

黄色ブドウ球菌毒素の宿主タンパク質阻害作用を応用した新規がん治療薬の創薬

名古屋市立大学大学院 薬学研究科 医療機能薬学専攻 衛生化学分野

准教授 伊藤佐生智

【背景・目的】 Staphylococcal superantigen-like (SSL) は黄色ブドウ球菌の外毒素ファミリーで SSL1~SSL14 の 14 種が存在する。私たちはこれまでに 6 種の SSL ファミリーの宿主側標的分子を見出している。このうち、SSL5 は細胞外マトリクスを分解し、がんの浸潤に関与するマトリクスメタロプロテアーゼ 9 (MMP-9) の機能を阻害し¹、SSL8 はがん組織で発現し、転移にかかわる細胞外マトリクスタンパク質テネイシン C (TNC) の機能を阻害することを見出している²。本研究ではこれらの SSL の宿主タンパク質阻害作用に着目し、SSL のと標的分子の結合・阻害にかかわる最小機能領域を特定することでがんの治療に役立つ有用な機能ペプチドを創製することを目的とする。

【方法】 SSL およびその変異タンパク質は 6xHis, HAT (histidine affinity tag) あるいはグルタチオン-s-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として大腸菌で発現させ、精製した (図 1)。MMP-9 はブタ好中球よりゼラチンセファロースを用いて精製したもの、および 6xHis あるいは GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させた組み換え体を使用した。SSL およびその変異タンパク質と標的分子との結合は、標的分子を固相化したプレートへの SSL の結合アッセイにより評価した。

【結果および考察】

① SSL5 の最小活性領域の特定

前年度私たちは SSL5 の N 末端半分の OB-fold, より詳細には SSL5 β 1-3 の 32 アミノ酸残基が MMP-9 との結合に関与していることを報告している。前年度は GST と SSL5 (25kDa), SSL5 β 1-3 (aa, kDa) の融合タンパク質を作成して解析を行ったが、結合活性が

野生型の SSL に比べ 1/7 程度まで減弱していた。私はこれが GST (26kDa, 255aa) の立体障害によるものではないかと考えた。この立体障害を低減するため、当初 GST と SSL の間にリンカー (GSSG) を挟み込んだ変異体を作成する計画であった。しかしながら並行して行っている別の研究においてこの方法では十分な活性増加が認められなかったため、よりサイズの小さいタグとして 19 アミノ酸からなる HAT (histidine affinity tag)-tag に着目し、最小機能ペプチドの HAT 融合体を作成、解析した (図 1)。その結果、HAT-SSL5 β 1-3 は等濃度において野生型 SSL5 と同程度の MMP-9 結合活性を示した (図 2A)。現在 MMP-9 のプロテアーゼ活性を測定する実験系を構築しているのででき次第、酵素活性に対する HAT-SSL5 β 1-3 の影響を検討し、動物実験を行う予定である。一方で HAT-SSL5 β 1-3 は大腸菌 200ml 培養から 100 μ g 程度しか得ることができなかった。HAT-SSL5 β 1-3 の改良 (発現系の検討、アミノ酸配列の微調整、タグの検討、C 末端に 8 アミノ酸からなる S-Tag をつけることでビオチン化なしに検出が可能になる) を行うことで収量の改善が可能であると考えられる。

② SSL5, SSL5 最小活性ペプチド (SSL5 β 1-3) の MMP-9 との相互作用の生化学的解析

SSL5 と MMP-9 の結合は、糖鎖を介する結合と糖鎖を介さない結合が存在し、糖鎖を介さない結合が酵素活性の阻害に関与していることを示している¹。しかしながら SSL5 がどのように MMP-9 の酵素活性を阻害しているのかは不明であった。MMP-9 はその活性に Zn を必要とすることから SSL5, HAT-SSL5 β 1-3 と MMP-9 の結合が金属イオンキレート剤 EDTA によって影響を受けるかを検討した。その結果両者とも 5 mM の EDTA の存在で固相化 MMP-9 との結合が弱まった (図 2B)。このことから SSL5, HAT ペプチドともに MMP-9 の活性中心に存在する Zn およびその近傍に結合している可能性が示された。また予備的検討において、SSL5 は MMP-9 の亜鉛結合ドメインに結合することを見出している。Zn と結合しない MMP-9、前駆体ペプチドのシステインを置換した恒常的活性型 MMP-9 等を作成し、SSL5 と HAT ペプチドとの相互作用を解析することで SSL5, HAT-SSL5 β 1-3 の MMP-9 阻害メカニズムを明らかにすることができると考えている。

③ SSL8 のテネイシン C 結合部位の同定

同様の方法でマトリクスタンパク質テネイシン C に結合する SSL8 の最小結合配列の特

定を試みた。以前に同定した SSL8 結合部位であるテネイシン C の FNIII リピード 4~5 の組換えタンパク質を調製し、SSL8 および SSL8 の N 末側 OB-fold と C 末側の beta-grasp との結合を固相結合アッセイにより解析したが、結合が検出できなかった。SSL 結合ビーズを用いたプルダウンアッセイでは SSL8 と組換えテネイシン C 断片の結合は検出できているので、検出系の改良 (SSL8 フラグメントの代わりにドメインスワップ体を用いる、テネイシン C を大腸菌でなく市販の精製品や、真核細胞発現プラスミドで発現させた組換え体を用いる) を行うことで、SSL5 と MMP-9, SSL10 とプロトロンビンで成功している最小結合領域の特定が可能であると考えている。

【参考文献】

- 1) Itoh, S., Hamada, E., Kamoshida, G., Takeshita, K., Oku, T., and Tsuji, T.
Staphylococcal superantigen-like protein 5 inhibits matrix metalloproteinase 9 from human neutrophils. *Infect Immun* **78**, 3298-3305, 2010.
- 2) Itoh, S., Yamaoka, N., Kamoshida, G., Takii, T., Tsuji, T., Hayashi, H., and Onozaki, K.
Staphylococcal superantigen-like protein 8 (SSL8) binds to tenascin C and inhibits tenascin C-fibronectin interaction and cell motility of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **433**, 127-132, 2013.
- 3) Itoh S., Takii T., Onozaki K., Tsuji T., Hida S.
Identification of the blood coagulation factor interacting sequences in Staphylococcal superantigen-like protein 10. *Biochem Biophys Res Commun*. *in press*, 2017.

【図表】

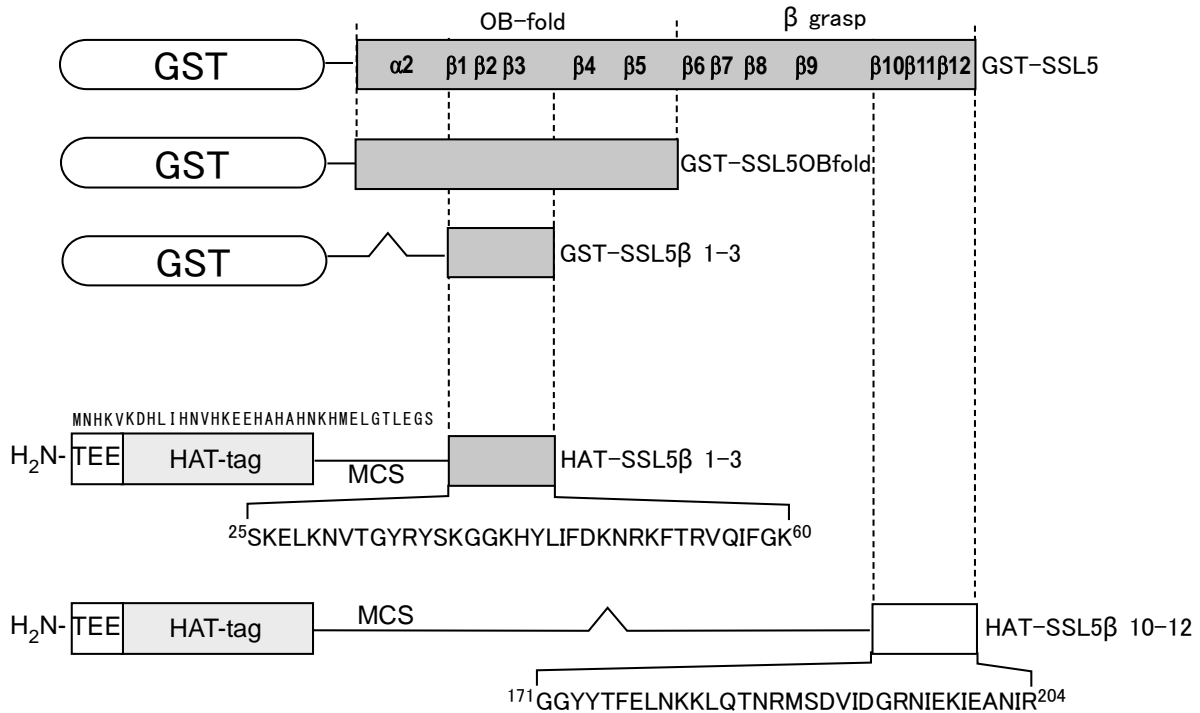


図1 本研究で作成したSSL5欠失変異体の構造. HAT-SSL5β 10-12以外はMMP-9との結合活性を有する (SSL5β 10-12はシアル酸含有糖鎖と結合するという報告がある. HAT-SSL5β 10-12はコントロールとして作成した).

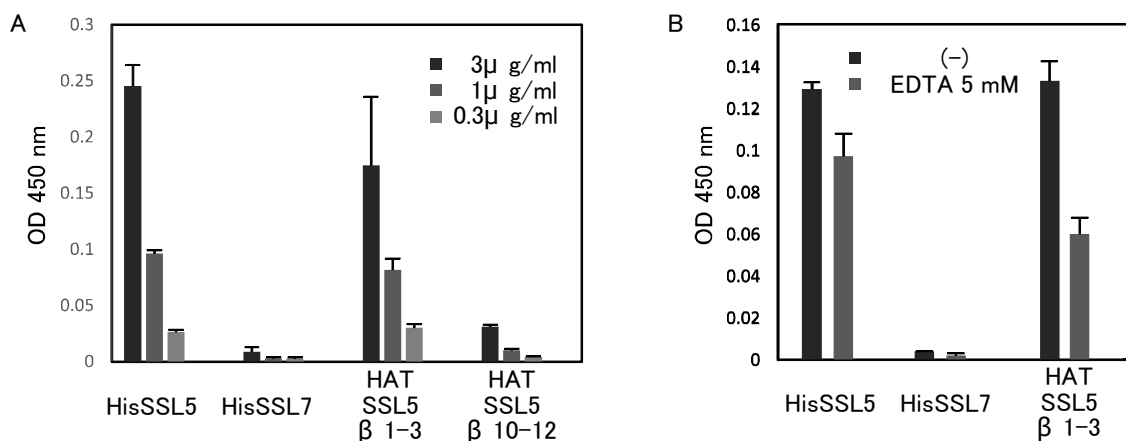


図2 固相化rMMP-9(活性ドメイン)に対するSSL5とSSL5最小機能領域ペプチドの結合
A SSL5と最小機能領域ペプチドのMMP-9に対する結合. B SSL5と最小機能領域ペプチドのMMP-9に対する結合に及ぼすEDTAの効果