In Vitro Selected Macrocyclic Peptides: Tools for Regulating the Conformational Freedom of Transmembrane Proteins

Christopher John Hipolito,^{*,†} 西尾 洸 祐, 菅 裕 明

Christopher John Hipolito,^{*,†} Kosuke Nishio, and Hiroaki Suga
Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo;
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

(Received August 11, 2015)

Membrane proteins allow a cell to communicate with its environment by relaying a signal or transporting a molecule through the cell membrane. Elucidation of the three-dimensional structure of a membrane protein provides a greater understanding of its function and mechanisms. Ultimately, this knowledge will enlighten researchers on how these proteins can be regulated to elicit a desired cellular response, which could lead to novel therapeutic medicine. Unfortunately, the determination of the high-resolution crystal structures of transmembrane proteins remains a challenge due to their poor solubility and high conformational flexibility. Additives and cocrystallization ligands are being used to address these problems. *In vitro* selected macrocyclic peptides have recently been successfully employed as cocrystallization ligands. Although originally intended as inhibitors and drug lead molecules, *in vitro* selected macrocyclic peptides are now showing that their pharmacodynamic properties also allow them to serve as excellent cocrystallization ligands. Structures for macrocyclic peptide-bound transporters, the multidrug and toxic compound extrusion family transporter from *Pyrococcus furiosus* (PfMATE) and the ABC transporter subfamily B member 1 from *Cyanidioschyzon meraloe* (CmABCB1), have been elucidated using X-ray crystallography. The cocrystal structures reveal that the macrocyclic peptides improve crystallization by binding in a similar manner as a small molecule or a biologic. The PfMATE-binding macrocyclic peptides MaD3S and MaD5 bind to the surfaces buried in the center channel of the transporters. Although both transporters possess a center channel and substrate-binding pocket, the CmABCB1-binding macrocyclic peptide, aCAP, binds to the outer surface of the transporter in a similar manner to a biologic.

Key words—macrocyclic peptide; *in vitro* selection; cocrystallization

1. 擬天然ペプチドの試験管内選択

天然物ペプチドはしばしば、その生理学的性質向上のため特徴的な構造を有する。これらの天然物ペプチドは、リボソームによる翻訳か非リボソーム系ペプチド合成酵素 (non-ribosomal peptide synthetases; NRPS) のどちらかで合成される。NRPSの場合、1つのNRPSは一種類のペプチドの遺伝子情報しか有さない。注目すべき天然物大環状ペプチドの1つ、サイクロスポリンは、1.6 MDaのNRPSによって合成される。サイクロスポリンは、大環状骨格、非タンパク質性アミノ酸、主鎖アミド

結合のN-メチル化といった構造を有する。大環状骨格は、ペプチドを活性型の構造に固定化することでその活性を向上させる。また、非タンパク質性アミノ酸やアミド結合のN-メチル化は可能な水素結合の数を減らし、細胞膜透過性向上に寄与する。そのため、このような特徴的な構造はドラッグスクリーニングのためのペプチドライブラリの生化学的な構築で非常に重要である。カスタム特殊ペプチド合成のためには、NRPSを構成する一連の酵素群をカスタム改変やドメイン交換する必要があるが、現状では酵素活性の低下等の技術的な限界があり、様々なカスタム特殊ペプチドの生産はいまだ達成されていない。したがって、NRPSの改変やドメイン交換による特殊ペプチドライブラリ構築への応用には、まだ多くの時間と技術的な進歩を必要するのが現状である。

標準的な翻訳系では、ペプチドの配列情報は、合

東京大学大学院理学系研究科化学専攻 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

現所属：筑波大学医学医療系生命医科学域癌シグナリング (〒305-8075 茨城県つくば市天王台 1-1-1)

*e-mail: hipolito@md.tsukuba.ac.jp

本総説は、日本薬学会第135年会シンポジウムS37で発表した内容を中心に記述したものである。

成産物であるペプチドとは直接結合していない mRNA に記録されており交換可能である。1つのリボソームは多種多様な配列、長さの標準ペプチドを作り出すことができ、ペプチドの多様性は mRNA のみにより制限される。標準的な翻訳系により縮重したペプチドライブラリを構築することが可能だが、それらのペプチドはタンパク質性の 20 種類のアミノ酸からなる直鎖状のペプチドであることに留意しなければならない。それらのペプチドの多くは、ジスルフィド結合を分子内に有することで全体構造の自由度を制限し、一定の構造に安定しているが、ジスルフィド結合は例えば腫瘍細胞内など生体内環境下で還元され易い。このような次第ではあるが、翻訳系に少し手を加えることで、薬剤シーズ探索としての魅力的な大環状ペプチドライブラリを構築する方法が提唱されている。¹⁾

菅らは、大環状骨格を有する特殊ペプチドを合成する基盤技術を開発した。²⁾ 標準的な翻訳系を改変することで、彼らはコドン表の一部をタンパク質性アミノ酸から非タンパク質性アミノ酸に割り当て直すことを成し遂げた。それにより、リボソームによって合成されるペプチドに、一般的なコドン表で定義されるアミノ酸以外の新しい化学的な機能を導入することを可能にした。菅らの基盤技術の最重要点は、フレキシザイムと命名された試験管内分子進化法で獲得されたりボザイムの利用である。フレキシザイムは、化学的に活性化されたほぼどんな非タンパク質性アミノ酸もアンチコドンによらずどんな tRNA へ付加することができる。再構成翻訳系では、特定のコドンに関連する天然の構成成分を除き、そのコドンに対応するアンチコドンの tRNA に非タンパク質性アミノ酸を付加したものを加えカスタムした翻訳系を構成できる。

アミノアシル tRNA 合成酵素 (aminoacyl-tRNA synthetase; ARS) と比べフレキシザイムでの tRNA のアミノアシル化では、内因性アミノ酸のコタミネーションやアミノアシル化されるアミノ酸の制限といった問題を回避できる。このコドンの再割り当ては一般的に、遺伝暗号リプログラミングと呼ばれ、³⁾ このフレキシザイムによる遺伝暗号リプログラミングを施した再構成翻訳系は、flexible *in vitro* translation (FIT) システムと呼ばれる。⁴⁾ FIT システムは、ペプチドの大環状化のための官能基を

翻訳ペプチド合成開始ステップをリプログラミングするのに最もよく使用されるが、使用範囲はこの限りではない。⁵⁾

生理活性大環状ペプチドの同定には、ペプチドとそれをコードする遺伝情報を結びつける必要がある。翻訳ペプチドとそれをコードする mRNA を結合させる方法には、ファージディスプレイ⁶⁾やリボソームディスプレイ、⁷⁾ mRNA ディスプレイ^{8,9)}といった様々なディスプレイ法が存在する。random non-standard peptide integrated discovery (RaPID) システムは mRNA ディスプレイを用い、FIT システムによって合成されたペプチドとそれをコードする mRNA をピュロマイシンリンカーを介し結合する (Fig. 1)。²⁾ そして mRNA を結合された大環状ペプチドは、興味対象のタンパク質に対し結合力によってスクリーニングされる。しばしば、標的タンパク質に対し結合スクリーニングされた大環状ペプチドは、そのタンパク質の機能を阻害する。この RaPID システムを用いて、菅らは E6AP,¹⁰⁾ AKT2,¹¹⁾ Sirt2¹²⁾ に対する阻害剤の開発に成功している。さらに、Sirt2 とその大環状阻害ペプチド S2iL5 との共結晶構造も解かれている (Fig. 2)。¹³⁾ S2iL5 をスクリーニングする際に使われた大環状ペプチドライブラリでは、ペプチドが Sirt2 の触媒部位に結合するように、触媒機構に基づく warhead としてトリフルオロアセチルリジンを各ペプチドに含まれるようデザインされている。それに加え、S2iL5 の独特な水分子が結合した大環状ペプチド骨格が Sirt2 への結合力や選択性に重要であることが明らかとなった。様々な新規フォールディングモチーフは多様な結合を可能にし、構造生物学ではこの多様な結合様式が相互作用する膜タンパク質の結晶構造解析に利点をもたらしている。

2. 膜タンパク質の結晶化における問題点

膜タンパク質は主な創薬ターゲットであるにもかかわらず、可溶性タンパク質に比べその構造情報が不足している。この理由は、膜タンパク質は X 線結晶構造解析に必要な高品質の結晶の獲得が困難であるためである。膜タンパク質の結晶化が困難な第一の原因は、疎水性表面を多く含む膜タンパク質を可溶化するために界面活性剤を使用しなければならないことである。界面活性剤なしでは膜タンパク質は、凝集沈殿してしまう。この界面活性剤は、膜タ

Fig. 1. The RaPID System

Fig. 2. Crystal Structure of the SIRT2:S2iL5 Complex
SIRT2 is shown in cartoon representation. S2iL5 is shown in stick format.

ンパク質の膜貫通部位を囲うように可逆的なミセルを形成する。しかし、この可逆性ミセルの大きさは均一ではなく、特定の結晶形成に必要な疎水性表面を覆い隠し、結晶の形成を阻害する。抗体を用いた場合、可逆ミセル以上に親水性表面を拡張し、膜タンパク質と抗体の複合体間の相互作用を促進する。¹⁴⁾

膜タンパク質の結晶化が困難な第二の理由は、その構造自由度による。たとえあるタンパク質を精製したとしても、エントロピーの負債により構造自由

度は結晶化に不利に働く。構造が固定化された単一のタンパク質では、結晶格子を組み立てるためのエントロピーの負債がほとんどない。一方、rocker-switch 相互変換を伴うトランスポーターのような膜タンパク質は非常に構造自由度が高く、特定の構造からなる結晶格子中にそれらを組み立てるのはよりエントロピーの負債を伴い、結晶格子の構築を完全に妨げる。結晶化リガンドは、タンパク質の構造を特定のものに固定化することを補助する。これに関しては、抗体を基にした結晶化リガンドは標的タンパク質の特定の構造の結晶化において有益な手法であることが実証されている。^{15,16)} 後述の2つの研究は、RaPID システムでスクリーニングされた大環状ペプチドが結晶化リガンドとして標的タンパク質の構造を固定化し、その結晶化を容易にした好例である。

3. *Pyrococcus furiosus* 由来 multidrug and toxic compound extrusion family transporter (PfMATE) の共結晶化

濡木らは、大環状ペプチドリガンドを頻繁に用いられる阻害剤としてではなく、結晶化が困難なタンパク質の共結晶化の補助に用いることを試みた。¹⁷⁻¹⁹⁾ 彼らの挑戦的な結晶化の標的の1つとして PfMATE がある。PfMATE に対する RaPID システムによる大環状ペプチドリガンドスクリーニングの結果から、2つの主要なモチーフが同定された。

Fig. 3. PfMATE-binding Macrocyclic Peptides

A) The cocrystal structure of the PfMATE:MaL6 complex. B) The cocrystal structure of the PfMATE:MaD3S complex. The arrow indicates the location of the deeply buried MaD3S lariat-shaped peptide. PfMATE is shown in cartoon representation. MaL6 and MaD3S are shown in stick format.

Fig. 4. Crystal Structure of the CmABCB1:aCAP

The inset box shows a close-up of the interactions between CmABCB1 and aCAP. CmABCB1 is shown in cartoon representation. aCAP molecules are shown in stick format.

その両方において、PfMATEのN末端とC末端のローブ間、細胞外表面にある割れ目への結合が確認された。MaL6は1つ目のクラスのペプチドで、17残基のアミノ酸から構成される大環状ペプチドであり、 β ヘアピン型構造を有し、その半分の面でPfMATE表面の割れ目に結合しており、もう半面はタンパク質との結合に関与していない [Fig. 3 (A)]。結合していない半面はPfMATEの構造を安定化していないかもしれないが、結合に関与するペプチドのもう半面の構造に必要な不可欠なのかもしれない。とにかく、MaL6のPfMATEへの結合はおそらく、rocker-switch相互変換に関連するタンパク質の動きを制限し、結合型及び非結合型の

PfMATE高分解能結晶構造の決定を初めて可能にした。

2つ目のクラスは投げ輪構造を有する環状ペプチドで、PfMATE表面の割れ目のより深くに結合している。ペプチドMaD5とMaD3Sは基質結合ポケット内深くに結合するのに対し一方、MaD8は割れ目のほぼ中心に結合している [Fig. 3 (B)]。¹⁹⁾ Rocker-switch構造変化を妨げるのに加え、MaD5とMaD3SのPfMATEへの結合は、pH依存的にstraight-to-kinked相互変換することが知られるtransmembrane helix 1 (TM1)の構造自由度を制限する。TM1の構造自由度の発見は、P26A変異体の作製と結晶化の着想も与えた。すなわち、へ

リックス構造を崩すプロリンなしでは、TM1 はリガンドなしでも straight 型に固定化され、最高分解能 (2.1 Å) の結晶構造を与えた。投げ輪構造のペプチドの結合様式ははじめ予想できなかったが、低分子のように標的タンパク質のポケットに結合することが示された。

4. *Cyanidioschyzon meraloe* 由来 ABC transporter subfamily B member 1 (CmABCB1) の共結晶化

PfMATE に対するスクリーニングから同定された環状ペプチドは、低分子と同様に標的タンパク質のポケットに結合することができるということが示された。この知見から、小段らは *Cyanidioschyzon meraloe* 由来の P-glycoprotein ホモログ (CmABCB1) の中央チャンネルに位置する基質結合ポケットに結合し得る大環状ペプチドの探索を試みた。²⁰⁾ RaPID システムにより、CmABCB1 に結合する大環状ペプチドを同定し、そのうちの 1 つ aCAP は CmABCB1 との共結晶化に成功した (Fig. 4)。

aCAP の CmABCB1 への結合様式は、PfMATE 結合大環状ペプチドのそれとは大きく異なった。一分子の aCAP が CmABCB1 のホモダイマーと結合し、aCAP は両方のモノマーと結合していた。またさらには、aCAP は CmABCB1 の基質結合ポケットには結合していないが、膜貫通ヘリックスの細胞外部位付近に結合していた。興味深いことに、その結合様式は複数のタンパク質が相互作用し合うタンパク質間相互作用の結合様式と類似している。

aCAP は本来意図した場所に結合してはいないが、この新しい結合様式は、リガンド非結合型トランスポーターの結晶構造の分解能 2.7 Å から、大環状ペプチド結合型トランスポーターの結晶構造の分解能 2.45 Å へと結晶構造の分解能向上を助けた。一方で、aCAP は強力な ATPase 阻害剤としても働くことも分かった。CmABCB1 の結晶構造と Sav1866 の結晶構造²¹⁾から提唱されるトランスポーターの作動機序は、膜貫通ヘリックス TM1 と TM6 の細胞外末端が離れたり収束したりすることによって考えられている。²⁰⁾ 結晶構造によると、aCAP は、膜貫通ヘリックス TM2 と TM6 と水素結合を形成しており、この 2 つのヘリックスを効率的に固定化している。さらに、TM2 と TM6 によって挟ま

れた TM1 は、aCAP が結合することで結果的に固定化されてしまっている。これらの膜貫通ヘリックスの動きと ATPase 活性は密接に関連しており、特殊ペプチドはこれらの膜貫通ヘリックス部位に結合し、膜貫通ヘリックスの動きを阻害することで、ATPase の定常活性と基質刺激による活性の両方を顕著に減少させることにつながったと考えられる。

5. 展望

PfMATE と CmABCB1 の共結晶構造は、われわれに大環状ペプチドの標的タンパク質への結合様式に対する見識をもたらした。PfMATE 結合大環状ペプチドの場合、大環状ペプチドは低分子のように基質結合ポケットのくぼんだ表面に結合し、一方 CmABCB1 結合大環状ペプチドの場合、aCAP はタンパク質のようにふるまい、基質結合ポケットというよりはむしろ CmABCB1 の表面の平面に結合した。これらの知見は、RaPID システムによる大環状ペプチドリガンドのスクリーニングが、どのように低分子様リガンド若しくはタンパク質様リガンドの同定につながるかを説明している。

これまで、大環状ペプチドが標的タンパク質の特定の構造を安定化することによる共結晶化の促進のみを示してきた。しかし、RaPID システムから同定された大環状ペプチドは、一例を除き主にタンパク質間相互作用の阻害剤として利用されてきた。²²⁾ 今のところ、大環状ペプチドが結晶格子形成促進に十分な分子サイズであるという証拠はない。大環状ペプチドを利用したタンパク質との共結晶化の分野はまだ誕生したばかりであり、近い将来おそらくタンパク質の結晶を促進する大環状ペプチドはさらに生み出されるであろう。

利益相反 本稿で記述したペプチドは特許出願されており (出願番号 PCT/JP2013/070779)、ペプチドリーム株式会社 (東京) にライセンス認可されている。

REFERENCES

- 1) Passioura T., Katoh T., Goto Y., Suga H., *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 727–752 (2014).
- 2) Hipolito C. J., Suga H., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **16**, 196–203 (2012).
- 3) Forster A. C., Tan Z., Nalam M. N. L., Lin

- H., Qu H., Cornish V. W., Blacklow S. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6353–6357 (2003).
- 4) Goto Y., Katoh T., Suga H., *Nat. Protoc.*, **6**, 779–790 (2011).
- 5) Goto Y., Ohta A., Sako Y., Yamagishi Y., Murakami H., Suga H., *ACS Chem. Biol.*, **3**, 120–129 (2008).
- 6) Smith G. P., *Science*, **228**, 1315–1317 (1985).
- 7) Hanes J., Plückthun A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4937–4942 (1997).
- 8) Roberts R. W., Szostak J. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12297–12302 (1997).
- 9) Nemoto N., Miyamoto-Sato E., Husumi Y., Yanagawa H., *FEBS Lett.*, **414**, 405–408 (1997).
- 10) Yamagishi Y., Shoji I., Miyagawa S., Kawakami T., Katoh T., Goto Y., Suga H., *Chem. Biol.*, **18**, 1562–1570 (2011).
- 11) Hayashi Y., Morimoto J., Suga H., *ACS Chem. Biol.*, **7**, 607–613 (2012).
- 12) Morimoto J., Hayashi Y., Suga H., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 3423–3427 (2012).
- 13) Yamagata K., Goto Y., Nishimasu H., Morimoto J., Ishitani R., Dohmae N., Takeda N., Nagai R., Komuro I., Suga H., Nureki O., *Structure*, **22**, 345–352 (2014).
- 14) Hino T., Iwata S., Murata T., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **23**, 563–568 (2013).
- 15) Rasmussen S. G. F., Choi H. J., Fung J. J., Pardon E., Casarosa P., Chae P. S., Devree B. T., Rosenbaum D. M., Thian F. S., Kobilka T. S., Schnapp A., Konetzki I., Sunahara R. K., Gellman S. H., Pautsch A., Steyaert J., Weis W. I., Kobilka B. K., *Nature*, **469**, 175–180 (2011).
- 16) Ring A. M., Manglik A., Kruse A. C., Enos M. D., Weis W. I., Garcia K. C., Kobilka B. K., *Nature*, **502**, 575–579 (2013).
- 17) Hipolito C. J., Tanaka Y., Katoh T., Nureki O., Suga H., *Molecules*, **18**, 10514–10530 (2013).
- 18) Tanaka Y., Hipolito C. J., Maturana A. D., Ito K., Kuroda T., Higuchi T., Katoh T., Kato H. E., Hattori M., Kumazaki K., Tsukazaki T., Ishitani R., Suga H., Nureki O., *Nature*, **496**, 247–251 (2013).
- 19) Hipolito C. J., Bashiruddin N. K., Suga H., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **26**, 24–31 (2014).
- 20) Kodan A., Yamaguchi T., Nakatsu T., Sakiyama K., Hipolito C. J., Fujioka A., Hirokane R., Ikeguchi K., Watanabe B., Hiratake J., Kimura Y., Suga H., Ueda K., Kato H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 4049–4054 (2014).
- 21) Dawson R. J., Locher K. P., *Nature*, **443**, 180–185 (2006).
- 22) Ito K., Sakai K., Suzuki Y., Ozawa N., Hatta T., Natsume T., Matsumoto K., Suga H., *Nat. Commun.*, **6**, 6373 (2015).