

**【目的】** マイオスタチンは TGF- $\beta$  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ことから、筋萎縮性疾患治療の標的分子として注目されている。我々は、種を越えて共通の内因性マイオスタチン阻害分子として知られるマイオスタチンプロドメインタンパク質の作用機構に着目し、「マウス」由来プロドメイン配列からマイオスタチンを効果的に阻害しうる比較的小さなペプチド **1** (23 残基) の創製に世界で初めて成功している。しかし、ペプチド **1** に相当する「ヒト」由来配列を用いた 23 残基ペプチドでは阻害活性が顕著に弱いことから、阻害ペプチドの作用機構は、由来するプロドメインタンパク質の相互作用メカニズムとは異なることが示唆された。一方で、構造活性相関研究により高い阻害活性を示すペプチド **2** の創製にも至っている。そこで、本研究では、マイオスタチンとその阻害ペプチドとの共結晶を作製し、X 線結晶構造解析によってマウス由来ペプチドの詳細な結合様式および高い阻害活性に寄与する分子機構を解明することを目的に検討を行った。

**【方法】** ペプチドは全て Fmoc 固相合成法により合成した。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。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成熟マイオスタチンを大量調製した。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。見出した結晶化条件を精査し最適化することで、構造解析に適用可能な結晶を獲得し、X 線結晶構造解析を実施した。

**【結果】** 本研究では、まず結晶化に用いるマイオスタチンタンパク質の大量調製法の検討を行った。はじめに、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、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。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、純度の高いマイオスタチンタンパク質を獲得する大量調製法を確立することに成功した。次に、大規模自動結晶化システムを利用し、ペプチド **1** 存在下で結晶化が可能な溶媒条件として、2-メチル-2,4-ペンタンジオール (MPD) を添加剤として用いる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に絞り込んだ。得られた結晶 165 種中 69 種の X 線回折データを取得したが、いずれもペプチドとの共結晶ではないことが判明した。今後は、ソーキングなどの手法によりペプチドとの共結晶獲得を検討したい。

「マウス」由来マイオスタチン阻害ペプチド **1** と高活性誘導体 **2** および「ヒト」由来ペプチドの配列

ヒト由来ペプチド (21-43位, 23aa)

WRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRL-amide  $IC_{50} > 10 \mu M$

↑ マウス配列と2残基のみ異なる

マウス由来ペプチド1 (21-43位, 23aa)

WRQNTRYSSRIEAIKIQILSKLRL-amide  $IC_{50} = 3.52 \mu M$

↑ げっ歯類に特徴的(合成ペプチドにおける阻害活性発現に重要)

高活性化ペプチド2

XRQNTRYSRIEWIKIQIISKLRL-amide  $IC_{50} = 0.32 \mu M$

(X = 2-naphthoxyacetyl)