

称号及び氏名 博士(理学) 三原 皓典

学位授与の日付 2022 年 3 月 31 日

論文名 プロテインキナーゼ指向性ファージ表層提示ペプチドライブラリーの
構築と阻害ペプチドの創出

論文審査委員	主査	藤井 郁雄
	副査	円谷 健
	副査	木下 誉富

プロテインキナーゼ指向性ファージ表面提示ペプチドライブラリーの構築と 阻害ペプチドの創出

大阪府立大学大学院理学系研究科・生物科学専攻
生命化学研究室 三原 皓典

序論

近年、ケミカルバイオロジー研究分野を中心に、低分子と高分子の中間の分子サイズを有し、それぞれが示す特性を併せ持つ中分子化合物が注目を集めており、とりわけ、ペプチド性中分子はディスプレイスクリーニングに代表される進化分子工学手法によるリガンド探索が可能なることから中分子モダリティの主翼を担っている。機能分子としてのペプチドについては古くから研究されてきたものの、標的結合時の高エントロピーコストに伴う低い結合活性やプロテアーゼ等代謝酵素による分解を主因とする生体内での低安定性が大きな課題として存在していた。これらはいずれもペプチドの構造的柔軟性に起因するため、三次元的なコンフォメーションを規制し固定化することが課題克服のために必要と考えられている。これに対し、堅固な立体構造を有する Helix-Loop-Helix (HLH) scaffold が *de novo* デザインされ、種々の標的に対する高い結合活性および生物学的安定性を発揮可能であることが実証されている (Fig. 1).

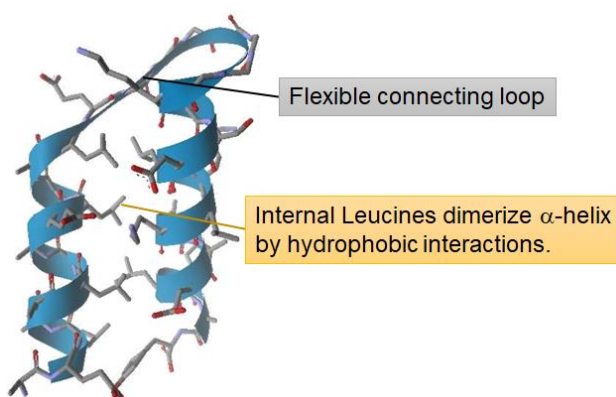


Fig. 1 Helix-Loop-Helix (HLH) scaffold.

ヒトゲノム中に 500 以上の分子種が存在するプロテインキナーゼは、シグナル伝達モジュールの主要な構成要素として数多の細胞イベントを制御している。個別のプロテインキナーゼの担う機能と役割を分子レベルで明らかにすることは、生命現象を詳細に理解するうえで極めて重要である。そのため、特定のプロテインキナーゼを特異的に制御するリガンド分子の創製が望まれている。しかしながら、本酵素クラスに共通して存在する ATP 結合ポケットは高度に保存されており、選択性に優れた ATP 競合性低分子阻害剤のデザインには多大な労力と試行錯誤が必要であった。これに対し、キナーゼ間で比較的保存度が低い結合サイトとして ATP 結合ポケットの周辺部位を標的とするアプローチは、選択的阻害剤取得に向け効果的と考えられる。一方で、そのためのスクリーニング方法論はこれまでに確立されておらず、ATP 非競合リガンドの合理的探索手法の開発が望まれている。そこで本研究では、ATP 結合ポケット周辺に結合し、高い選択性が見込める立体構造規制ペプチドの効率的な探索を可能とすべく、プロテインキナーゼへの指向性を付与した進化分子工学スクリーニング手法の開発を目指した。

第1章 アデノシン修飾型 HLH ペプチドを提示するファージライブラリーの構築

プロテインキナーゼの ATP 結合ポケット以外に結合して酵素阻害活性を発揮する HLH ペプチドを効率的に探索するため、ATP 競合性分子によってファージ上の HLH ペプチドを修飾したプロテインキナーゼ指向性ライブラリーの構築を試みた。これにより、二価結合型のライブラリー分子群となることから、バイオパニングにおける効率性の向上が期待される。併せて、ATP 結合ポケット周辺の HLH ペプチド結合サイトの効果的な探索が見込まれる。

スクリーニングに先立ち、ファージ表層に提示された HLH ペプチドを低分子によって修飾するための手法設定を実施した。低分子修飾にあたってマレイミド-チオール間の選択的化学反应を利用すべく、ファージ上のコートタンパク質 pIII 内のシステイン残基全てを置換した“Cys-Free ファージ”を使用した。モデル実験として、マレイミド-PEG₂-ビオチンを用いて、ファージ上に提示された HLH ペプチドが有する N 末端システインへの修飾反応について検討を行った。反応条件の最適化により、特異的な化学修飾反応が進行すること、化学修飾操作によっても宿主大腸菌に対するファージの感染力が維持されていることを確認した。

プロテインキナーゼを標的とした化学修飾型 HLH ライブラリーの構築に向け、修飾に用いる ATP 競合性分子をデザインした。アンカー分子としての役割を鑑み、プロテインキナーゼの ATP 結合ポケットに選択的かつ適度な結合活性を有するリガンドとしてアデノシンを選択し、リボース部 5 位にリンカーを介してマレイミド基を導入したマレイミド-アデノシン (Mal-Adc) をデザインし合成した (Fig. 2a)。続いて、Cys-Free ファージ発現用プラスミド fdg3p0ss21 を基に分子生物学的手法にてライブラリー発現ベクターを構築後、大腸菌 TG1 を形質転換することによって、HLH 内の 7 残基をランダム化させたファージライブラリーを調製した (Fig. 2b)。

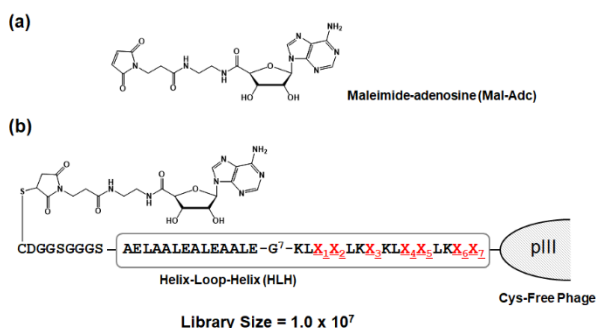


Fig.2 アデノシン修飾型 HLH ペプチド提示ファージライブラリー. (a) Mal-Adc の化学構造. (b) アデノシン修飾型 HLH ペプチド提示ファージライブラリーの調製.

第2章 アデノシン修飾型 HLH ライブラリーを用いた Aurora Kinase A および IKKε Kinase に対するスクリーニング

第1章にて作製したアデノシン修飾型 HLH 提示ファージライブラリーを用いて、Aurora Kinase A (AurA) および IKKε Kinase (IKKε) に対するバイオパニングを実施し、各プロテインキナーゼに結合する HLH ペプチドの取得を試みた。GST 融合体として準備した各キナーゼについて抗 GST 抗体を介してプレートに固定化し、4 ラウンドのバイオパニング

を行った。標的結合ファージの濃縮挙動をモニターするため、各ラウンドにおけるファージ回収率を測定したところ、いずれのスクリーニングにおいてもパンニングラウンド数に応じたファージ回収率の向上が認められたことから、標的キナーゼに対する特異的結合ファージクローンが濃縮されていることが示唆された。AurA, IKK ϵ それぞれに対するスクリーニングにおける最終ラウンドのアウトプットファージより任意に16クローンずつをピックアップし、DNA シークエンス解析により提示 HLH ペプチド配列を同定した。配列解析の結果、各プロテインキナーゼに対するスクリーニングにて濃縮された HLH ペプチドはそれぞれ明確なコンセンサスモチーフを有しており、また、AurA, IKK ϵ 間で濃縮配列に類似性は認められなかった (Fig. 3)。加えて、各コンセンサスモチーフは、AurA および IKK ϵ に対する基質配列、および、各キナーゼと相互作用することが知られているパートナータンパク質の結合ドメイン配列とも相同性を有していなかった。以上から、アデノシン修飾型 HLH ライブラリーを用いたスクリーニングにより、各プロテインキナーゼへの結合が見込める新規性の高いペプチドの濃縮が示唆された。

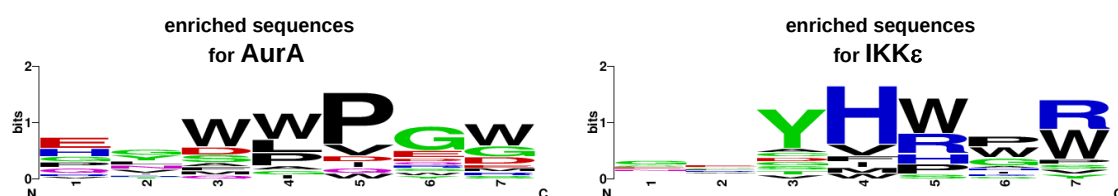


Fig.3 AurA および IKK ϵ に対するバイオパンニングにより濃縮されたファージクローンが提示する HLH ペプチドの配列解析.

第3章 スクリーニングにより選択された HLH ペプチドの各種機能評価

第2章で実施した AurA および IKK ϵ に対するスクリーニングにて取得したペプチド群から、それぞれ **Bip-3**, **IKK-05** と名付けたペプチドを代表ペプチドとしてピックアップし、Fmoc 固相合成法により合成後、各種評価に供した。

IMAP 法によりキナーゼ阻害活性評価を実施したところ、**Bip-3** および **IKK-05** はそれぞれ、103 μ M, 155 μ M の IC₅₀ にて各標的キナーゼを阻害した。また、CD スペクトル測定による二次構造解析の結果、いずれのペプチドも高い α -ヘリシティを示し、rigid な立体構造を保持していた。これに対し、**IKK-05** の C 末端側ヘリックス部のみの配列を切り出した **tIKK-05** については、ランダムコイル構造をとっており、また、IKK ϵ に対する阻害活性を示さなかった。これより、標的タンパクへの結合ならびに機能阻害においては、HLH scaffold による立体構造規制が重要であることが示唆された。

続いて、**Bip-3**, **IKK-05** 両ペプチドが各標的キナーゼを阻害する際の阻害様式を考察すべく、kinetics 評価を実施した。複数濃度での ATP/ペプチド添加条件下にてキナーゼ活性を測定し、Lineweaver-Burk プロットにて ATP との競合性を評価したところ、両ペプチドとも ATP に対して混合阻害型の阻害様式を示した。これにより両 HLH ペプチドは遊離型の

酵素および ATP-酵素複合体のいずれにも結合可能であることを明らかにした。

また、各 HLH ペプチドについて、スクリーニング時と同様に **Mal-Adc** によるアデノシン修飾を施し、**Adc-Bip-3** および **Adc-IKK-05** を合成した。これらペプチドのキナーゼ阻害活性を評価したところ、**Adc-Bip-3**、**Adc-IKK-05** はそれぞれ 8 μ M, 11 μ M の IC₅₀ にて各標的キナーゼを阻害した (Fig. 4)。アデノシンの修飾により、各ペプチド阻害剤において 10 倍以上の阻害活性が見られたことから、アデノシンと HLH ペプチドは標的タンパクへの結合に際し協調的に働くことが示された。各ペプチドが混合阻害型の阻害様式を示した前述の結果と併せて、HLH ペプチドはキナーゼの ATP 結合ポケット以外のサイトに結合している可能性が高いと考察した。

最後に、各アデノシン修飾 HLH ペプチドについて複数キナーゼ間の阻害選択性を評価した。**Adc-Bip-3**、**Adc-IKK-05** とも評価に供したキナーゼのうち、各々の標的タンパクである AurA および IKK ϵ に対してそれぞれ最も高い阻害活性を示したことから、ともに標的キナーゼに対する選択性を有していることを明らかとした。

(a)	ペプチド	配列	AurA阻害活性 (IC ₅₀ , μ M)
	Bip-3	H-CDGSGGSAELAALAELAALEGGGGGGKLE YLKWLWPLK GW-NH ₂	103
	Adc-Bip-3	adenosine H-CDGSGGSAELAALAELAALEGGGGGGKLE YLKWLWPLK GW-NH ₂	8
(b)	ペプチド	配列	IKK ϵ 阻害活性 (IC ₅₀ , μ M)
	IKK-05	Ac-AELAALAELAALEGGGGGGKLG LLKYKLHWL KGW-NH ₂	155
	tIKK-05	Ac-KLGL LLKYKLHWL KGW-NH ₂	> 1,000
	Adc-IKK-05	adenosine H-CDGSGGSAELAALAELAALEGGGGGGKLG LLKYKLHWL KGW-NH ₂	11

Fig.4 AurA 阻害ペプチド (a) および IKK ϵ 阻害ペプチド (b)のキナーゼ阻害活性.

総括

本研究では、進化分子工学と *de novo* 設計ペプチドを組み合わせた立体構造規制ペプチドリガンド探索をさらに発展させ、プロテインキナーゼの ATP 結合ポケット周辺への結合を指向した効率的な HLH ペプチド探索手法の開発を試みた。ATP 競合性のアンカー分子のデザインおよびそれによる HLH ペプチドライブラリーの化学修飾手法を確立し、2 種のプロテインキナーゼに対してスクリーニングを行うことで、標的酵素に対し阻害活性を有する HLH リガンドを効率的に取得可能であることを実証した。本手法を活用することで、プロテインキナーゼの機能解析研究に有用なツールリガンドや、医薬品開発に向けたリード起点分子の迅速創出が見込まれる。

発表論文

1. D. Fujiwara, K. Mihara, R. Takayama, Y. Nakamura, M. Ueda, T. Tsumuraya, I. Fujii, *ChemBioChem*, 22, 3406–3409 (2021)
2. K. Mihara, N. Nakajima, I. Fujii, D. Fujiwara, *Pept. Sci.* (the American Peptide Society), e24253. <https://doi.org/10.1002/pep2.24253> (2021)

学位論文草稿提出者氏名：三原 皓典

学位論文草稿題目：プロテインキナーゼ指向性ファージ表層提示ペプチド
ライブラリーの構築と阻害ペプチドの創出

ヒトゲノム中には 500 以上のプロテインキナーゼが存在し、シグナル伝達モジュールの主要な構成要素として細胞イベントを制御しているため、ケミカルバイオロジーや創薬科学的観点から、特定のプロテインキナーゼを特異的に制御する分子標的化合物の創出が望まれている。しかしながら、各種キナーゼに存在する ATP 結合ポケットは高度に保存されており、選択性に優れた ATP 競合性阻害剤のデザインには多大な労力と試行錯誤が必要である。これに対し、ATP 結合ポケットの周辺部位はキナーゼ間で保存度が低いため、選択的阻害剤を開発するための効果的な分子標的部位と考えられている。しかし、そのためのスクリーニング方法論はこれまでに確立されておらず、ATP 非競合阻害剤の合理的探索手法の開発が望まれている。そこで本研究では、当研究室で独自に開発した堅固な立体構造を有する Helix-Loop-Helix (HLH) ペプチドを中分子モダリティとして利用して、プロテインキナーゼ指向性を付与した進化分子工学スクリーニング手法を考案し、ATP 結合ポケット周辺に結合する選択的キナーゼ阻害剤の創出を検討した。

第 1 章では、プロテインキナーゼの ATP 結合ポケット以外に結合して酵素阻害活性を発揮する HLH ペプチドを効率的に探索するため、ファージ表層提示 HLH ペプチド・ライブラリーをアデノシン (ATP 競合性分子) で化学修飾してプロテインキナーゼ指向性ライブラリーを構築した。アデノシンをアンカー分子とすることにより、ATP 結合ポケット周辺を結合部位とする HLH ペプチドの効果的な探索が可能となった。第 2 章では、作製したアデノシン修飾型 HLH 提示ファージライブラリーを用いて、Aurora Kinase A (AurA) および IKKe Kinase (IKKe) に対するバイオパンニングを実施し、各プロテインキナーゼに結合する HLH ペプチドを取得した。第 3 章では、AurA および IKKe に対するスクリーニングにて取得したペプチド群から、それぞれ結合活性の高いペプチド (Bip-3 および IKK-05) をピックアップし、Fmoc 固相法によりペプチド合成し、結合活性、構造解析 (CD)、酵素阻害活性を評価した。また、複数キナーゼ間の阻害選択性を評価し、各標的タンパクである AurA および IKKe に対してそれぞれ最も高い阻害活性を持つこと示した。

以上のように、申請者は、進化分子工学と *de novo* 設計ペプチドを組み合わせた立体構造規制ペプチドの探索をさらに発展させ、プロテインキナーゼの ATP 結合ポケット周辺への結合を指向した効率的な HLH ペプチド探索手法の開発に成功した。本手法を活用することで、プロテインキナーゼの機能解析研究に有用な分子ツールや、医薬品開発に向けたリード分子の迅速な創出が期待される。本学位論文には、顕著な新規性と独創性があり、申請者を博士 (理学) の学位に値する能力を持つものと判断する。