

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5754008号
(P5754008)

(45) 発行日 平成27年7月22日(2015.7.22)

(24) 登録日 平成27年6月5日(2015.6.5)

(51) Int.Cl.

F 1

C 0 7 K	5/037	(2006.01)	C 0 7 K	5/037	Z N A
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	

請求項の数 4 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-17295 (P2011-17295)
 (22) 出願日 平成23年1月28日(2011.1.28)
 (65) 公開番号 特開2012-158525 (P2012-158525A)
 (43) 公開日 平成24年8月23日(2012.8.23)
 審査請求日 平成26年1月24日(2014.1.24)

(73) 特許権者 503027931
 学校法人同志社
 京都府京都市上京区今出川通烏丸東入玄武
 町601番地
 (73) 特許権者 504179255
 国立大学法人 東京医科歯科大学
 東京都文京区湯島1-5-45
 (74) 代理人 100093230
 弁理士 西澤 利夫
 (72) 発明者 西川 喜代孝
 京都府京田辺市多々羅部谷1-3 同志社
 大学内
 (72) 発明者 高橋 美帆
 京都府京田辺市多々羅部谷1-3 同志社
 大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CaMK II 阻害ペプチドおよびこれを含有する CaMK II 阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1～6のうちのいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴とする CaMK II 阻害ペプチド。

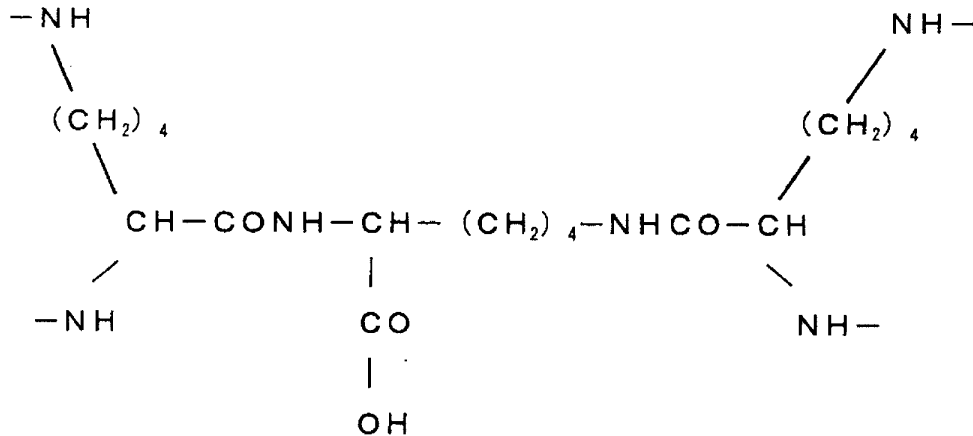
【請求項2】

前記ペプチドは、配列番号1～6のうちのいずれかのアミノ酸配列を複数有する多価ペプチドであることを特徴とする請求項1の CaMK II 阻害ペプチド。

【請求項3】

リジンが3つ結合した以下の分子核部、

【化1】



10

を有し、この分子核部の端部の各々の -NH に、直接またはスペーサーを介して、配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドが結合した 4 価ペプチドであることを特徴とする請求項 2 の CaMKII 阻害ペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれかの CaMKII 阻害ペプチドを含有することを特徴とする CaMKII 阻害剤。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、 Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMKII) の活性を阻害するペプチドおよびこれを含有する CaMKII 阻害剤に関する。

【背景技術】

【0002】

Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase; CaMK) は、Ca²⁺結合性蛋白質であるカルモデュリンにCa²⁺が結合したCa²⁺/カルモデュリンによって活性化されるセリン/スレオニンキナーゼの総称である。CaMKには3種のファミリー (CaMKI, CaMKII, CaMKIV) が存在し、各々が生体内で異なった役割を果たしている。なかでもCaMKIIは脳に豊富に存在し、神経伝達物質の合成や分泌、神経伝達の長期増強の誘導など、高次神経機能の制御に重要な役割を果たすことが知られている。その一方で、CaMKIIの異常な活性化がパーキンソン病や認知障害、痙攣などの神経疾患の発症と密接に関連していることが示されている。さらに神経疾患に限らず、心不全の誘発、骨粗鬆症の発症、アポトーシスの誘導阻害を介した発癌促進など、ヒトの様々な疾患発症に関与していることが知られている。

30

【0003】

そして、CaMKII阻害剤としては、その制御ドメインに存在している自己リン酸化部位の配列に由来するペプチドAIP: Autocamtide 2 Related Inhibitory Peptide、配列番号 15: Lys-Lys-Ala-Leu-Arg-Arg-Gln-Glu-Ala-Val-Asp-Ala-Leu (KKALRRQEAVAL) が知られている (非特許文献 1)。また、例えば、特許文献 1 ~ 3 には、CaMKII阻害剤として、前記AIPのアミノ酸配列と類似するアミノ酸配列からなるペプチドが提案されている。

40

【0004】

一方、近年CaMKIIの構造解析が行われ、その極めてユニークな高次構造が明らかになっている。CaMKIIはアソシエーションドメインとよばれる領域を中心にして12分子が円盤状に会合し、この円盤状の核構造の周りに各々のCaMKIIのキナーゼドメイン (触媒ドメイン) がリング状にパッキングされた状態で配置している。Ca²⁺非存在下ではこの状態で安定に存在しているが、種々の刺激によって細胞内Ca²⁺濃度が上昇し、Ca²⁺が結合したカルモデュリンが供給されるとパッキングがほどけ、12量体の各々のキナーゼ

50

が協調的に順次活性化すると考えられている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特許2963986号公報

【特許文献2】特表2001-509808号公報

【特許文献3】特表2005-504829号公報

【特許文献4】WO2006/001542号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Biochem Biophys Res Commun. 1995 Jul 26;212(3):806-12

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、AIPやその他特許文献1～3のペプチドの場合、アミノ酸配列における各ポジションの重要性、阻害メカニズムに関する詳細な検討が難しく、生体内動態の制御や膜透過性、安定性の向上など、目的に合わせたさまざまな機能付加、機能改善が困難であるという問題がある。この点を克服することができれば、上記の種々の重要疾患に対する優れた治療薬開発が大きく促進されると期待される。

【0008】

一方、本発明者らはこれまでに、多価型の相互作用（クラスター効果）に基づく強い結合を阻害するペプチドを同定する新しい方法、多価型ペプチドライブラリー法を確立している（上記特許文献4）。ペプチドライブラリー法は、同定されるペプチド配列の各位置のアミノ酸に関する相対的な重要度が定量化できるという大きな特徴を有する。

【0009】

そこで、本発明者らは、多価型ペプチドライブラリー法をCaMKIIに対して適用することにより、クラスター化したCaMKIIに対して作用するペプチド配列のスクリーニングが容易になるのではないかとこの想定のもと、一連の優れたCaMKII阻害ペプチドの取得を試みた。

【0010】

本発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、AIPとは異なる新規なアミノ酸配列を有するCaMKII阻害ペプチドおよびこれを含有するCaMKII阻害剤を提供することを課題としている。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記の課題を解決するために、本発明のCaMKII阻害ペプチドは、配列番号1～6のうちのいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドであることを特徴としている。

【0012】

本発明のCaMKII阻害ペプチドでは、前記ペプチドは、配列番号1～6のうちのいずれかのアミノ酸配列を複数有する多価ペプチドであることが好ましい。

【0013】

本発明のCaMKII阻害ペプチドでは、リジンが3つ結合した以下の分子核部、

【0014】

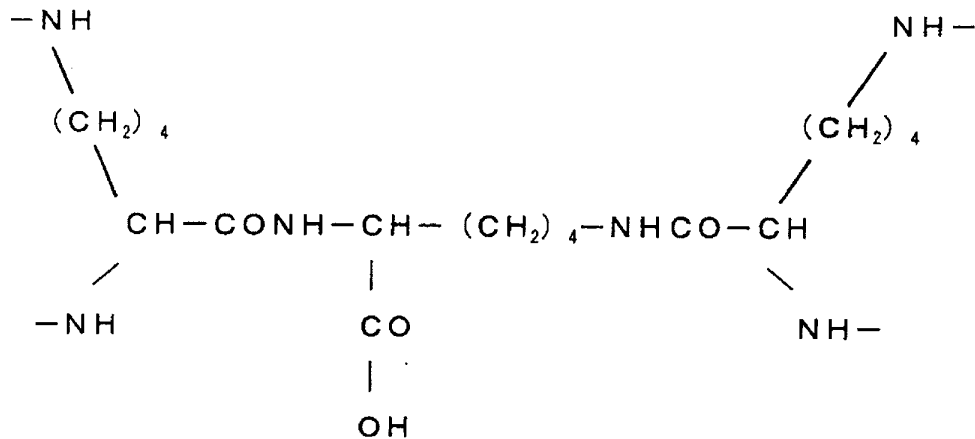
10

20

30

40

【化1】



10

【0015】

を有し、この分子核部の端部の各々の -NH に、直接またはスパーサーを介して、配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドが結合した 4 価ペプチドであることが好ましい。

【0016】

本発明の CaMKII 阻害剤は、上記の CaMKII 阻害ペプチドを含有することを特徴としている。

20

【発明の効果】

【0017】

本発明の CaMKII 阻害ペプチドは、新規なアミノ酸配列を有するペプチドであり、目的に合わせたさまざまな機能付加等が可能になる。また、この CaMKII 阻害ペプチドを含有する CaMKII 阻害剤は、CaMKII の異常な活性化などに起因する疾患の治療に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】多価型ペプチドライブラリーの構造を例示した図である。

【図2】M1 ~ M6 のそれぞれの合成ペプチドの阻害効果の結果を示す図である。

30

【図3】PKA に対する M1 ~ M6 の合成ペプチドの阻害効果を示す図である。

【図4】PKC に対する M1 ~ M6 の合成ペプチドの阻害効果を示す図である。

【図5】CaMKII - KD のキナーゼ活性に対する 4 価ペプチド T1 ~ T6 の阻害効果を示す図である。

【図6】CaMKII - KD のキナーゼ活性に対する 4 価ペプチド T1 ~ T6 の阻害効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明の CaMKII 阻害ペプチドは、CaMKII に強い結合親和性で結合することで、CaMKII の活性を阻害することができる。具体的には、本発明の CaMKII 阻害ペプチドは、以下のアミノ酸配列、

40

配列番号 1 : Arg-Arg-Arg-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-His-His
(RRRL L L L L A R H H)

配列番号 2 : Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-His-His
(RRIL L L L L A R H H)

配列番号 3 : Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-Leu-His
(RRIL L L L L A R L H)

配列番号 4 : Arg-Ile-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-His
(RIIL L L L L A L L H)

配列番号 5 : Arg-Ile-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-Leu-His

50

(R I I L L L L L A R L H)

配列番号 6 : Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-His

(R R I L L L L L A L L H)

のいずれかを 1 以上含む、一価または多価のペプチドである。配列番号 1 ~ 6 のアミノ酸配列は、後述の実施例に示すスクリーニングによって特定されたものである。

【 0 0 2 0 】

C a M K I I 阻害ペプチドは、C a M K I I との結合親和性を損なわないものであれば、配列番号 1 ~ 6 のアミノ酸配列の N 末端および / または C 末端に、ペプチドの電荷や親水性等を考慮して、1 以上のアミノ酸や修飾基などの修飾分子を適宜付加することができる。例えば、配列番号 1 ~ 6 のアミノ酸配列の C 末端には、ペプチドの水溶性を担保するためのアミノ酸として、リジンが 3 つ連続する配列 (K K K) を含むペプチドを付加することができる。C a M K I I 阻害ペプチドの長さは、アミノ酸の数がおよそ 1 0 ~ 2 0 程度の範囲を例示することができる。また、配列番号 1 ~ 6 のアミノ酸配列の C 末端には、C a M K I I の分子構造に対応させ、分子長を調節するための修飾分子を付加することもできる。分子長を調節するための修飾分子としては、例えば、炭素数 4 ~ 1 0 程度の鎖長のものが好ましく、具体的には、amino hexanoic acid [NH₂-(CH₂)₅-COOH] 等を例示することができる。

10

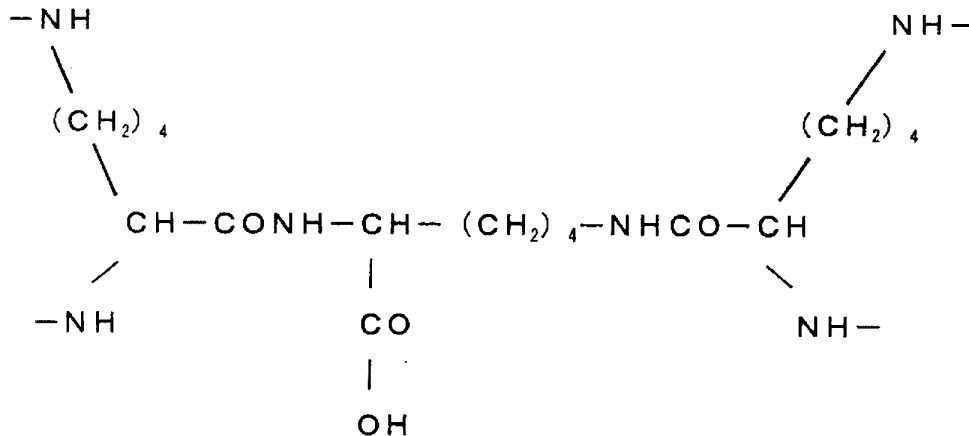
【 0 0 2 1 】

C a M K I I 阻害ペプチドが配列番号 1 ~ 6 のアミノ酸配列を複数含む多価ペプチドを作製する場合、例えば、リジンが複数個結合した分子核部の端部に配列番号 1 ~ 6 のいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドを複数結合させることができる。具体的には、分子核部として、例えば、リジンが 3 つ結合して形成された以下の構造を例示することができる。

20

【 0 0 2 2 】

【化 2】



30

【 0 0 2 3 】

この分子核部の、末端の - N H に、配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドを結合させることで、4 価の C a M K I I 阻害ペプチドを作製することができる。この場合も、配列番号 1 ~ 6 のアミノ酸配列の N 末端、C 末端にはアミノ酸等の修飾分子を付加することができる。例えば、分子核部と配列番号 1 ~ 6 のアミノ酸配列の C 末端との間に amino hexanoic acid [NH₂-(CH₂)₅-COOH] 等をスペーサーとして導入することや、リジンが 3 つ連続する配列 (K K K) を導入すること等が考慮される。

40

【 0 0 2 4 】

C a M K I I 阻害ペプチドは、配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含んでいることによって、C a M K I I に対して優れた結合親和性を発揮し、C a M K I I の活性を阻害することができる。特に配列番号 1 ~ 6 のうちのいずれかのアミノ酸配列を複数含む多価ペプチドである場合には、C a M K I I に対して優れた結合親和性を発揮する。また、C a M K I I 阻害ペプチドに含まれる配列番号 1 ~ 6 のアミノ酸配列は、従来の知られている A I P などとは異なる新規な配列であり、生体内動態の制御や膜透過性、安定性の向上

50

など、目的に合わせたさまざまな機能付加のための検討に用いることができる。

【0025】

本発明のCaMKII阻害剤は、上記のCaMKII阻害ペプチドを有効成分として含有する。本発明のCaMKII阻害剤は、上記CaMKII阻害ペプチド以外に、任意の製薬上許容される担体、賦形剤または安定化剤と混合することにより調製され保存される。許容される担体、賦形剤、または安定化剤は、用いられる用量および濃度において患者に非毒性であることを条件として、剤形や投与経路に応じて適宜に選択することができる。例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール；ブチルまたはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む単糖類、二糖類、および他の炭水化物EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）またはトウイーン(TWEEN)（商品名）、プルロニクス(PLURONICS)（商品名）、およびポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤等である。

【0026】

また、本発明のCaMKII阻害剤は徐放性を有していてもよい。徐放性剤として、例えば、固体疎水性ポリマーの半透性マトリクス（例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形状）である。徐放性マトリクスの例は、ポリエステルヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)）、ポリアクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸およびD-エチル-L-グルタメート、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ(D)-3-ヒドロキシブチル酸等を適宜使用することができる。

【0027】

このようにして製剤化したCaMKII阻害剤は、例えば、疾患の種類や症状に応じて、経口投与、局所投与、あるいは静脈等を介して全身投与することができる。投与量は、患者の体重、症状等に応じて決定することができる。

【0028】

本発明のCaMKII阻害剤は、例えば、CaMKIIの異常な活性化に起因するパーキンソン病や認知障害、痙攣などの神経疾患の治療・予防に利用することができる。また、その他、心不全、骨粗鬆症、アポトーシスの誘導阻害を介した発癌など、ヒトの様々な疾患の治療、発症の抑制に利用することができる。

【実施例】

【0029】

(1) CaMKIIの調製

CaMKIIのアイソザイムのひとつであるCaMKII α を用い、そのキナーゼドメインを標的とした。CaMKII α のキナーゼドメイン(KD)にhis-tagをつけたもの(CaMKII α -KD)を調製し、Ni-ビーズ上に固定化した。CaMKIIの大量調製にはバキュロウイルス発現系を利用し、ビーズ上に固定化されたCaMKII α -KDは90%以上の純度であることを確認した。

(2) CaMKII α に好適化した多価型ペプチドライブラリーのデザイン

図1に、多価型ペプチドライブラリーの構造を示す。この多価型ペプチドライブラリーは、[化1]にも示したように、中央に3つのリジンが結合した分子核部を有し、4つに分岐した構造とされている。そして、この分子核部の端部には、スペーサーとして、図1

10

20

30

40

50

中「U」で示されるamino hexanoic acid [NH₂-(CH₂)₅-COOH]が結合している。スペーサー長は、CaMKIIに好適化するように設計されている。そして、このスペーサーの端部からは、図1中のXXXXで示されるライブラリー部を含むペプチドが4個結合した、4価のペプチドライブラリーに設計されている。この各々のライブラリー部の末端には、Met-Ala(MA)が結合している。このMAは、スクリーニングに際して導入したものであり、本発明のCaMKII阻害ペプチドにおいては必ずしも付加する必要はない。なお、ライブラリー部は、便宜的にXXXXで示しているに過ぎず、そのアミノ酸の数等については以下に詳しく述べる。

ライブラリー部の設計に関して、本発明者らは、1)これまでにCaMKIIによってリン酸化されることが知られている数多くの基質では、リン酸化されるSer/Thrの位置から-5位のアミノ酸がLeuであることが多く、2)AIPの配列中におけるこの位置に相当するLeuを別のアミノ酸に置換すると阻害効果が著しく低下する、との知見のから、-5位のLeuが基質との高親和性結合に重要であると推測した。

そこで、多価型ペプチドライブラリーのライブラリー部(図1中で「XXXX」で表示)の配列は、XXXLXXXXAXXX(配列番号13: Xaa-Xaa-Xaa-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Xaa)と設定した(X部(Xaa)は、Cys以外の19種のアミノ酸のミックスチャーからなるdegenerate positionを示す)。配列中、基質のリン酸化位置に相当する0位をAla(A)に固定することでリン酸化を防ぎ、-5位をLeu(L)に固定することでライブラリー部とCaMKII-KDとの結合親和性が高まるように設計した。また、ライブラリー部とスペーサーの間には、Ala-Lys-Lys-Lys(AKKK)を導入した。この3個のLysは、多価型ペプチドライブラリーの水溶性を担保するために導入している。

【0030】

(3)多価型ペプチドライブラリースクリーニング

スクリーニング方法は、特許文献(WO2006/001542)に記載の方法に準じる。CaMKIIに好適化した上記の多価型ペプチドライブラリー(240μg)を用い、Ni-ビーズ上に固定化したCaMKII-KD(200μg)と4で18時間インキュベート(反応溶液の組成;50mM HEPES-NaOH(pH=7.5), 1mM EGTA, 20mM -glycerophosphate, 0.02% NP-40, 1mM DTT, 10μM ATP, final volume 300μl)した。ビーズをPBSならびに0.5%NP-40 PBSで洗浄後、30%酢酸で溶出し、CaMKII-KDに強く結合する画分を調製した。この画分についてアミノ酸シーケンスを行い、各degenerate positionについて、検出される19種のアミノ酸のモル比を算出した。さらに、オリジナルの多価型ペプチドライブラリー(ライブラリー部として配列番号13: Xaa-Xaa-Xaa-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Ala-Xaa-Xaa-Xaaを有するスクリーニング前の多価型ペプチドライブラリー)についても同様にアミノ酸シーケンスを行い、各degenerate positionでのアミノ酸の検出モル比を算出した。各degenerate positionの各アミノ酸について、それぞれスクリーニングから得られた数値をオリジナルの多価型ペプチドライブラリーから得られた数値で割ることによって、何倍選択性が向上したのかを数値化した。さらに、あるdegenerate positionの19種類の全てのアミノ酸の数値をたすと19となるように補正した。このとき各アミノ酸の間で、選択性に差がないと値は1となる。この値が1.3を越えると強い選択性がみられたと判断した。

【0031】

CaMKIIに好適化した多価型ペプチドライブラリーを用いたスクリーニングを2回行い、各Xの位置で選択されるアミノ酸を決定した。表1にその結果を示す。

【0032】

【表 1】

スクリーニング1回目

	-8	-7	-6	Leu	-4	-3	-2	-1	Ala	1	2	3
-XXX-L-XXX-A-XXX-												
	R(1.29) M(1.26)	R(1.19)	R(1.24) I(1.19)		L(1.32) I(1.22)	L(1.51) I(1.20)	L(1.46) R(1.21)	L(1.40) R(1.21)		R(1.30) L(1.28)	H(1.28) I(1.22)	H(1.35) A(1.22) L(1.20) R(1.19)

スクリーニング2回目

	-8	-7	-6	Leu	-4	-3	-2	-1	Ala	1	2	3
-XXX-L-XXX-A-XXX-												
	R(1.34) A(1.22) F(1.19)	I(1.25) F(1.23)	I(1.33) F(1.27) V/I(1.23)		L(1.30) I(1.29) V(1.22) F(1.22)	L(1.39) I(1.30) P(1.23) V(1.22)	L(1.35) I(1.22)	L(1.35) I(1.20) F(1.19)		L(1.28) R(1.20)	L(1.24)	L/R(1.21) H(1.20)

【0033】

その結果、両者で共通して、position -1~-4でLeuが非常に強く選択されること、position -8でArgが、position +3でHisがそれぞれ選択されることが示された。またposition +1, +2ではArgとLeuの2種のアミノ酸が共通して選択されていた。一方、position -7, -6, +2では両者で選択されるアミノ酸に若干の相違がみられた。

【0034】

以上の結果から、これらの情報をカバーする配列として、以下の6種類のアミノ酸配列(配列番号1~6)をCaMKII 結合モチーフとして同定した。

【0035】

配列番号1: Arg-Arg-Arg-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-His-His

(RRRL L L L L A R H H)

配列番号2: Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-His-His

(RRIL L L L L A R H H)

配列番号3: Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-Leu-His

(RRIL L L L L A R L H)

配列番号4: Arg-Ile-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-His

(RIIL L L L L A L L H)

配列番号5: Arg-Ile-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-Leu-His

(RIIL L L L L A R L H)

配列番号6: Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-His

(RRIL L L L L A L L H)

(4) 阻害活性測定

スクリーニングの結果得られた上記アミノ酸配列(配列番号1~6)を基に、上記アミノ酸配列(配列番号1~6)を含む以下に示すペプチド(配列番号7~12)を合成し、CaMKII 阻害ペプチドとしての効果を検討した。

【0036】

配列番号7:

Met-Ala-Arg-Arg-Arg-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-His-His-Ala-Lys-Lys-Lys

(MARRRL L L L L L A R H H A K K K)

配列番号8:

Met-Ala-Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-His-His-Ala-Lys-Lys-Lys

(MARRIL L L L L L A R H H A K K K)

配列番号9:

Met-Ala-Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-Leu-His-Ala-Lys-Lys-Lys

(MARRIL L L L L L A R L H A K K K)

配列番号10:

10

20

30

40

50

Met-Ala-Arg-Ile-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-His-Ala-Lys-Lys-Lys
(M A R I I L L L L L A L L H A K K K)

配列番号 1 1 :

Met-Ala-Arg-Ile-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Arg-Leu-His-Ala-Lys-Lys-Lys
(M A R I I L L L L L A R L H A K K K)

配列番号 1 2 :

Met-Ala-Arg-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-His-Ala-Lys-Lys-Lys
(M A R R I L L L L L A L L H A K K K)

これらの合成ペプチド(配列番号 7 ~ 12)は、上記スクリーニングの結果得られた C a M K I I 結合モチーフ(配列番号 1 ~ 6)の N 末端に Met - Ala (M A) を付加し、C 10
末端に、配列番号 14 : Ala-Lys-Lys-Lys (A K K K) を付加している。N 末端の M A は、多価型ペプチドライブラリーの構造に対応させて付加しているが省略することが可能である。また、C 末端の A K K K (配列番号 14 : Ala-Lys-Lys-Lys) は、合成ペプチドの水溶性を担保するために導入している。さらに、C a M K I I の分子構造に対応させるため、配列番号 7 ~ 12 で示す合成ペプチドの C 末端に amino hexanoic acid [NH₂-(CH₂)₅-COOH] を付加して分子鎖長を調整したものを使用した。以下、配列番号 7 の合成ペプチドに amino hexanoic acid [NH₂-(CH₂)₅-COOH] を付加したものを M 1 (monomer 1) と記載し、同様に、配列番号 8 ~ 12 の合成ペプチドに amino hexanoic acid [NH₂-(CH₂)₅-COOH] を付加したものを順に、M 2 (monomer 1) ~ M 6 (monomer 6) と記載する。

【 0 0 3 7 】

合成ペプチド M 1 ~ M 6 と、合成基質 A I P を用いて、C a M K I I - K D のキナーゼ 20
活性に対する阻害効果を検討した。また、細胞内に存在する一般的キナーゼである protein kinase A (P K A) および protein kinase C (P K C) の活性に及ぼす影響についても検討した。

【 0 0 3 8 】

C a M K I I - K D のキナーゼ活性に対する M 1 ~ M 6 の合成ペプチドの阻害効果の結果を図 2 に示す。図 2 から分かるように、M 4 については高濃度で阻害活性が減弱するものの、その他の合成ペプチドについてはいずれも強い阻害活性を示すことが示され、その効果は A I P と同程度であった。

【 0 0 3 9 】

一方、P K A に対する M 1 ~ M 6 の合成ペプチドの阻害効果を図 3 に、P K C に対する M 1 ~ M 6 の合成ペプチドの阻害効果を図 4 に示す。図 3、図 4 に示したように、P K A および P K C に対してはいずれのペプチドも全く阻害効果を示さなかった。

【 0 0 4 0 】

以上の通り、多価型スクリーニング法によって、A I P とは全く異なる新規配列を有し、特異的に C a M K I I を強く阻害する C a M K I I 阻害ペプチド、M 1 ~ M 6 を同定することができた。M 1 ~ M 6 が得られたことによって、生体内動態の制御や膜透過性、安定性の向上など、目的に合わせたさまざまな機能付加、機能改善の検討が可能となり、C a M K I I の異常な活性化に伴う種々の重要疾患に対する優れた治療薬開発が大きく促進される。

(5) 多価 C a M K I I 阻害ペプチドの阻害効果

図 1 に示した多価型ペプチドライブラリーの 4 つのライブラリー部(図 1 中で「X X X X」と表示)に、配列番号 1 ~ 6 に示した C a M K I I 結合モチーフのうちのいずれかを導入した 4 価のペプチドを作製した。この 4 価ペプチドを配列番号 1 を含むものから順に T 1 ~ T 6 と記載する。なお、この 4 価ペプチド(T 1 ~ T 6) は、以下に示した分子核部、

【 0 0 4 1 】

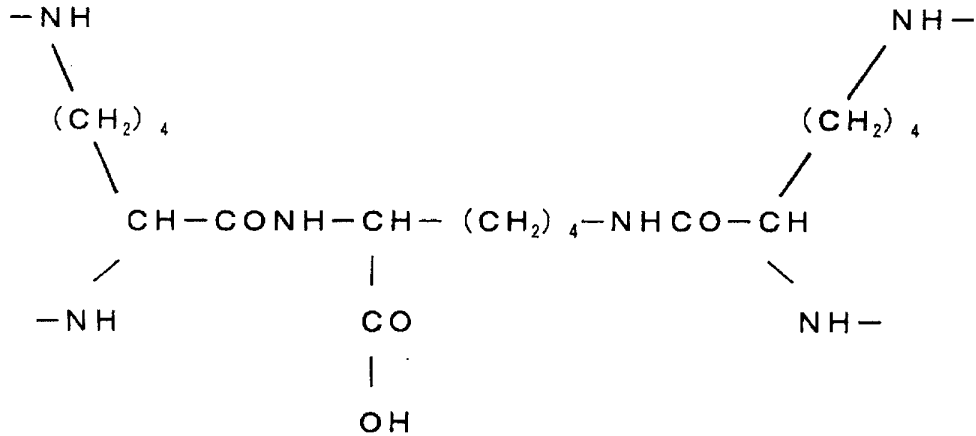
10

20

30

40

【化3】



10

【0042】

の端部の各々の -NH に、配列番号 7 ~ 12 のうちのいずれかのアミノ酸配列を含むペプチドが結合した 4 価ペプチドと同様の構造を有している。

【0043】

そして、4 価ペプチド T1 ~ T6 と、合成基質 AIP を用いて、CaMKII -KD のキナーゼ活性に対する阻害効果を検討した。

【0044】

CaMKII -KD のキナーゼ活性に対する 4 価ペプチド T1 ~ T6 の阻害効果の結果を図 5、図 6 に示す。図 5 では、横軸が、4 価ペプチド (T1 ~ T6) に含まれる CaMKII 結合モチーフ (配列番号 1 ~ 6) のモル数に換算している。図 6 では、横軸が 4 価ペプチド (T1 ~ T6) のモル数を表している。

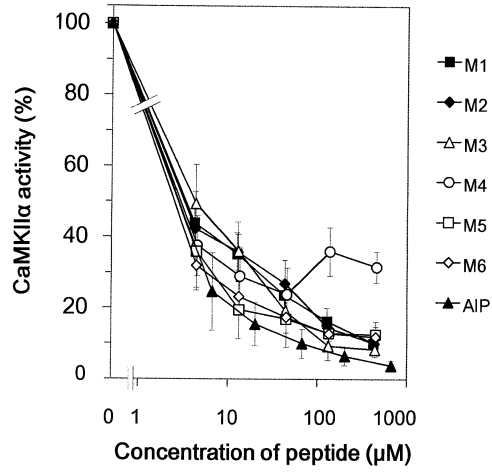
20

【0045】

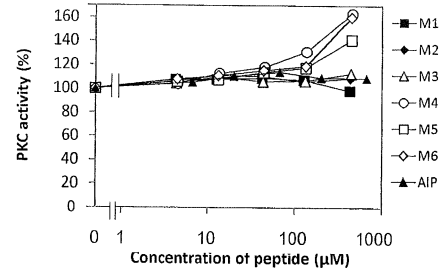
図 5、図 6 から分かるように、配列番号 1 ~ 6 に示した CaMKII 結合モチーフのうちのいずれかを導入した 4 価のペプチドは、CaMKII の活性阻害効果があることが確認された。特に、4 価ペプチド (T1 ~ T6) に含まれる CaMKII 結合モチーフの濃度および 4 価ペプチド (T1 ~ T6) の濃度が低濃度 (例えば、 $1 \mu\text{M} \sim 10 \mu\text{M}$) の場合、AIP と同等またはそれ以上の阻害効果が確認された。

30

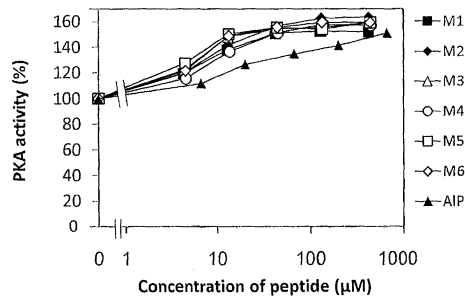
【 図 2 】



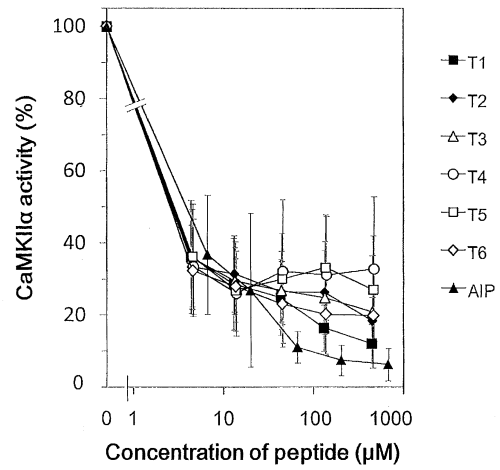
【 図 4 】



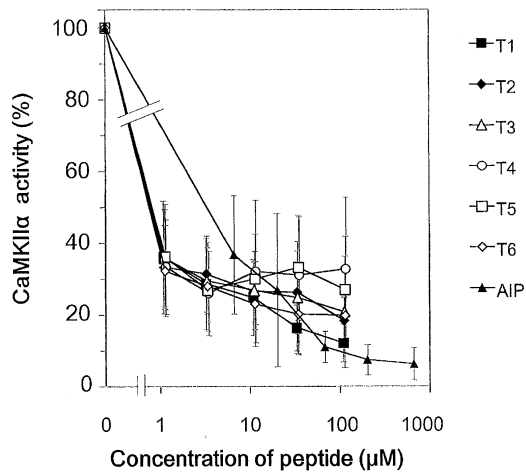
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/08
A 6 1 P 9/04	(2006.01)	A 6 1 P 9/04
A 6 1 P 19/10	(2006.01)	A 6 1 P 19/10
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00

(72)発明者 西村 浩輝
京都府京田辺市多々羅都谷1 - 3 同志社大学内

(72)発明者 高柳 広
東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内

(72)発明者 尾藤 晴彦
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 国際公開第2006/001542(WO, A1)
Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995年, 212, 3, p.806-812

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 5 / 0 3 7

A 6 1 K 3 8 / 0 0

A 6 1 P 9 / 0 4

A 6 1 P 1 9 / 1 0

A 6 1 P 2 5 / 0 8

A 6 1 P 2 5 / 1 6

A 6 1 P 2 5 / 2 8

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)