

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560401

研究課題名(和文)成人T細胞白血病関連タンパク質特異的認識ペプチドライブラリーの設計と選択

研究課題名(英文)Library design and selection for obtaining peptides that target HTLV-1 protein

研究代表者

二木 史朗 (FUTAKI, Shiroh)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：50199402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトT細胞白血病ウイルスI型(HTLV-1)由来の bZIP factor (HBZ) は転写因子Fosと類似の構造を持ち、cJunをはじめとするAP-1ファミリータンパク質と結合する。Fos-Junの相互作用抑制は細胞機能の不全につながるため、Fos-Junの相互作用を妨げることなく、HBZ-Junの相互作用を阻害できるJun類縁ペプチドが調製できれば、HBZの生理的意義や成人T細胞白血病(ATL)発症との関係の解明に役立つ。FosとHBZの配列は酷似しているため本研究では生物学的セレクション法の一つであるHitchhiker法を用いて目的のペプチドを選出した。

研究成果の概要(英文)：The genome of HTLV-1 encodes the basic leucine zipper protein, HTLV-1 bZIP factor (HBZ). HBZ has a domain containing a cFos-like leucine-zipper segment, which confers interaction of HBZ to cJun and related protein. Peptides that specifically block the interaction of HBZ with Jun related proteins could be powerful tools in order to elucidate the role of the interaction in the onset of ATL. By focusing on the a-g interaction, successful design and selection were accomplished to obtain a leucine-zipper segment that discriminates the appropriate partner over another that provides very similar patterns of electrostatic interactions. Employing the Hitchhiker Translocation in vivo selection system, we have succeeded in acquiring a mutated cJun-derived leucine-zipper segment that shows significantly higher affinity towards leucine-zipper of HBZ than that of cFos.

研究分野：生体機能化学

キーワード：成人T細胞白血病 ヒトT細胞白血病ウイルス HTLV-1 HBZ コイルドコイル Hitchhiker法

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) の感染によって引き起こされるウイルス性のがんである。ATL は極めて予後不良であり特異的な治療法開発が課題となっている。HTLV-I の感染後、約 60 年程度の長い潜伏期間を経て一部のキャリアは T リンパ球のがんである ATL を発症する。現在、日本には約 100 万人のキャリアが存在し年間約 800~1000 名が ATL を発症している。ATL は非常に予後不良な疾患であり、その発症機序の解明、治療法の確立が待ち望まれている。HTLV-I がコードする tax 遺伝子は、NF-κB、AP-1 活性化能、p53 の機能的抑制などの多彩な作用から、腫瘍化の原因遺伝子であると考えられ、研究が進んできた。しかし、実際の ATL 細胞の解析からは tax 遺伝子の発現が認められないことも多く、ATL の発がん機構は大きな謎として残されていた。連携研究者の松岡らは ATL 細胞のプロウイルスの解析から、3'側 LTR をプロモーターとして HTLV-I プロウイルスマイナス鎖にコードされる HTLV-I bZIP factor (HBZ) 遺伝子が ATL の発がんに重要であることを示すとともに、効果的に HBZ タンパク質の発現や細胞内の他のタンパク質との相互作用を特異的に抑制できれば、ATL 発症抑制の新たな糸口となり得ることを示している。

HBZ タンパク質は、activation domain (AD)、central domain (CD)、basic leucine-zipper domain (bZIP) の 3 つの領域からなっている。このうち bZIP 領域は、転写因子 Fos と類似のコイルドコイルドメインを持ち、cJun や JunB などの Jun ファミリータンパク質と相互作用し、ATL の発症にいたる可能性も示唆されている。また、Fos-Jun の相互作用抑制は細胞機能の不全につながる事が同時に示されている。従って Fos-Jun の相互作用を妨げることなく、HBZ-Jun の相互作用を阻害できる Jun 類縁ペプチドが調製できれば、HBZ タンパク質の細胞内機能を抑制可能である (図 1)。一方、Fos への結合性に比べて HBZ への結合性が有意に高いペプチドが必要である。Fos と HBZ の配列は非常に類似しており、直接的な設計は容易ではない (図 2)。

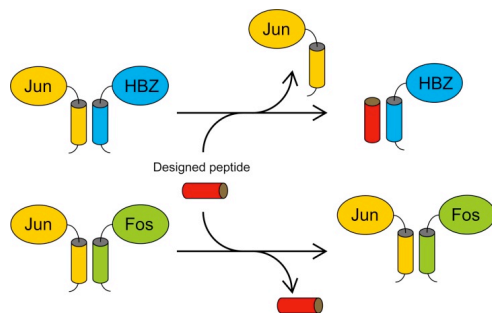


図 1. 本研究のゴール: Fos/Jun 相互作用を妨げることなく細胞内で HBZ と特異的に相互作用するペプチド (JWH) の創出

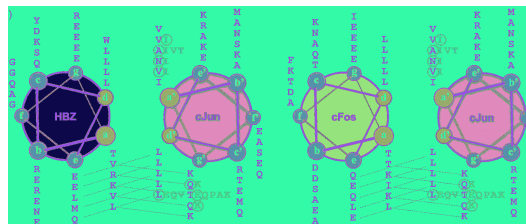


図 2. HBZ/cJun と cFos/cJun コイルドコイル認識の類似性 (赤で囲ったアミノ酸は変異型 cJun ライブラリー構築時に変異を導入したアミノ酸)

2. 研究の目的

そこで本研究では、HBZ タンパク質に特異的に結合するペプチドを cJun 配列の変異体ライブラリーの中からセクションすることにより、HBZ タンパク質の AP-1 タンパク質への結合を競合的に阻害することを通して ATL の発症抑制に与える効果の検討を行い、ATL 治療の糸口を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Jun 配列中の変異導入部位と変異アミノ酸に関して、構築可能なライブラリー数をもとに検討を加え、ライブラリーの設計・構築を行った。次いで、Hitchhiker セクションシステムを用いたセクションにより変異型 Jun ペプチド (JWH) を得た。(2) 円二色性スペクトル (CD) とカロリメトリーを用いて、JWH の HBZ に対しての結合様式や結合定数を求め、Fos、Jun との相互作用と比較検討した。得られた HBZ への結合性が Fos に比べて有意に高いことを確認するとともに、(3) AP-1 サイトを用いたレポーターアッセイ等により、細胞内で JWH が HBZ の活性を抑制することを確認した。

4. 研究成果

1) Hitchhiker 法による JWH ペプチドのスクリーニング

正しく折りたたまれたタンパク質のみを菌外に排出するバクテリアの twin-arginine translocation (TAT) 経路を利用し、HBZ ペプチドと β-ラクタマーゼの融合タンパク質を

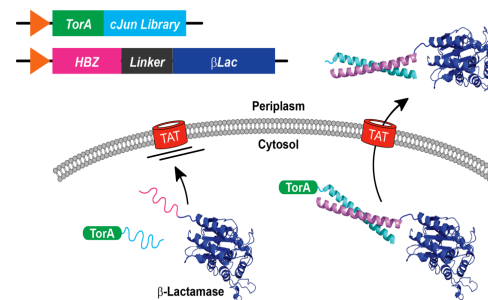


図 3. Hitchhiker 法による in vitro セクション

発現した細胞に、排出シグナルペプチド TorA と cJun ペプチドのライブラリーを共発現させた。cJun ペプチドライブラリー構築に関しては、図 2 に示すように、変異導入を相互認識に重要と考えられる位置に、相互作用が増強されると期待されるアミノ酸が主に提示されるような設計を行った。HBZ と cJun ペプチドが相互作用すれば β -ラクタマーゼが排出されるため、アンピシリン含有培地で生育可能である (図 3)。このようにして選出されたペプチドとして JWH が得られた (図 4 a)。

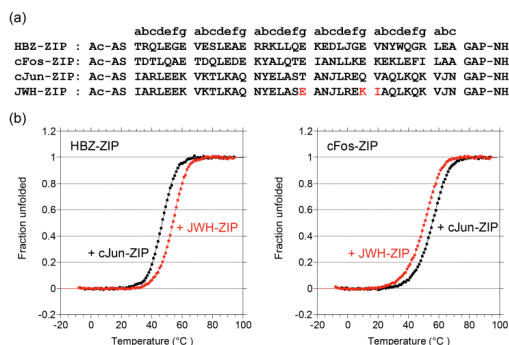


図 4. 得られた JWH ペプチドの配列 (a) とヘテロ二量体の熱安定性 (b)

2) JWH ペプチドの HBZ ペプチドへの優先的結合

CD スペクトルにおける 222 nm のモル楕円率 ($[\theta]_{222}$) をヘリックス含量の指標とし、HBZ/JWH、HBZ/cJun、cFos/JWH、cFos/cJun の融解温度 (T_m) の測定により、これらのヘテロ二量体の親和性に関して検討した (図 4 b)。また、等温滴定熱量測定 (ITC) によって、これらの解離定数 (K_d) を求めた。その結果、HBZ は cJun と比べ JWH に対して高い親和性を有し、cFos は JWH と比べ cJun に高い親和性を示すことがわかった (表 1)。

表 1. ヘテロ二量体の T_m と K_d 値

peptide 1	peptide 2	T_m (°C) ^a	K_d (mM) ^b
HBZ-ZIP	JWH-ZIP	54	0.31
	cJun-ZIP	47	2.12
cFos-ZIP	JWH-ZIP	51	0.83
	cJun-ZIP	56	0.29

^aCD により決定; ^bITC により決定

3) 細胞内における JWH の HBZ 認識

免疫沈降実験のために、インフルエンザヘマグルチニンペプチド (HA) タグを付加した JWH と cMyc タグを付加した HBZ を調製した。これらのタンパク質をコードするプラスミドを HeLa 細胞と一緒にトランスフェクシ

ョンしたところ、細胞内でのこれらのタンパク質の共局在が見られた (図 5)。

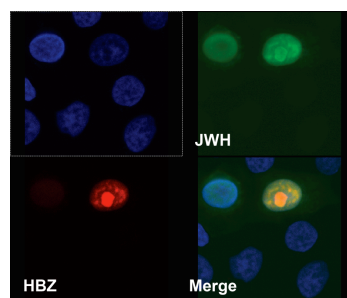


図 5. HA-JWH (赤) と Myc-HBZ (緑) の共局在

さらに、HA タグを付加した cJun と Myc-HBZ タンパク質を HeLa 細胞で共発現させ、抗 Myc 抗体を用いて HBZ と結合するタンパク質を沈殿させた。その結果、HA-cJun に対応するバンドがウエスタンブロットにより認められ、細胞内で HBZ は cJun と結合していることが示唆された (図 6 a)。一方、HA-cJun と HA-JWH を cMyc-HBZ とともに発現させた細胞では、HA-JWH のバンドのみが認められた。この結果は、細胞内で、JWH は cJun に比べ優先的に HBZ と相互作用することを通して、HBZ と cFos の相互作用を阻害することを示唆する。さらに、Jurkat 細胞における AP1-ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、HBZ による AP1 経路の阻害は JWH により回復できることが示された (図 6 b)。これらにより所望の活性を有するペプチド JWH が得られたことが示された。JWH を用いた HBZ タンパク質の細胞内の他のタンパク質との相互作用の解析等に関しては、現在検討中である。

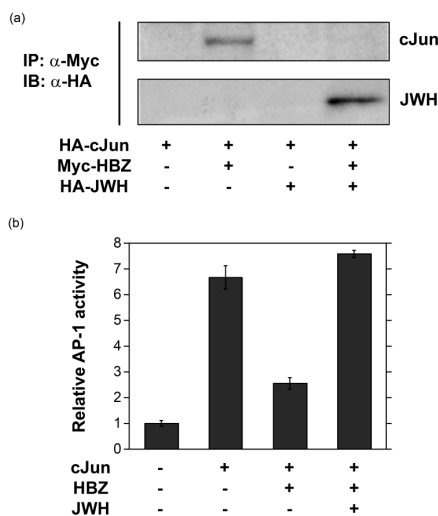


図 6. 細胞内での JWH による HBZ/cFos 相互作用阻害: (a) 免疫沈降; (b) AP-1 レポーターアッセイ

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 1 件)

Yusuke Azuma, Tim Kükenshöner, Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Miki Imanishi, Gen Tanaka, Ikuhiko Nakase, Takahiro Maruno, Yuji Kobayashi, Katja M. Arndt, Masao Matsuoka, Shiroh Futaki, Controlling Leucine-zipper Partner Recognition in Cells through Modifications of *a-g* Interactions, *Chem. Commun.*, 50 (48), 6364-6367 (2014)

[学会発表] (計 3 件)

日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会
大阪 (2014 年 6 月 13 日)
コイルドコイル *a-g* 相互作用に着目した
HTLV-1 bZIP factor (HBZ) 結合ペプチドの創出
二木史朗、東佑翼、Tim Kükenshöner、
Guangyong Ma、安永純一郎、今西未来、
丸野孝浩、小林祐次、Katja M. Arndt、松岡雅雄

The 4th International Conference on MEXT
Project of Integrated Research on Chemical
Synthesis & ICOMC 2014 Pre-symposium in
Kyoto “Synthetic Approaches to New Chemical
Functions”

Kyoto (2014 年 7 月 10 日)
Development of HTLV-1 bZIP Factor (HBZ)
Binding Peptide through Modifications of
Coiled-coil *a-g* Interactions
Shiroh Futaki, Yusuke Azuma, Tim Kükenshöner,
Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Miki
Imanishi, Takahiro Maruno, Yuji Kobayashi,
Katja M. Arndt, Masao Matsuoka

日本薬学会第 135 年会 (神戸) シンポジウム
「タンパク質の会合・凝集：計測、メカニズ
ムから制御まで」

神戸 (2015 年 3 月 26 日)
ペプチド相互認識を用いた膜タンパク質の
会合制御
二木史朗 (招待講演)

[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]

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二木 史朗 (FUTAKI, Shiroh)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：50199402

(2) 連携研究者

松岡 雅雄 (MATSUOKA, Masao)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：10244138