンド結合の阻害をハイスループットでアッセイする系への応用を試みた。作成した PlexinA2 ICD 安定発現細胞は, sema6A の結合を検出可能なレベルにまで PlexinA2 ICD を高発現しており、また、スクリーニング操作の際に剥がれてしまわない細胞種である。この細胞を 384-well プレートに接着させた実験系の条件検討をおこない、cutinase 融合 Sema6A と生細胞上の PlexinA2 との結合を可視化できることを示した(図 5A)。化合物は多くの場合 DMSO に溶解しているので、スクリーニングの際に DMSO の影響がどのくらいあるかが重要である。右図のように、このシステムでは DMSO 濃度が 10% という非常に高い条件でもシグナルにさほど影響がないことがわかった(図 5B)。

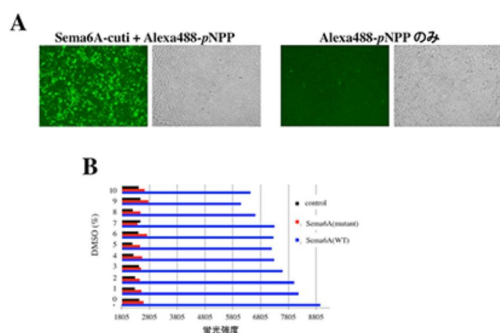


図5 384-well plate を用いたスクリーニング手法の確立。A、PlexinA2  $\Delta$  ICD 安定発現 CHO 細胞にcutinase-Sema6AとAlexa488標識 pNPPを加えることですべての細胞が蛍光を発することがわかる(左)。Alexa488プローブのみを加えたときには細胞は光らず(右)、シグナルがリガンド-受容体相互作用に特異的であることがわかる。B、野生型のSema6A(WT)のPlexinA2  $\Delta$  ICD 発現細胞への結合に対するDMSOの影響。プレキシン結合能を破壊した変異体のSema6A(mutant)ではリガンド無し(control)の時と同程度のシグナルであった。

つぎに、本法がスクリーニング系として用いることができるかどうかを、各種パラメータを算出することで評価した。アッセイデータの指標には以下の4つのパラメータが用いられる。

(1) CV 値 (変動係数、coefficient of variation)

$CV(\%) = \text{標準偏差}(SD) / \text{平均}(Av)$  で与えられ、どれ位ばらつきがあるのかの指標。CV 値 10%以内が求められる。

(2) S/B 比 (signal to background ratio)

$S/B = Av100\% / Av0\%$  で与えられ、反応前後におけるシグナル強度の比を表す。S/B 比 2 以上が求められる。

(3) S/N 比 (signal to noise ratio)

$S/N = (Av100\% - Av0\%) / SD0\%$  で与えられ、ベースのばらつきに対するシグナルの大きさの比を表す。

(4) Z' -factor

$Z' = 1 - (3 \times SD100\% + 3 \times SD0\%) / (Av100\% - Av0\%)$  で与えられ、データのばらつきやシグナル強度から計算されるアッセイ系の質の目安となる数字。アッセイ系の精度を表す最も重要な指標。Z' 値 0.5 以上あれば系として合格と見なされる。

今回のスクリーニングの CV (%) は 3.65~6.74 (平均 5.1%) であり、「10% 以内」の条件をクリアしていた。S/B (Signal to Background) 比は 2.31~2.69 (平均 2.5) であり、「2.0 以上」の条件をクリアしていた。Z' -factor は 0.54~0.73 (平均 0.63) であった。「0.5 以上」の条件をクリアしていた。以上の結果から、Cutinase 融合分子を用いた本アッセイ系は、値のバラツキが少なく、positive control : background 比が高い、スクリーニングを行う上で申し分のない精度であることがしめされた。

次に、確立した方法を用いて東大化合物ライブラリーから供与された 960 化合物についてスクリーニングを実施した。960 化合物は(株)ファルマデザインの古谷先生、安野先生によって約 20 万個の化合物群から選別していただいた。はじめに、PlexinA2 のポケットは Bcl-X のポケットと類似していることから、既知の Bcl 阻害化合物 (110 個) の類似化合物 3,666 個をピックアップした。また、Bcl 阻害物質は MDM に対する阻害活性もあるとの報告から、MDM 阻害化合物 (152 個) の類似化合物 1,117 個をピックアップした。さらに、その他の既知 PPI 阻害化合物 (3137 個) の類似化合物 11,254 個をピックアップした。これら約 16000 個の化合物を分子量 250~800 であること、水溶性予測値 1 mM 以上であること、忌避構造含有化合物を除去することなどの条件を経て、960 化合物にまで絞った。その結果、960 化合物のうち Sema6A/PlxnA2 相互作用を 100 $\mu$ M で 70% 以上阻害する化合物が 33 個得られ

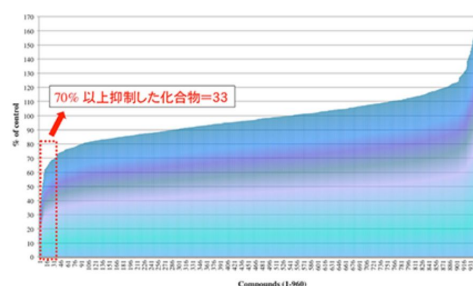


図6 東大制御ライブラリー化合物 (960 化合物) を用いたスクリーニング 100 $\mu$ M の化合物の存在下で得られた結合量を以下の式により算出し、その値を昇順に並び替えてプロットした。

$$\text{Bound}(\%) = 100 \frac{\text{Sample} - \text{Background}}{\text{Positive control} - \text{Background}}$$

た(図6)。その後、これら化合物について濃度依存性や特異性を検討したが、残念ながら 10 $\mu$ M 以下の濃度で再現性良く Sema6A/PlxnA2 相互作用を阻害し、かつ細胞毒性を持たない化合物は発見できなかった。

結論として、本研究では有望な化合物の同定には至らなかったが、cutinase 融合法によって、リガンドを精製することなく、極めて簡便に受容体を発現する細胞への結合を測定できること、そして適切な接着性細胞を用いることにより、リガンド-受容体相互作用を阻害する化合物のハイスループットスクリーニングを構築できることを明らかにした。

#### 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9件)

Fujii Y, Kaneko M, Neyazaki M, Nogi T, Kato Y, Takagi J; PA tag: a versatile protein tagging system using a super high affinity antibody against a dodecapeptide derived from human podoplanin, *Protein Expression and Purification*, 95, 240-247, 2014, 査読有 doi:10.1016/j.pep.2014.01.009.

Sangawa T, Tabata S, Suzuki K, Saheki Y, Tanaka K, Takagi J; A multi-purpose fusion tag derived from an unstructured and hyper-acidic region of the amyloid precursor protein, *Protein Science*, 22, 840-850, 2013, 査読有 doi:10.1002/pro.2254.

松永 幸子、高木 淳一、セマフォリン関連分子群の立体構造、*実験医学*, 31, 523-530, 2013, 査読無

Nojima S, Toyofuku T, Kamao H, Ishigami C, Kaneko J, Okuno T, Takamatsu H, Ito D, Kang S, Kimura T, Yoshida Y, Morimoto K, Maeda Y, Ogata A, Ikawa M, Morii E, Aozasa K, Takagi J, Takahashi M, Kumanogoh A; A point mutation in Semaphorin 4A associates with defective endosomal sorting and causes retinal degeneration, *Nature Communications*, 4, 1406, 2013, 査読有 doi:10.1038/ncomms2420.

Kato K, Nishimasu H, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O; Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Enpp1, *Acta Crystallographica Section F*, 68, 778-782, 2012, 査読有 doi:10.1107/S1744309112019306.

Tanaka H, Miyazaki N, Matoba K, Nogi T, Iwasaki K, Takagi J; Higher-order

architecture of cell adhesion mediated by polymorphic synaptic adhesion molecules neurexin and neuroligin, *Cell Reports*, 2, 101-110, 2012, 査読有 doi:10.1016/j.celrep.2012.06.009.

McKee K.K, Yang D.H, Patel R, Chen Z.L, Strickland S, Takagi J, Sekiguchi K, Yurchenco P.D; Schwann Cell Myelination Requires Integration of Laminin Activities, *Journal of Cell Science*, 125, 4609-4619, 2012, 査読有 doi:10.1242/jcs.107995.

Kato K, Nishimasu H, Okudaira S, Mihara E, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O; Crystal structure of Enpp1, an extracellular glycoprotein involved in bone mineralization and insulin signaling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 16876-16881, 2012, 査読有 doi:10.1073/pnas.1208017109.

北郷 悠、高木 淳一、LDL受容体ファミリーの構造と蛋白質間相互作用、*The Lipid*, 23, 56-62, 2012, 査読無

##### [学会発表](計13件)

高木 淳一、創薬ターゲットの高品質生産を可能にする技術革新、大阪大学未来戦略機構シンポジウム「アカデミア基盤研究から未来創薬へ」、2014年3月27日、東京学士会館(東京)

Takagi J, Boosting the protein production pipeline by the use of custom-made epitope tag system, IPR Seminar "Antibody Design, Modeling and Applications", 2014年1月15日、IPR, Osaka University(大阪)

Matsunaga Y, Revisiting the NRP1-Binding Determinant in the C-Terminal Region of SEMA3A, EMBO Workshop "Semaphorin function and mechanism of action", 2013年10月29日~31日、Abbaye des Vaux de Cernay (France)

高木 淳一、創薬関連分子の構造生物学の最前線、千里ライフサイエンスセミナー、2013年10月16日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)

松永 幸子、神経ガイダンス因子セマフォリン3AのC末端におけるニューロピリン受容体との結合モチーフの同定、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月14日、とりぎん文化会館(鳥取)

藤井 勇樹、PAタグを用いた新規ア

フィニティータグシステムの確立、第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月13日、とりぎん文化会館(鳥取)  
Takagi J, Multi-faceted approach to analyze structure and function of integrins, Gordon Research Conference (Fibronectin, Integrins, & Related molecules), 2013年2月14日, Ventura Beach Marriott(USA)  
Takagi J, Higher-order Architecture of Cell Adhesion Mediated by Polymorphic Synaptic Adhesion Molecules Neurexin and Neuroligin, 第35回分子生物学会大会、2012年12月13日、福岡国際会議場(福岡)  
高木 淳一、免疫学研究における構造生物学のインパクト、第41回日本免疫学会学術集会、2012年12月7日、神戸ポートアイランド(兵庫)  
高木 淳一、“構造神経科学のすすめ”-立体構造情報を使いこなすクールなニューロサイエンティストになろう-、第35回日本神経科学会大会、2012年9月21日、名古屋国際会議場(愛知)  
Takagi J, Correlation technology to fill the gap between X-ray crystallography and microscopic imaging, "International Integrin Signaling Meeting", 2012年9月16日, Universitätszentrum Obergurgl, Tirol (Austria)  
高木 淳一、蛋白質の立体構造から理解する細胞外シグナル授受のしくみ、第12回日本抗加齢医学会、2012年6月24日、パシフィコ横浜(神奈川)  
高木 淳一、PPI阻害物質探索のための protein-based screening、第12回日本蛋白質科学会年会、2012年6月22日、名古屋国際会議場(愛知)

〔図書〕(計1件)

高木 淳一、化学同人、動物細胞を用いる膜タンパク質生産、2013、103-110

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 淳一 (TAKAGI JYUNICHI)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号：90212000

(2) 研究分担者

なし