

## 論文の内容の要旨

論文題名      NMR によるペプチドリガンドの迅速スクリーニング  
と構造決定

氏名            水越 弓子

ペプチドリガンドの研究は、機能既知のレセプター作動薬（アゴニスト）、反作動薬（アンタゴニスト）の探索のみならず、ゲノム解析から新規に同定されたレセプターの機能研究や、抗体に代わるバイオドラッグの候補として盛んに行われている。しかし、ペプチドリガンドをそのまま薬剤とするには生体内での安定性が低い等の問題があり、その作用を持つ別の分子を創造する必要がある。この際もっとも必要とされるのが、ペプチドリガンドの作用点の解析と構造情報である。詳細なファルマコフォア情報が得られれば、*in-silico* スクリーニング等の手段により、3次元で活性化化合物の同定が可能となり低分子創出への道程が短縮される。

本論文は、標的タンパク質と結合するペプチドリガンドを迅速に同定し、さらにペプチドの結合状態における詳細な構造を解析するという二つの目的で研究を行ったものである。一つ目はファージライブラリーから得られたペプチドリガンドをそのまま、安定同位体ラベルペプチドとし、NMR で結合のスクリーニングを行ったものであり、二つ目は得られた複数のペプチドリガンドの結合状態における構造をこれまで適用例のなかった交差相関緩和法を体系的に適用して、詳細に解析したものである。

1. ペプチドリガンドのスクリーニングに用いたファージから NMR 解析可能な同位体ラベルペプチドを直接調製する方法の開発

従来の方法ではペプチドリガンドを得てから、NMR 解析可能な同位体ラベルペプチドを調製するまでには、タンパク質と融合した形で発現精製するため、多工程あり、日数にして短くとも 2 週間を要していた。そこで、本研究ではこれを短縮する目的で本来スクリーニングソースとしてのみ用いられるペプチド呈示ファージから直接ペプチドを切断し、ペプチドリガンドを得る方法を考案した。これが達成できれば、遺伝子操作による新たな発現系構築や、融合タンパク質の精製などの工程数を大幅に削減できるため、最短 3 日間でペプチドリガンドが得られる。ファージは大腸菌中で増殖するため、通常同位体標識用培地で培養することで同位体ラベルペプチドを得ることができる。

この方法を達成するため、ファージライブラリーに 3 つの修飾を施した。1 点目はペプチドを M13 ファージの主要外郭タンパク質 g8p (1 ファージ粒子中 2700 コピー) に融合したこと、2 点目は g8p とペプチドを化学的に切断できるように g8p の最初の残基を Ala から Met に変異させた点、3 点目はペプチドライブラリーを融合した g8p の遺伝子をファージミドベクター内のプロモーター下流に挿入したことである。この 3 点目の修飾により、スクリーニング時と大量発現時でペプチドを呈示する g8p の発現頻度を調節することが可能になる。

10 残基のランダム配列からなる新規ファージライブラリーを抗 Fas 抗体を用いてスクリーニングした結果、4 ラウンドのパニングから 5 種類のクローンが選択された。これらのクローンのうちの 1 種類を大量培養し、集めたファージから化学的にペプチドリガンドを切断後、精製した結果、発現誘導時 (プロモーター作動薬添加時) と非誘導時では発現誘導時の方が、目的ペプチドが約 100 倍多く得られることが示された。50mL の培養から精製されたペプチドの収量は約 20 $\mu$ g であり、一回の NMR による結合スクリーニングに十分な量であった。

## 2. ペプチド呈示ファージから直接調製した同位体ラベルペプチドの NMR による結合スクリーニング

前項で選択された、即ち、ファージ上に呈示されていたときには標的タンパク質である抗 Fas リガンド抗体と結合していた 5 種類のクローン全てを、前項の方法に従って培養・精製し同位体ラベルペプチドを得た。これらの同位体ラベルペプチドの結合活性を NMR によって解析した。まず、ペプチドのみの時の  $^1\text{H},^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定し次に抗 Fas リガンド抗体を加えたときの  $^1\text{H},^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルと比較した。 $^1\text{H},^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルで観測されるシグナルは化学的・物理的環境の変化に非常に鋭敏なため、ペプチドが分子量の大きいタンパク質に結合すると、その結合した部分のシグナル強度が減弱あるいは消失する。ペプチド 1, 2, 3 でそのシグナル強度が減弱、消失した数が多く、ペプチド 4, 5 では少なかった。この結果からペプチド 1, 2, 3 の結合活性が、ペプチド 4, 5 より強いことが予想された。これを表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で確認したところ、ペプチド 1, 2, 3 の結合活性が、ペプチド 4, 5 より約 10 倍強いことが分かった。このように、それぞれのペ

ペプチドの結合活性はフェージ上に呈示された状態では明確でないが、同位体ラベルペプチドを用いた NMR 解析ではその差が明確になる。こうして NMR による結合スクリーニングでペプチド 1, 2, 3 を選択し、さらなる解析へと進めた。

さらに、同位体ラベルペプチドとノンラベルのペプチドを組みわせることで NMR による解析を行った結果、ペプチド 1 と 2 は競合し、ペプチド 2 と 3 は競合しないことが分かった。また、SPR 実験でペプチド 2 はこの抗体の本来のリガンドである Fas リガンドと抗体の結合部位で競合することが示された。

### 3. ペプチドリガンドの構造解析

前項の NMR と SPR による相互作用解析の結果、ペプチド 1, 2 はアミノ酸配列上のホモロジーは低いにも関わらず、結合サイトで互いに競合し、さらにその結合サイトは本来のリガンドである Fas リガンドの結合サイトでもあることが示された。これらのペプチドリガンドの抗体結合状態での立体構造に共通項があるのか興味を持たれた。そこで、これらのペプチドリガンドの結合状態での構造解析を試みた。

ペプチドの NMR による構造解析はこれまでも多く報告されているが、従来の原子間距離情報に基づく NOE 法ではペプチドのコンフォメーションによっては情報が限られ、構造決定が難しいことが知られている。

上記のペプチド 1, 2 の結合状態での構造を 交差系の転移 NOE (TrNOE) 法で決定しようと試みたが、情報量が少なく、得られた NOE シグナルの殆どが近接する残基間であったため計算構造も収束度の低いものであった。そこで、原子間距離情報を補完する別種の情報が必要であると考えた。

原子間距離情報を補完する情報として、主鎖二面角情報がある。ペプチドは残基と残基の間のペプチド結合が平面性をもつため、 $\Psi$ アングル、 $\Phi$ アングルが正確に決定できれば、主鎖構造が規定される。1997 年、Griesinger や Kay によって主鎖二面角は交差相関緩和法により実験的に求められることが報告された。ところが、これまで結合の弱いペプチドリガンドの解析 (交差系) において、転移交差相関緩和法を適用して 2 種類の主鎖二面角を得、ペプチドの結合状態での構造を決定した例は報告されていない。2 種類の主鎖二面角情報を体系的に導入するためには障壁となる以下の 3 つの項目を克服する必要があった。

①安定同位体標識したリガンドが必要となる。②これまで報告されていた 3 次元測定では感度が悪く、長時間の測定を要する。③ $\Phi$ アングル分子量の大きいもの(>20K Da)は測定できない。①に関しては、前項で確立した迅速ラベルペプチド調製法により、短時間でラベルペプチドを得ることができるようになった。②に関しては、本研究室で最近開発された 2 次元測定法を応用することで測定感度も上昇し測定時間が約 1/3 に短縮された。③の分子量制限については、転移交差相関緩和法の測定法、ならびに解析法を開発したため、ペプチドリガンドの分子量 (～数 K Da) となり、標的分子の分子量制限は無くなった。

上記のペプチド 1, 2 を同位体ラベル標識したものに、抗体を添加し交差相関緩和速度を

測定した。この二面角情報を、TrNOE法で得られた原子間距離情報に加え構造計算を行った。200個計算した構造のうち、安定構造20個の構造について、主鎖の収束度を求めた結果、原子間距離情報のみから計算された構造と比較すると、rmsdがペプチド1で $1.47 \pm 0.30 \text{ \AA}$ から $0.94 \pm 0.27 \text{ \AA}$ へ、ペプチド2で $1.32 \pm 0.37 \text{ \AA}$ から $0.37 \pm 0.10 \text{ \AA}$ へとそれぞれ向上した。

それぞれのペプチドの1残基変異体と抗体との結合実験（SPR法）から、結合に重要な残基はペプチド1ではVal<sup>5</sup>, Arg<sup>7</sup>, Trp<sup>10</sup>であり、ペプチド2ではPhe<sup>3</sup>, Arg<sup>5</sup>, Leu<sup>8</sup>であることが示された。これらの残基を含む領域が結合のコアであると考えられる。二つのペプチドの最安定構造のコア領域を主鎖で重ね合わせたところ、主鎖間rmsdが $1.06 \text{ \AA}$ と非常によく一致し、かつ結合に重要であることが示されたそれぞれの3残基の側鎖の方向も一致していた。アミノ酸配列ではホモロジーの低い2種類のペプチドの、標的タンパク質に結合した構造が3次的には一致するという興味深い結果が得られた。

## 結論

以上をまとめると、第一に、新規に開発したファージディスプレイ法を用い、リガンドスクリーニングから複数のペプチドリガンドのNMR解析までを迅速に行える方法を確立した。第二に、主鎖二面角情報を得るための体系的方法を確立したことにより、従来の原子間距離情報を補完できるようになり、従来法では困難であったペプチドリガンドの立体構造を高精度に決定できた。第三に、複数の結合の弱いペプチドリガンドの高精度な結合構造から、結合モチーフの同定が可能であることを示すことができた。

本研究は、これまでスクリーニングソースとしてのみ利用されていたファージライブラリーを、ペプチドを融合する一つのタンパク質として活用し、ペプチドを呈示したファージから直接ペプチドを精製した初めての例である。NMR解析可能な収量が得られるため、他のアッセイ系にも適用できるペプチド作製法であると考えられる。また、同位体ラベルペプチドを用いた転移交差相関緩和法による、ペプチドリガンドの結合状態での体系的な二面角情報の取得はこれまで報告例がない。結合の弱いペプチドリガンドでは、他にこの二面角情報を得る手段がないため、これまで構造が明らかにできなかったペプチドリガンドの構造を解析する有用な方法であると確信する。