| 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 |
|---|---|

**【目的】**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 μM

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）

WRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-amide　$IC_{50}$ = 3.52 μM

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 μM

（X = 2-naphthyloxyacetyl）

# 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］、デコ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、自身の前駆体に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 μM）を示す最小活性構造単位として 23 残基のペプチド **1**（WRQNTRYSRIEAIKIQILSKLRL-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 μM）［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発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。

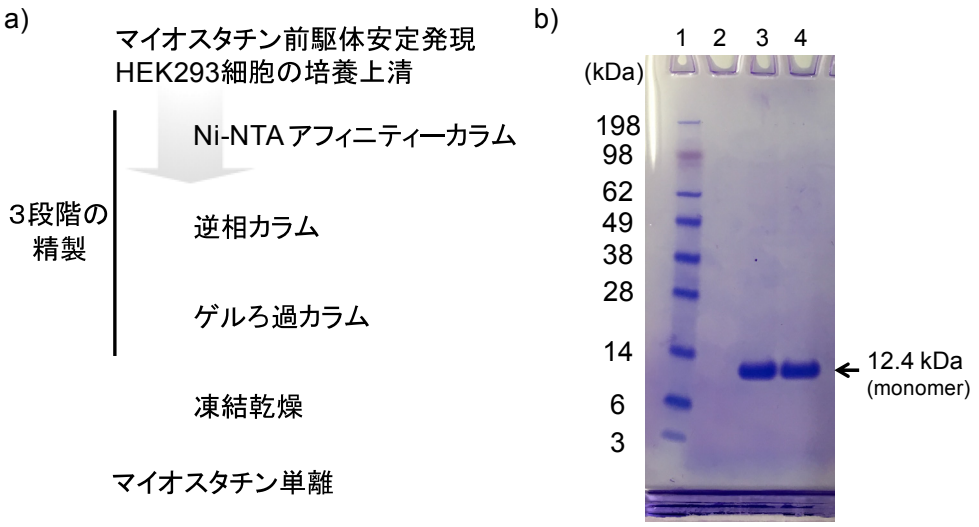



図 1. マイオスタチンの大量調製法の概略（a）と精製マイオスタチンの SDS-PAGE（b）

a) 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

b) Lane 1 : marker、lane 2 : none、lanes 3 and 4 : purified myostatin（10 μg and 5 μg、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 $AmPO_4$；結晶化溶媒2：0.1 M Tris buffer pH 8.4、35% MPD、0.2 M $AmSO_4$；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、2.4Å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：バイオタージ・ジャパン株式会社）、濵田圭佑博士（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, Whittemore 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/acsmedchemlett.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/acsmedchemlett.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.