

マイクロ抗体：立体構造規制ペプチド・ライブラリーを用いた分子標的化合物の創出

藤井 郁雄

Beyond Antibodies: Generation of Conformationally Constrained Peptides for Molecular-Targeting Therapy

Ikuo FUJII

*Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University,
1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8570, Japan*

(Received June 17, 2009)

At present, antibodies are indisputably the most successful reagents in molecular targeting therapy. However, use of antibodies has been limited due to the biophysical properties and the cost to manufacture. To enable new applications where antibodies show some limitations, we have developed an alternative-binding molecule with non-immunoglobulin domain. The molecule is a helix-loop-helix peptide, which is stable against natural enzymes *in vivo* and is small size to be non-immunogenic. We refer it as “MicroAntibody”. The peptide is composed of three structural regions, N-terminal α -helix, C-terminal α -helix, and flexible connecting loop. In both helical regions, uncharged leucine residues were incorporated into the heptad repeat positions to dimerize the α -helices by hydrophobic interactions. Since the peptide folds by virtue of the interactions between the amino acid residues positioned inside the helix-loop-helix, the solvent-exposed, outside residues were randomized to give a library of MicroAntibodies. Here, we report the construction of the phage-displayed library and the screening of MicroAntibodies binding to cytokine receptors.

Key words—antibody; peptide; directed evolution; phage-displayed library; molecular targeting therapy; cytokine receptor

1. はじめに

21世紀に入るとともにヒトの遺伝子構造の全容が明らかにされた。現在、ゲノムから翻訳されるタンパク質の網羅的な解析が進められて、医薬品のターゲットとなるタンパク質の種類も数も劇的に増えている。このような急速なプロテオーム解析研究に伴って、分子標的医薬の第一候補として注目されているのが抗体医薬である。免疫システムの持つ抗体の多様性を利用すれば、標的タンパク質に特異的に結合する分子標的医薬を意のままに作製することができる。また、抗体のタンパク質工学も急速に進歩してきている。15年前までは、抗原の免疫が唯一の抗体作製法であったが、今では、組換え抗体タンパク質のファージ表面提示ライブラリー法より免疫をすることなく目的とした抗体を取得することが

できる。

一方、抗体医薬の研究が進むにつれ、その限界も明らかにされてきている。抗体医薬には、以下のような問題点が指摘されている。1) ヒトに対する抗原性を下げるため、ヒト化等が必要である。2) 抗体は、多数のジスルフィド結合を含む巨大タンパク質であるため、細胞内に導入したり、細胞内で機能させたりすることができず、細胞内のタンパク質をターゲットとすることができない。3) 現在の抗体医薬はそのほとんどがモノクローナル抗体であるために生産に膨大なコストを必要とする。さらに、4) 抗体医薬の開発や生産には、特許の制限が複雑に絡み合っている。これらの問題点は、抗体の基本構造に起因するものである。そこで、イムノグロブリン構造を利用せず、目的の標的タンパク質に対して特異的に結合する抗体様物質の開発研究が始まっている。¹⁻⁴⁾ 筆者らは、抗体様物質としてヘリックス・ループ・ヘリックス構造を持つ分子標的ペプチドの開発を行っている。このようなペプチドは、強固な立体構造を持つため生体内においても安定であり、

大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻生体分子科学分野 (〒599-8570 大阪府堺市中央区学園町 1-1)
e-mail: fujii@b.s.osakafu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウム S05 で発表したものを中心に記述したものである。

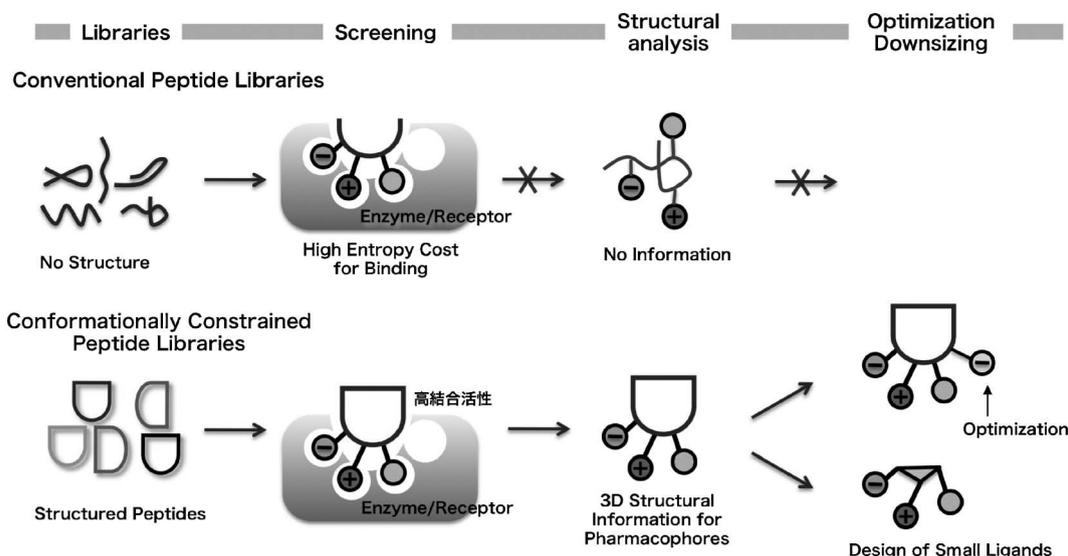


Fig. 1. The Advantages of Conformationally Constrained Peptide Libraries

また低分子量（分子量：3000–5000）であることから「マイクロ抗体」と名付けた。本稿では、マイクロ抗体の分子設計及びファージ表面提示ライブラリー法による作製法について紹介する。

2. 立体構造モチーフ・ペプチド・ライブラリー

近年、コンビナトリアル・ライブラリーを用いるリード化合物探索法が、医薬品開発の有用な方法になってきている。⁵⁾しかし、従来のペプチド・ライブラリーでは、個々のペプチドがフレキシブルな構造を持つため、エントロピーの損失が大きく高い結合活性や生物活性を期待するのが難しい (Fig. 1)。

また、フレキシブルなペプチドからはファーマコファアの3次元情報が得られず、低分子化合物の分子設計につながらない。そこで、このような問題点を解決するために、立体構造を持つペプチド・ライブラリーを作製するための方法論を開発した。これにより、高い生理活性ペプチドを見い出すと同時に、低分子化するための3次元構造情報を得ることが可能になる。

3. マイクロ抗体（ヘリックス・ループ・ヘリックス構造ペプチド）の分子設計

マイクロ抗体の土台分子としてヘリックス・ループ・ヘリックス構造ペプチド(1)を設計した (Fig. 2)。⁶⁾このペプチドは3つの領域で構成される (①14アミノ酸残基からなる構造支持領域, ②グリシン7残基からなるループ, ③同じく14アミノ酸残基からなるライブラリー領域)。2つのヘリックス

は、内側に存在する Leu 基 (Leu³, Leu⁶, Leu¹⁰, Leu¹², Leu²³, Leu²⁶, Leu³⁰, Leu³³) の疎水相互作用及び側面の Glu 基 (Glu², Glu⁹) と Lys 基 (Lys²², Lys²⁹) の静電相互作用により寄り添い、安定なヘリックス・ループ・ヘリックス構造を形成する。一方、ヘリックス外側のアミノ酸は立体構造構築に係わっていない。したがって、外側のアミノ酸 (X²⁴, X²⁵, X²⁸, X³¹, X³²) を様々なアミノ酸に置換することにより、マイクロ抗体の分子ライブラリーを構築することができる。

マイクロ抗体ライブラリーの立体構造を確認するために、C末端ヘリックス外側の3カ所 (X²⁵, X²⁸, X³²) を性質の異なる5種類のアミノ酸 (Ala, Arg, Asp, Thr, Tyr) でランダムに変異させた125種 (5³) のペプチド混合物を合成した。⁷⁾その際、N末端ヘリックスに His を2カ所 (*i*, *i*+4) に導入し、Ni²⁺-固定化金属アフィニティークロマトグラフィー



藤井郁雄

大阪府立大学大学院理学系研究科・教授。1986年九州大学院薬学研究科博士課程修了。薬学博士。1986年九州大学薬学部助手。1988年ロックフェラー大学(米国)博士研究員。1989年–1991年スクリプス研究所(米国)にて、博士研究員として触媒抗体の開発に従事。1991年–2003年タンパク工学研究所及び生物分子工学研究所にて抗体工学に従事。2003年4月より現職。現在の研究テーマ：「進化分子工学を基盤とする新規生体機能分子の設計と創出」。

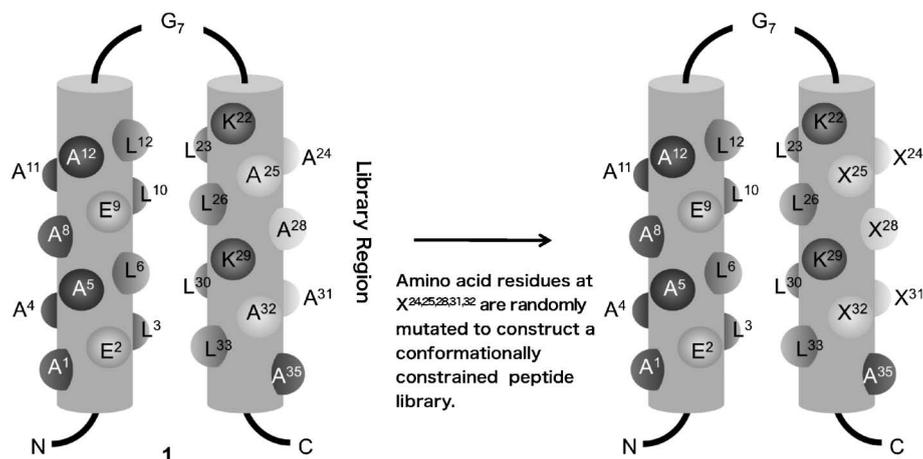


Fig. 2. Molecular Design of a Library of “MicroAntibodies” (Helix-Loop-Helix Peptides)

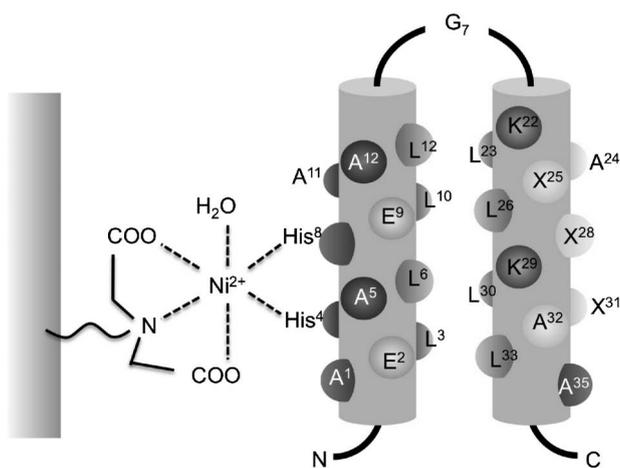


Fig. 3. Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) of the Peptide Libraries

(IMAC) により、ペプチドの立体構造を評価した (Fig. 3)。すなわち、ペプチドがヘリックス・ループ・ヘリックス構造の場合、N末端ヘリックスの2つの His 側鎖 (His⁴, His⁸) は同じ方向に固定されるため、Ni²⁺ イオンに強く結合しペプチドがアフィニティークラム内にトラップされる。一方、ペプチドがランダムな構造の場合、Ni²⁺ イオンへの結合が弱くカラムから簡単に溶出する。そこで、125種のペプチド混合物について Ni²⁺-固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) の挙動を調べたところ、80%以上のペプチドがカラムにトラップされ、溶出するためには酸性バッファー (20 mM phosphate, 1.0 M NaCl, pH 4.0) を要した。このことより、C末端ヘリックス側面のアミノ酸を様々なアミノ酸に置換しても、マイクロ抗体がヘリッ

クス・ループ・ヘリックス構造を持つことを確認した。

4. ファージ表面提示マイクロ抗体ライブラリーの構築

上記の結果から、マイクロ抗体をライブラリー化できることが確認できたので、次に、ファージ表面提示ライブラリーの構築を検討した。ファージ表面提示ライブラリー法は、進化分子工学の主要技術の1つで、特にヒト抗体の作製や抗体親和性の改良に汎用されている。⁸⁾ これまでに筆者らは、ファージ表面提示抗体ライブラリーを使って、抗体酵素の機能改変に成功している。^{9,10)} そこで、抗体と同様に、マイクロ抗体にもファージ表面提示ライブラリー法を適用し、分子標的マイクロ抗体のスクリーニングに利用することにした。

ヘリックス・ループ・ヘリックス構造ペプチドのC末端ヘリックス外側に存在するアミノ酸5残基 (X部分) をランダム化したペプチドをファージ・表面タンパク質上に提示させ、マイクロ抗体・ライブラリーを作製した (Fig. 4)。ファージ表面提示には、主に2つのコートタンパク質 (gpIII 及び gpVIII) が利用されている。そこで、マイクロ抗体を gpVIII コートタンパク質との融合タンパク質として表面提示させた。合成ランダムプライマーを用いて PCR を行い、DNA ライブラリーを作製した。これをファージミド pComVIII に導入し、大腸菌に形質転換してファージ表面提示ライブラリーを作製した (ライブラリーサイズ: 1.5×10^6)。

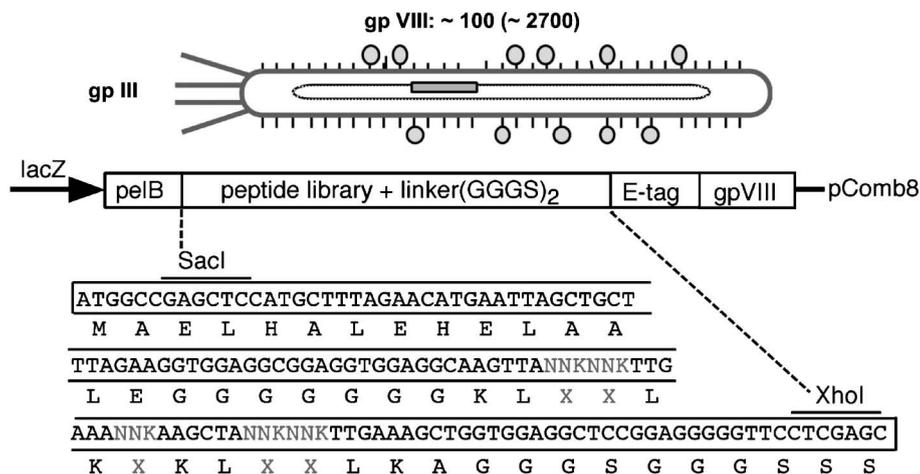


Fig. 4. Construction of a Phage-displayed Library of MicroAntibodies

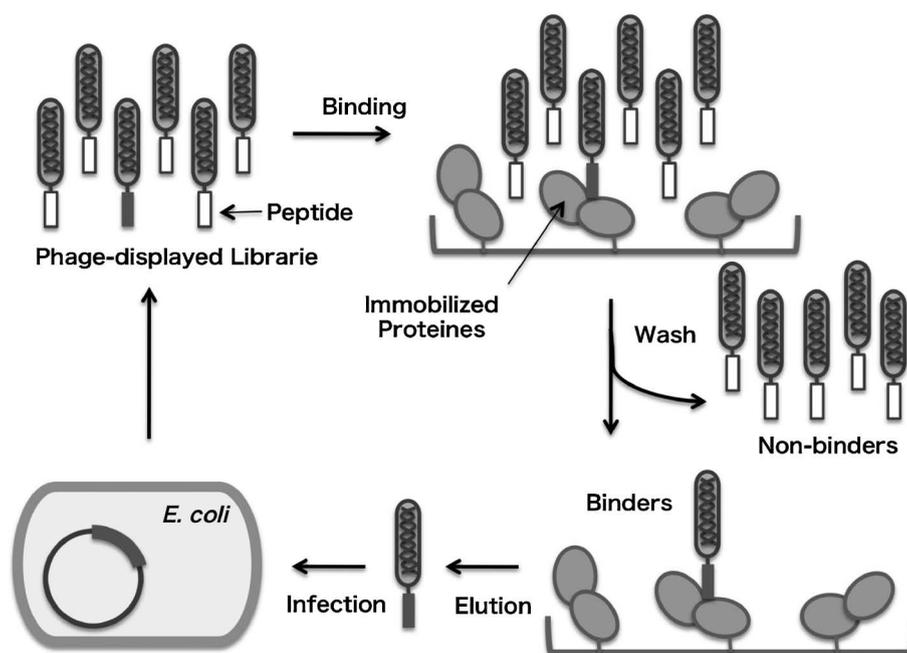


Fig. 5. Screening of a Phage-displayed Library by Biopanning

5. G-CSF 受容体に対するマイクロ抗体のスクリーニング

本ファージ・ライブラリーをマウス顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 受容体に対してスクリーニングした。G-CSF は白血球の 1 種である好中球の分化・増殖を誘導する糖タンパク質 (分子量約 1.8-2.2 万) で、骨髄移植時の好中球の増加促進剤や抗ガン剤の副作用である好中球減少症の治療薬として使用されている。

ファージ・ライブラリーを、固定化した G-CSF 受容体と反応させ、結合しないファージは洗い出し

て、結合するファージを選択し回収した (Fig. 5)。最終的に、5 回パンニング後、G-CSF 受容体結合性ペプチド (マイクロ抗体) の単離に成功した。

得られた受容体結合性ペプチドと天然 G-CSF との間にはアミノ酸配列の相同性はない。しかし、ペプチドが α -ヘリックス構造を持っているため、その立体構造を指標にして天然 G-CSF と重ね合わせが可能になる。既に解析されている G-CSF 受容体の X-線構造を検討したところ、ペプチド C 末端ヘリックスと天然 G-CSF の A-ヘリックスに相同性が観測されるとともに、Ala³⁵ の Arg 残基への置換が

結合活性を向上させることが示唆された。以上のことを考慮して結合性ペプチドの最適化を行い、高い結合活性 ($K_d=214$ nM) を持つマイクロ抗体 (P8-2KA) の取得に成功した。

6. マイクロ抗体の安定性

生体内におけるマイクロ抗体の安定性を獲得するために、N末端とC末端との間にジスルフィド結合を導入した。上記の顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 受容体結合性マイクロ抗体 (P8-2KA) にジスルフィド結合を導入し、安定なヘリックス構造を持つマイクロ抗体 (P8-2KA-S) を合成した。本ペプチドは、高い結合活性 ($K_d=8$ nM) を示すとともに、G-CSF による細胞増殖実験において、強い阻害活性を示した ($IC_{50}=33$ nM)。一方、P8-2KA は、同じアミノ酸配列を持つにもかかわらず、阻害活性が低い ($IC_{50}=8.3$ μ M)。すなわち、P8-2KA-S は、安定な立体構造を持ったため、酵素分解に対する抵抗性を獲得したものと推測された。そこで、マウス血清中での安定性を検討したところ、ペプチド (P8-2KA) が 10 時間でほぼ完全に分解させるのに対し、ペプチド (P8-2KA-S) は 20 時間後でも分解されない (Fig. 6)。以上の結果から、マイクロ抗体は、抗体と同等の結合活性と安定性を示し、分子標的医薬やタンパク質相互作用検証ツールとして十分利用できることが判明した。

7. ゲノム創薬の新技术

この数年来、リード化合物探索のために、標的タンパク質の立体構造を基にした医薬品設計 (SBDD) やコンビナトリアル・ケミストリー (コンビケム CC & HTS) に膨大な研究資金が投入されている。筆者らは、これまで抗体工学で培ったファージ表層ディスプレイ技術^{1,2)}とペプチド構造構築理論を組み合わせるにより、マイクロ抗体ライブラリーを利用した新しい医薬品設計法を提案する (Fig. 7)。すなわち、Fig. 8 に示すように、1) マイクロ抗体の分子ライブラリーを構築し、2) これをファージ表層に提示することにより、標的タンパク質に作用するマイクロ抗体を効率よくスクリーニングする。このライブラリーから得られるマイクロ抗体は、強固な立体構造を持っているのでファーマコフォアとその空間配置を容易に決定することができる。3) この立体構造情報を基に低分子の土台分子をバーチャルスクリーニングし、これにファーマコフ

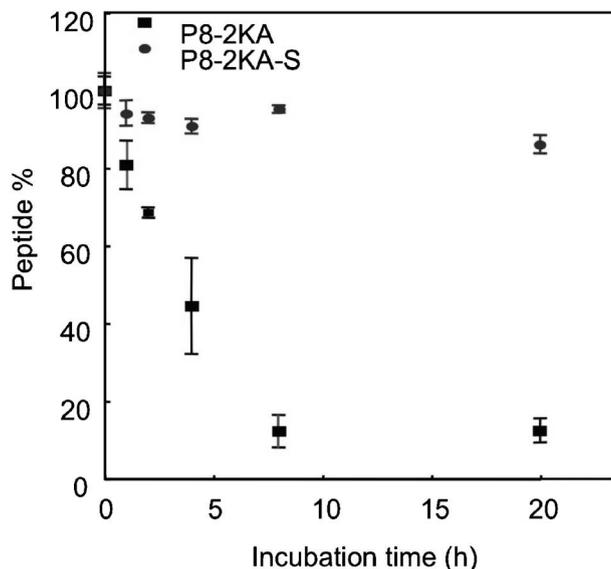


Fig. 6. Stability of MicroAntibodies in Mouse Sera

ォア分子を導入してヒット化合物を設計する。本法では、手間のかかる標的タンパク質の立体構造解析や高価な低分子ライブラリーを必要としないので、迅速かつ低コストのリード化合物探索が達成される。

8. タンパク質から低分子リガンドへ

先の実験より得られた G-CSF 受容体結合性マイクロ抗体のファーマコフォア情報を基にして、G-CSF 受容体リガンドの分子設計を試みた。受容体結合に重要なアミノ酸 (Leu, Lys, Glu) 及び X 線との重ね合わせから示唆された Gln の α 及び β 炭素の空間位置と方向を指標として、低分子データベースを検索したところ、土台分子としてスルホンアミド化合物が導き出された (Fig. 9)。本化合物を土台にして、これにアミノ酸側鎖に対応する官能基を導入した化合物を合成し、受容体結合性の低分子リガンドを獲得した。

これまでにも、生理活性ペプチドからペプチドミミックの分子設計が行われてきている。研究者がまずすることは、その活性コンフォメーションの予測である。その後、部位特異的変異実験等を行い、活性残基を予測し、ペプチドミミックの分子設計をすることになる。そこで、われわれは、生理活性ペプチドを検索する際に、マイクロ抗体・ライブラリーを利用することを提案する。標的タンパク質に結合するマイクロ抗体は、活性残基及びその 3 次元空間配置の情報を与え、その情報を基にペプチドミミックの分子設計をすることができる。

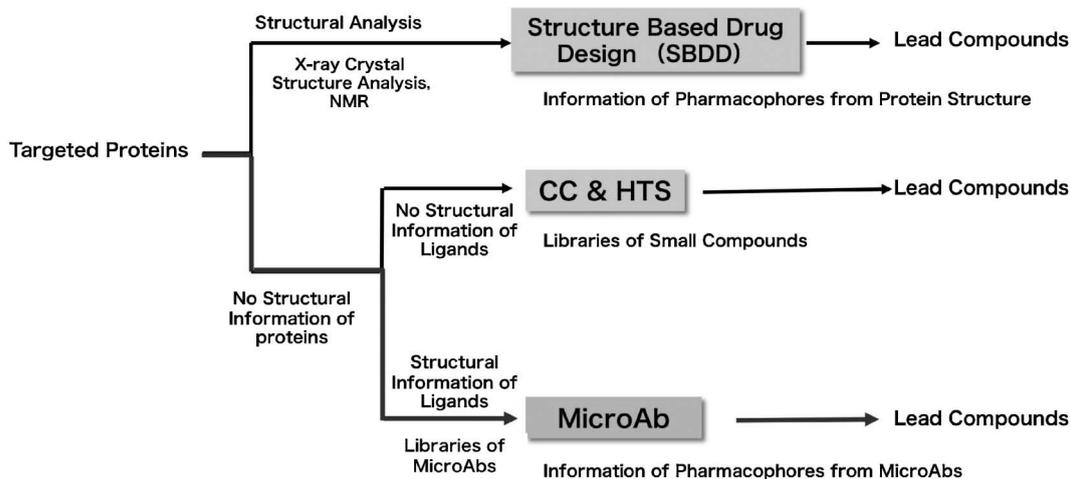


Fig. 7. Drug Design for Molecular-targeting Therapy

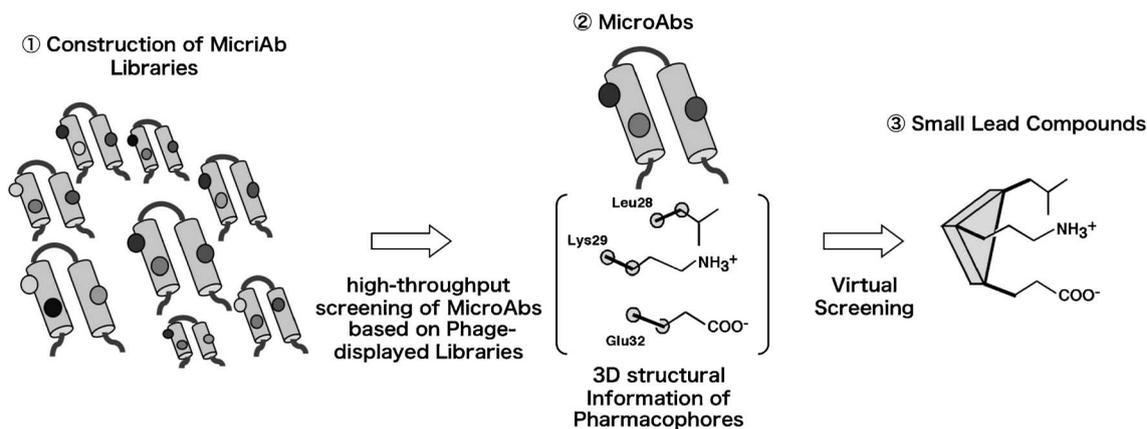


Fig. 8. A Novel Drug design Based on Phage-displayed Peptide Libraries

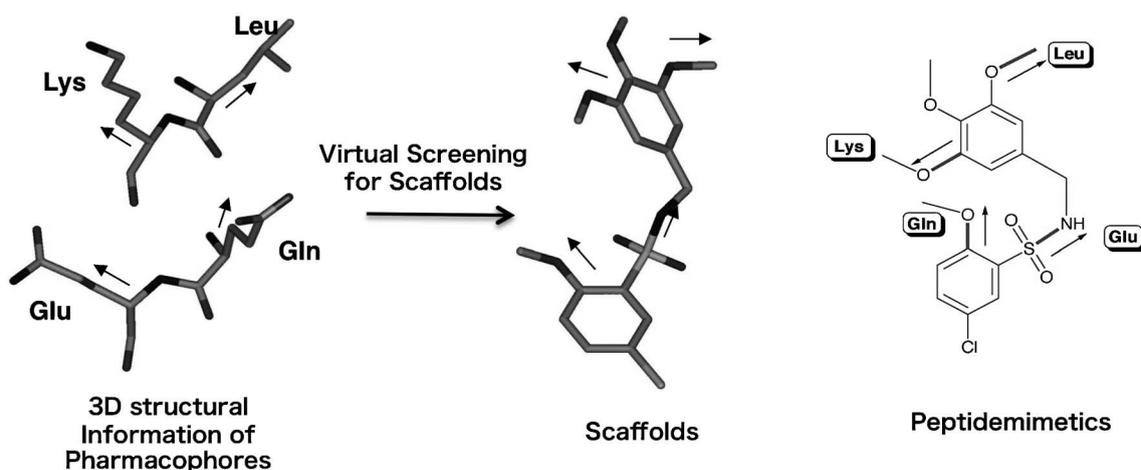


Fig. 9. Molecular Design of Small Ligands for G-CSF Receptor

9. おわりに

医薬品開発における最終ゴールは、生体内での有効性である。理想的には、標的タンパク質に対して

高い薬理活性を持ち、かつ副作用のないもので、さらには、経口でのバイオアベイラビリティのよいものが求められる。どのような化合物が医薬品とし

て適しているのかを判定するために、既存の医薬品（約 5000 化合物）の性質が調べられている。多くの医薬品が分子量 500 以下で、極端に疎水性や親水性の高い化合物は医薬品として適していない。残念ながら、タンパク質-タンパク質相互作用を阻害する医薬品はほとんどない。

従来、低分子医薬品の開発は、酵素阻害剤や神経伝達物質類似化合物をターゲットとしてきたが、それには明白な設計戦略がある。すなわち、酵素阻害剤開発の場合、基質の構造から低分子阻害剤設計の有用な情報を得ることができる。神経伝達物質の場合も同じである。しかし、このような設計戦略は、タンパク質-タンパク質相互作用の阻害剤の設計には使えない。この場合、相互作用に重要な接触部位やアミノ酸残基を知るためには、膨大な数の部位変異操作や時間のかかるタンパク質の構造解析が要求される。さらに、たとえ相互作用の接触部位の立体構造がわかったとしても、その情報から低分子化合物を設計するための信頼できる方法論がないのが現状である。筆者らは、解決策の 1 つとして、ペプチドの立体構造構築理論とファージ表層ディスプレイ法（分子進化工学的手法）を組み合わせた新しいゲノム創薬手法を提案した。もちろんマイクロ抗体自身が医薬品候補であるが、さらに低分子医薬品の開発にもつながる。本法が、タンパク質-タンパク質

相互作用をターゲットにした次世代抗体医薬や低分子リガンド開発の一助になれば幸いである。

REFERENCES

- 1) Binz H. K., Amstutz P., Plückthum A., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1257–1268 (2005).
- 2) Koide A., Gilbreth R. N., Esaki K., Tereshko V., Koide S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6632–6637 (2007).
- 3) Lendel C., Dogan J., Hard T., *J. Mol. Biol.*, **359**, 1293–1304 (2006).
- 4) Binz H. K., Amstutz P., Kohl A., Stumpp M. T., Briand C., Forrer P., Grütter M. G., Plückthum A., *Nat. Biotechnol.*, **22**, 575–582 (2004).
- 5) Smith G. P., *Science*, **228**, 1315–1317 (1985).
- 6) Suzuki N., Fujii I., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 6013–6017 (1999).
- 7) Fujii I., Takaoka Y., Suzuki K., Tanaka T., *Tetrahedron Lett.*, **42**, 3323–3325 (2001).
- 8) “Handbook of Therapeutic Antibodies,” ed. by Dübel S., Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- 9) Fujii I., Fukuyama S., Iwabuchi Y., Tanimura R., *Nat. Biotechnol.*, **16**, 463–467 (1998).
- 10) Takahashi N., Kakinuma H., Liu L., Nishi Y., Fujii I., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 563–567 (2001).