

121. 小胞体の品質管理機構を利用した難病 FAP の創薬研究

佐藤 卓史

熊本大学 大学院生命科学研究部 (薬学系) 生命分析化学分野

Key words : トランスサイレチン, 家族性アミロイドポリニューロパチー, ファージディスプレイ, ペプチド

緒言

家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) は、血清タンパク質であるトランスサイレチン (TTR) の変異体により形成されたアミロイド線維が神経を中心に全身諸臓器に沈着する予後不良の遺伝性疾患である。細胞から分泌された TTR は四量体を形成しており、血中においてサイロキシンの輸送を担っている。変異型 TTR は野生型と比べて細胞外環境でミスフォールディングを起こしやすく、変性した変異型 TTR は凝集し、アミロイド線維を形成する¹⁾。現在、発症初期の患者に対しては TTR の主要な産生臓器である肝臓を置換する肝臓移植が有効であることが示されているが、深刻なドナー不足や患者の心的肉体的負担の大きさからも移植に頼らない新規治療法の開発が急務とされる。我々は血中の変異型 TTR 濃度が非常に低い患者が晩期発症を呈する臨床知見に着想を得て、変異型 TTR の分泌を抑制し、細胞内分解を誘導する新たな FAP 治療標的の探索を行ってきた。複数種の変異型 TTR を用いて細胞内での TTR 分泌・分解の制御機構の解析を行ったところ、小胞体品質管理機構による TTR の分泌および小胞体関連分解 (ERAD) が FAP 病態に影響を与えることを見出した。さらに、小胞体での TTR 四量体化阻害がほぼ全ての変異型 TTR の分泌を選択的に抑制し、ERAD により変異型 TTR を除去できることを発見した²⁻⁴⁾。本知見は、TTR 四量体化阻害剤が変異型 TTR の分泌を抑制する新規 FAP 治療薬候補となることを意味する。そこで、ペプチドリガンドスクリーニングにより TTR 四量体化阻害ペプチドの探索を行い、変異型 TTR の分泌を選択的に抑制する創薬候補ペプチドの取得を最終目的としている。本研究ではファージディスプレイ法を用いて TTR 結合ペプチドの探索を行い、取得したペプチドが TTR の構造状態にどのような影響を与えるのか解析した。

方法、結果および考察

1. ファージディスプレイ法を用いた TTR 結合ペプチドの探索

ペプチドより TTR の四量体化を阻害するためには、単量体間または二量体間の相互作用面に結合するペプチドを取得する必要がある。そこで、バイオパニングは四量体 TTR の分子表面に結合するファージを除去する Negative selection (ベイト: 四量体 TTR)、Negative selection の未結合ファージを用いて単量体 TTR に結合するファージを選別する Target selection (ベイト: 変異導入により四量体化を阻害した単量体 TTR (M-TTR)) の 2 ステップで行った (図 1A)。さらに、結合部位の異なるペプチドのバリエーションを増やすために、Target selection では単量体構造の異なる 2 種類の M-TTR (M-TTR および L12P M-TTR) を用いた (図 1B)。なお、TTR および M-TTR は GB1 タグおよび His タグを融合したタンパク質として大腸菌発現系により発現・精製した。

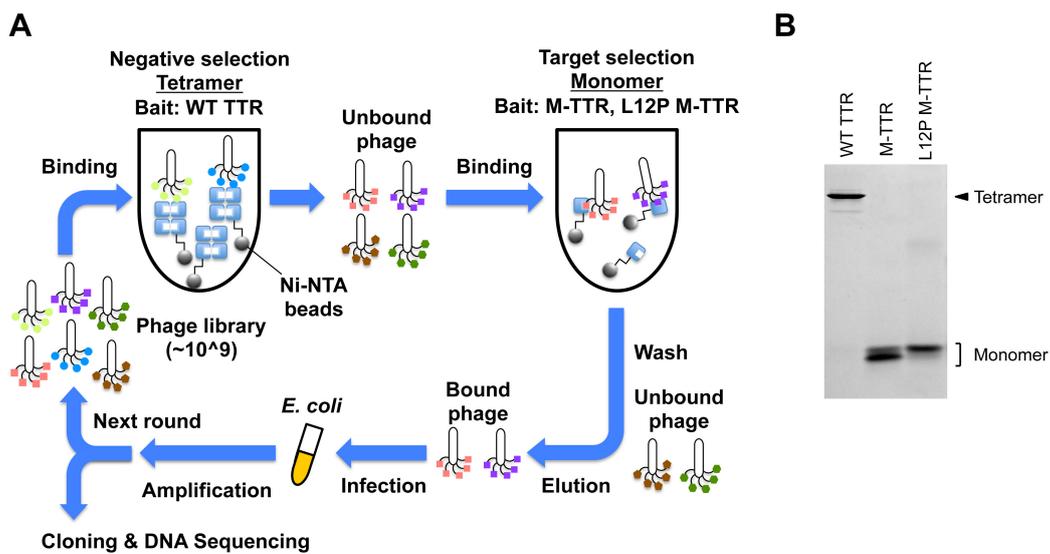
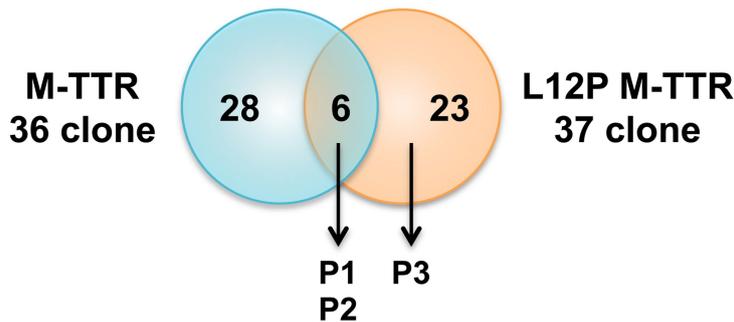


図1. ファージディスプレイ法を用いた TTR 結合ペプチドの探索

(A) Negative selection と Target selection を組み合わせた TTR の相互作用面に結合するペプチドのスクリーニング方法。(B) WT TTR、M-TTR、L12P M-TTR の Native PAGE による構造状態の評価。

ランダムペプチド（直鎖状または環状ペプチド）を提示する M13 ファージライブラリを用いて上記方法によりバイオパニングを3回繰り返し、ファージクローンの濃縮を行ったところ、直鎖状ペプチドではファージクローンが濃縮されなかった。一方、環状ペプチドでは複数のファージクローンの濃縮が確認された。M-TTR のバイオパニングでは28種類、L12P M-TTR のバイオパニングでは23種類のペプチドが同定された（図2）。両者に共通のペプチドは6種類であり、うち2種類（P1、P2）についてはペプチドの出現頻度が高かった。一方、L12P M-TTR のみに観察される出現頻度が高いペプチドとしてP3を同定した（図2、表）。



Clone No.	Frequency (M-TTR)	Frequency (L12P M-TTR)
P1	7/36	12/37
P2	3/36	3/37
P3	-	2/37

図2. M-TTR および L12P M-TTR に結合する環状ペプチドのファージクローンの分類
出現頻度の高い3種類のペプチドを同定した。

2. TTRの構造状態に与える環状ペプチドの影響の評価

ファージディスプレイにより同定した3種類の環状ペプチド (P1~P3) が TTR の四量体および単量体の構造状態に及ぼす影響を調べるために、WT TTR または M-TTR をペプチド P1~P3 と 25℃、1 週間インキュベーションし、Native PAGE により TTR の構造状態を評価した。WT TTR では、P1、P2 とのインキュベーションにより四量体付近にシフトアップした2本のバンド (図3A、complex II) とさらに高分子量側に1本のバンド (図3A、complex III) が出現した。P3 とのインキュベーションでは四量体付近にシフトアップしたバンド (図3A、complex II) がわずかに認められた。一方、M-TTR では3本のバンド (図3A、Form A、B、C) が観察されたことから、単量体は定常状態において3つの構造状態が存在することが示唆された。これら構造状態に与えるペプチドの影響を評価したところ、P1、P2 とのインキュベーションにより Form B のバンドが減少し、単量体付近にシフトアップしたバンド (図3A、complex I) と TTR で観察された complex II と同等のバンドが出現した。したがって、ペプチド P1 および P2 は単量体 Form B もしくは四量体 TTR に結合し、TTR の構造状態を変化させることが示唆された。

ペプチドによる TTR の構造変化は 25℃、1 日間のインキュベーションでは顕著に起こらなかったため (図3B、1 day、25℃)、ペプチドは native な構造状態の TTR に結合するのではなく、アンフォールドした構造状態の TTR に結合するのではないかと仮説を立てた。本仮説を検証するために、インキュベーション温度の影響、構造安定性の低い L12P TTR へのペプチドの結合について評価した。WT TTR ではインキュベーション温度の上昇 (4→37℃) に伴い、complex II が増加することが明らかになった (図3B、3 day)。一方、L12P TTR は構造安定性が低いため、ペプチド未添加のコントロールではインキュベーション温度の上昇にともない aggregate の形成が観察された。この条件下でペプチド P1 の結合を評価したところ、37℃、1 日間のインキュベーションで complex II が出現し、25℃または 37℃、3 日間のインキュベーションでは大部分が complex II として存在することが明らかになった (図3C)。以上より、ペプチド P1 はアンフォールドした構造状態の TTR に結合する可能性が示唆された。

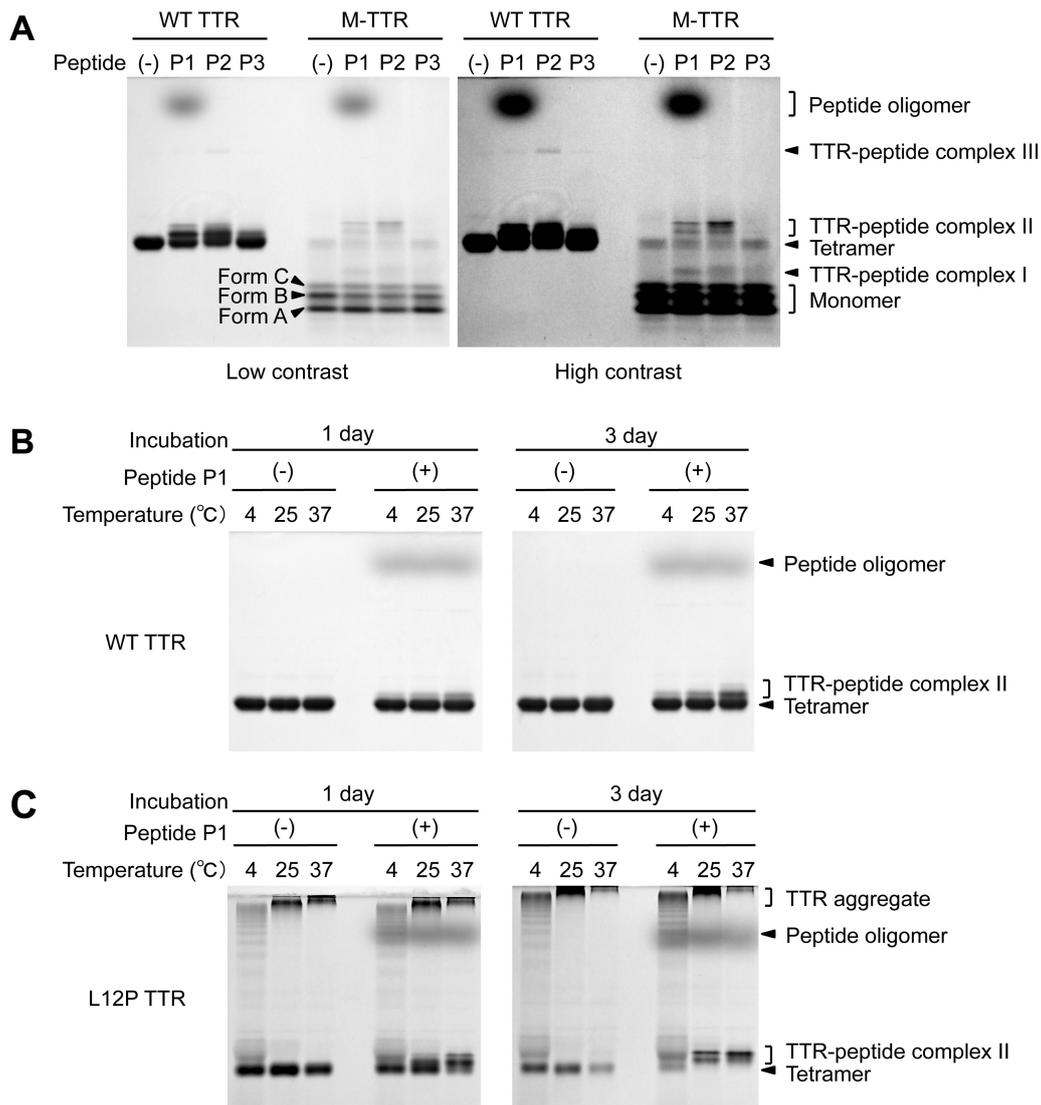


図3. TTRの構造状態に与える環状ペプチドの影響の評価

(A) WT TTR または M-TTR とペプチド P1~P3 を 25°C、1 週間インキュベーションし、Native PAGE で TTR の構造状態を評価した。(B、C) WT TTR または L12P TTR とペプチド P1 を 4、25、37°C、1 日間または 3 日間インキュベーションし、Native PAGE で TTR の構造状態を評価した。

次に、ペプチド P1 および P2 による TTR の構造変化が他の FAP 発症変異体 (V30M および L55P TTR) でも観察されるか Native PAGE により評価した。WT TTR で観察された結果と同様に両変異体においても complex II および complex III の出現が確認された (図 4A)。したがって、ペプチド P1 および P2 は様々な変異型 TTR に結合し得ることが示唆された。最後に、TTR-ペプチド複合体の安定性を評価するために、熱変性による TTR の構造変化を Native PAGE により評価した。ペプチド未添加の WT TTR では熱変性による四量体の減少、aggregate の増加は観察されなかった。一方、TTR-ペプチド complex II は熱変性時間依存的に減少し、aggregate の増加が認められた (図 4B、WT TTR)。同様の実験結果は V30M TTR、L55P TTR においても観察された (図 4B)。したがって、ペプチド P1 および P2 は TTR に結合して四量体構造を不安定化させることが明らかになった。

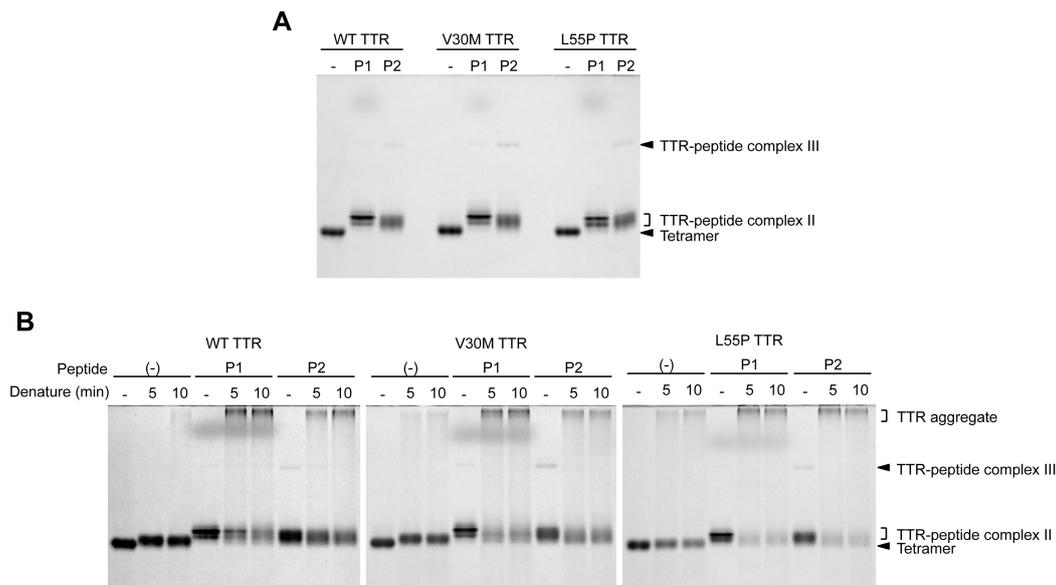


図4. TTR-ペプチド複合体の構造状態の評価

(A) ペプチド P1、P2 が各種 FAP 発症変異体の構造状態に与える影響を Native PAGE により評価した。(B) TTR とペプチドのサンプル溶液を 98°C、5 分間または 10 分間加熱し、急冷したサンプルを Native PAGE により評価した。

本研究によりアンフォールド状態の TTR 単量体に結合する環状ペプチドの同定に成功したが、これらペプチドは四量体を解離させる作用は有していないことが示唆された。今後は NMR によりペプチド P1、P2 の TTR 結合部位を同定するとともに、培養細胞の評価系を用いて小胞体での TTR 四量体形成過程におけるペプチドの影響を評価し、変異型 TTR の分泌を抑制する創薬シーズとなるか検討する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は熊本大学大学院生命科学研究部（薬）生命分析化学分野の森岡弘志教授、小橋川敬博准教授および遺伝子機能応用学分野の甲斐広文教授である。

文献

- 1) Baranczak A, Kelly JW. A current pharmacologic agent versus the promise of next generation therapeutics to ameliorate protein misfolding and/or aggregation diseases. *Curr Opin Chem Biol.* 2016 Jun; 32:10-21. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.01.009.
- 2) Sato T, Susuki S, Suico MA, Miyata M, Ando Y, Mizuguchi M, Takeuchi M, Dobashi M, Shuto T, Kai H. Endoplasmic reticulum quality control regulates the fate of transthyretin variants in the cell. *EMBO J.* 2007 May 16;26(10):2501-12. Epub 2007 Apr 12. PMID: 17431395.
- 3) Susuki S, Sato T, Miyata M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Ando Y, Kai H. The Endoplasmic Reticulum-associated Degradation of Transthyretin Variants Is Negatively Regulated by BiP in Mammalian Cells. *J Biol Chem.* 2009 Mar 27;284(13):8312-21. doi: 10.1074/jbc.M809354200.
- 4) Sato T, Sako Y, Sho M, Momohara M, Suico MA, Shuto T, Nishitoh H, Okiyoneda T, Kokame K, Kaneko M, Taura M, Miyata M, Chosa K, Koga T, Morino-Koga S, Wada I, Kai H. STT3B-dependent posttranslational N-glycosylation as a surveillance system for secretory protein. *Mol Cell.* 2012 Jul 13;47(1):99-110. doi: 10.1016/j.molcel.2012.04.015.