

115. マイオスタチン阻害ペプチドの作用機構解明と分子設計

高山 健太郎

東京薬科大学 薬学部 薬品化学教室

Key words : マイオスタチン, 阻害ペプチド, 結晶化スクリーニング, X線結晶構造解析

緒言

本研究で着目する「マイオスタチン」はTGF- β スーパーファミリーに属し、筋量を負に制御しているタンパク性局所因子である。当該遺伝子の欠損動物や中和抗体投与では筋量が有意に増加し [1, 2]、デュイ受容体投与では筋崩壊により生じるがん悪液質を改善すること [3, 4] から、抗マイオスタチン療法による筋肉増強のPOCが確立されている。ところが、比較的小さな分子によりマイオスタチンを効果的に阻害する報告は皆無であった。また、TGF- β スーパーファミリーに属するリガンドは、受容体を共用していることから、受容体を標的とした創薬戦略は副作用の発現が大きく懸念される。そこで我々は、マイオスタチンが、自身の前駆体由来するプロドメインタンパク質と不活性複合体形成する性質に着目した。2004年にJiangらが、ヒトマイオスタチンプロドメイン由来の74残基フラグメントがGST融合タンパク質としてマイオスタチン阻害活性を示すことを報告したが [5]、その後の短鎖化フラグメントあるいは合成ペプチドによる効果的阻害の報告は無かった。

このような状況下、我々は、2015年にマウスマイオスタチン前駆体プロドメインを探索することで、効果的なマイオスタチン阻害活性 ($IC_{50} = 3.52 \mu M$) を示す最小活性構造単位として23残基のペプチド **1** (WRQNTYRSRIEAIKIQILSKLRL-amide) を同定した [6]。一方で、ヒト由来の23残基ペプチド (WRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRL-amide、下線部のアミノ酸のみマウス配列と異なる) の阻害活性は顕著に弱く ($IC_{50} > 10 \mu M$) [6]、マウス配列を探索したことがペプチド **1** の発見に繋がったことは非常に興味深い。その後の構造活性相関 (SAR) 研究により、げっ歯類に特徴的なTyr残基 (1のN末端から7残基目) がペプチド阻害剤の活性に重要であることを突き止めた [7]。現在までに、ペプチド **1** を基盤とした網羅的なSARを経て、*in vitro*での阻害活性が約11倍向上したペプチド誘導体 **2** の獲得に成功している [8, 9]。マイオスタチン前駆体プロドメインタンパク質は、マウス、ヒト共に強力なマイオスタチン阻害能を有することから、我々が創製した合成ペプチド阻害剤 **1** および **2** のマイオスタチン結合様式は、既に報告されているタンパク質の結合様式 [10] とは一線を画すものであることが示唆される。ペプチド **1** および **2** (0.1 mg) は、筋ジストロフィー病態モデルおよび野生型マウスへの筋注 (1~2回) により、筋繊維の有意な肥大に伴う10~30%の筋量増加を示すことから [6, 9]、その作用機構解析は創薬研究を進展させる上で非常に意義深いと言える。

そこで本研究では、阻害ペプチド **1** および **2** とマイオスタチンとの共結晶を作製し、X線結晶構造解析により、その詳細な結合様式および阻害能発現に関わる分子機構を解明するための検討を実施した。以下では、マイオスタチンタンパク質の大量調製法確立、およびペプチド **1** 存在下における結晶化条件の最適化に関して述べるとともに、今後の展望を考察する。

方法および結果

1. マイオスタチン阻害ペプチドの合成

既報の通り、ペプチド鎖の構築は通常の Fmoc 固相合成法を用いて行い、TFA による脱樹脂、エーテル処理による粗ペプチドの獲得を経て、最終的に逆相 HPLC にて精製することで、95%以上の純度にて TFA 塩の白色粉末として所望のペプチド **1** および **2** を単離した [6, 9]。

2. マイオスタチンタンパク質の大量調製

結晶化に用いるマイオスタチンタンパク質を獲得するために、大腸菌発現系および培養細胞を用いた発現系を種々検討した。検討例として、組換え成熟マイオスタチンを安定発現する HEK293 細胞を構築したが、タンパク発現量が少なく、さらにはオリゴマー形成が顕著にみられたため、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる単離精製が困難であった。

そこで、生来の産生機構を利用し、組換え前駆体タンパク質として発現させることで、成熟マイオスタチンの単離精製を試みることにした。最終的には、マイオスタチン前駆体 (25~376) の N 末端に His6 タグを導入した組換えタンパク質を安定発現する HEK293 細胞株を構築し、三段階の精製を経て高純度で成熟マイオスタチンを大量調製する方法を確立することに成功した (図 1)。特に興味深い知見として、塩を含まない移動相を用いた逆相およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーが至適精製法として最適化された点が挙げられる。具体的には、二段階目の逆相カラム (Resource RPC 1mL, 0.64×30 mm) を用いた精製では、0.1%TFA 含有水-アセトニトリル混合溶媒系において、アセトニトリル濃度を開始 5 分間で 0%から 38%に、その後 20 分間で 39%にグラジエントをかける条件に最適化した (流速: 1.0 mL/min、検出: UV 280 nm)。また三段階目のゲルろ過カラムクロマトグラフィー (Superdex 75 10/300 GL) では、0.1%TFA 含有水-アセトニトリル混合溶媒 (アセトニトリル濃度 30%) を用いたイソクラティック溶離により、マイオスタチン画分を高純度で単離できることを見出した。

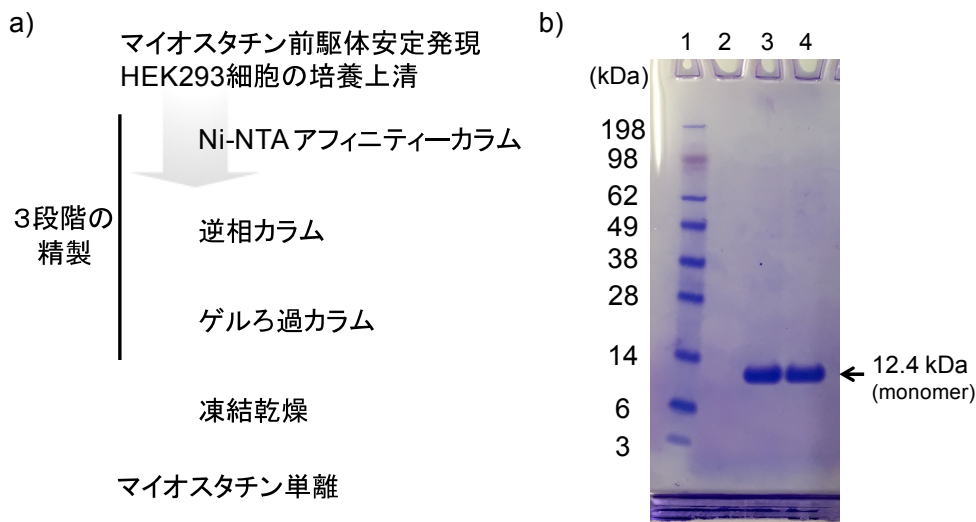


図 1. マイオスタチンの大量調製法の概略 (a) と精製マイオスタチンの SDS-PAGE (b)

- 細胞 (安定発現株) 培養上清から 3 段階のカラム精製および凍結乾燥により単離
- Lane 1 : marker、lane 2 : none、lanes 3 and 4 : purified myostatin (10 μ g and 5 μ g、respectively)

3. タンパク質結晶化と X 線結晶構造解析

精製したマイオスタチンを大規模自動結晶化システムに附すことで、700 種を超える結晶化溶媒の中から、ペプチド **1** 存在下で結晶が生成する条件を探索した。その結果、結晶化可能な溶媒条件として MPD (2-メチル-2,4-ペンタンジオール) を添加剤として含む重要性を見出すことができ、更なる最適化によって最終的に三種の結晶化条件 (結晶化溶媒 1 : 0.1 M Acetate buffer pH 4.0、40% MPD、0.2 M AmPO₄ ; 結晶化溶媒 2 : 0.1 M Tris buffer pH 8.4、35% MPD、0.2 M AmSO₄ ; 結晶化溶媒 3 : 0.1 M MES pH 6.0、40% MPD) に絞り込んだ。これらの結晶化溶媒を用い、10 mM HCl にて再溶解した精製マイオスタチン 2.5 mg/mL に対してモル比で 2 当量のペプチド **1** を添加し、ハンギングドロップ法にて結晶を作製した。得られた結晶 165 種のうち 69 種に関して X 線回折データを取得したが、ペプチドとの共結晶であるものは得られなかった。尚、ペプチドが結合していないマイオスタチン結晶として、2.4 Å の分解能で回折データが得られ、既報のヒトマイオスタチン前駆体タンパク質複合体の結晶構造 (PDB: 5NTU) の空間群 (C121) [10] とは異なる結晶 (空間群 : P6122) が得られていることが明らかとなった。

考 察

詳細な構造解析は未実施であるが、ペプチド存在下で得られた結晶の空間群が、既報のヒトマイオスタチン不活性化複合体の結晶構造のものとは異なる知見は、ペプチドがプロドメインタンパク質とは異なるマイオスタチン構造変化をもたらしている可能性を暗に示すものであると考えている。今後は、マイオスタチン結晶に対してペプチドをソーキング可能な条件を探索するなど検討したい。一方で、我々が保有する SAR の知見 [7] と得られている結晶構造を基盤に、統合計算化学システム MOE (Molecular Operating Environment) を用いた結合様式の予測を図っていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、高エネルギー加速器研究機構構造生物学研究センターの湯本史明准教授である。また本研究遂行にあたり多大なるご支援を賜りました、高エネルギー加速器研究機構構造生物学研究センターの千田俊哉教授、桑原直之研究員 (現所属 : ペプチドリーム株式会社)、当研究室の林良雄教授、Cédric Rentier 博士 (現所属 : バイオオージ・ジャパン株式会社)、濱田圭佑博士 (現所属 : 東京薬科大学薬学部病態生化学教室・助教) に深謝したい。

文 献

- 1) McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*. 1997 May 1;387(6628):83-90. PMID: 9139826 DOI: 10.1038/387083a0
- 2) Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittmore LA, Ahima RS, Khurans TS. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*. 2002 Nov 28;420(6914):418-21. PMID: 12459784 DOI: 10.1038/nature01154
- 3) Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ. Induction of cachexia in mice by systemically administrated myostatin. *Science*. 2002 May 24;296(5572):1486-8. PMID: 12029139 DOI: 10.1126/science.1069525
- 4) Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Scott Simonet W, Lacey DL, Goldberg AL, Han HQ. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell*. 2010 Aug 20;142(4):531-43. PMID: 20723755 DOI: 10.1016/j.cell.2010.07.011.
- 5) Jiang MS, Liang L, Wang S, Ratovitski T, Holmstrom J, Barker C, Stotish R. Characterization and identification of the inhibitory domain of GDF-8 propeptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Mar 12;315(3):525-31. PMID: 14975732 DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.01.085

- 6) Takayama K, Noguchi Y, Aoki S, Takayama S, Yoshida M, Asari T, Yakushiji F, Nishimatsu S, Ohsawa Y, Itoh F, Negishi Y, Sunada Y, Hayashi Y. Identification of the minimum peptide from mouse myostatin prodomain for human myostatin inhibition. *J Med Chem*. 2015 Feb 12;58(3):1544-9. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25569186 DOI: 10.1021/jm501170d.
- 7) Asari T, Takayama K, Nakamura A, Shimada T, Taguchi A, Hayashi Y. Structural basis for the effective myostatin inhibition of the mouse myostatin prodomain-derived minimum peptide. *ACS Med Chem Lett*. 2016 Nov 23;8(1):113-117. eCollection 2017 Jan 12. PMID: 28105285 DOI: 10.1021/acsmchemlett.6b00420.
- 8) Takayama K, Nakamura A, Rentier C, Mino Y, Asari T, Saga Y, Taguchi A, Yakushiji F, Hayashi Y. Effect of N-terminal acylation on the activity of myostatin inhibitory peptides. *ChemMedChem*. 2016 Apr 19;11(8):845-9. Epub 2016 Mar 8. PMID: 26954624 DOI: 10.1002/cmdc.201500533.
- 9) Takayama K, Rentier C, Asari T, Nakamura A, Saga Y, Shimada T, Nirasawa K, Sasaki E, Muguruma K, Taguchi A, Taniguchi A, Negishi Y, Hayashi Y. Development of potent myostatin inhibitory peptides through hydrophobic residue-directed structural modification. *ACS Med Chem Lett*. 2017 Jun 6;8(7):751-756. eCollection 2017 Jul 13. PMID: 28740611 DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00168.
- 10) Cotton TR, Fischer G, Wang X, McCoy JC, Czepnik M, Thompson TB, Hyvönen M. Structure of the human myostatin precursor and determinants of growth factor latency. *EMBO J*. 2018 Feb 1;37(3):367-383. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29330193 DOI: 10.15252/embj.201797883.