

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05372

研究課題名(和文) ヒトプロテオミクスに資する抗体様低分子リガンド群の網羅的創製

研究課題名(英文) Comprehensive creation of antibody-like ligands for human proteomics

研究代表者

川上 隆史 (KAWAKAMI, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：60638881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,970,000円

研究成果の概要(和文)：PUREシステムとmRNAディスプレイ法を組み合わせた環状ペプチドリガンド創製技術に、ヒトcDNAクローンからの固定化ヒトタンパク質の無細胞発現技術(HUPEX)を組み込むことにより、ヒトタンパク質を標的とする新規環状ペプチドリガンド群を完全無細胞システムで創製することに成功した。また、本システムにヒト腕型ロボット技術を組み合わせることによりヒトタンパク質結合リガンド群の創製を完全自動化し、プロテオミクスによる解析に応用することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：By integrating cyclic peptide ligand creation using PURE system and mRNA display with HUPEX to prepare immobilized human proteins from its encoding cDNA clones, we successfully created novel cyclic peptide ligands targeted to the human proteins in a full cell-free format. By combining the system with humanoid robot system, human protein-binding ligands created fully automatically were successfully applied to proteomic analysis.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：プロテオミクス HUPEX ヒト腕型ロボット 無細胞タンパク質合成系 部位特異的ビオチン化 cDNAクローン PUREシステム in vitro virus

1. 研究開始当初の背景

ウェスタンブロットリング、免疫染色、ELISA、免疫沈降、マイクロアレイなどのタンパク質解析研究において、抗体のような標的タンパク質に特異的に結合するリガンド分子は必要不可欠な研究ツールである。また、近年では、タンパク質ネットワークの大規模解析を目指し、プロテオームワイドにタンパク質解析を行う研究が盛んに行われている。そのような中、ヒトプロテオームに対する抗体群 (IgG、Fab、scFv など) あるいは抗体様分子群を取得するための研究が精力的に進められており、中でもファージディスプレイ法に代表される分子進化工学的手法が非常に強力な手法として注目を集めている。

これまでに研究代表者は、人工改変した無細胞翻訳系 (PURE システム) を用いることによって、翻訳ペプチドに様々な非天然骨格を導入する研究に取り組んできた。具体的には、Nアルキルペプチド (Kawakami et al., *Chem. Biol.* 2008、Kawakami et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2008、Kawakami et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2013、Kawakami et al., *Chem. Sci.* 2014)、および、環状ペプチド (Kawakami et al., *Nat. Chem. Biol.* 2009) のリボソーム翻訳合成に成功してきた。

また、分子進化工学的手法の一つである *in vitro virus* 法 (mRNA ディスプレイ法) と組み合わせることにより、環状ペプチド化合物の数十兆種類の大規模コンビナトリアルライブラリーからセレクション (超ハイスループットスクリーニング) を行い、抗体に匹敵する結合力で、ヒトタンパク質 (血管内皮細胞増殖因子受容体など) に特異的に結合する環状ペプチドリガンドを発見し、薬剤候補発見へと応用することにも成功してきた (Kawakami et al., *ACS Chem. Biol.*, 2013、*Chem. Biol.*, 2011)。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が精力的に取り組んできた PURE システムと mRNA ディスプレイ法を組み合わせた環状ペプチドリガンド創製技術に、ヒト cDNA クローンからの固定化ヒトタンパク質の無細胞発現技術 (HUPEX) とヒト腕型ロボット技術を組み合わせることで自動化することにより、様々なヒトタンパク質それぞれに特異的に結合する環状ペプチドリガンド群を創製することを目的とする。

3. 研究の方法

p-クロロメチル安息香酸あるいは m-クロロメチル安息香酸で環状化させたオリゴペプチド化合物の大規模コンビナトリアルライブラリーを PURE システムを用いて mRNA ディスプレイ型および cDNA ディスプレイ型で調製した。また、無細胞タンパク質発現システム HUPEX を用いて、部位特異的にビオチン化されたヒトタンパク質を対

応する鑄型 cDNA クローンから調製し、磁気ビーズに固定化した。調製した両者を用いたプルダウン処理により、標的ヒトタンパク質結合環状ペプチド化合物リガンドの創製を完全無細胞系にて行なった。また、この完全無細胞系ヒトタンパク質結合環状ペプチドリガンドスクリーニングシステムをヒト腕型ロボット技術により操作へと応用した。

4. 研究成果

SDS-PAGE 解析の結果、HUPEX を用いることにより、様々な固定化ヒトタンパク質を対応する鑄型 cDNA クローンからハイスループットに無細胞で調製可能であることが判明した。また、PURE システムを用いることにより、p-クロロメチル安息香酸あるいは m-クロロメチル安息香酸で環状化させた様々な鎖長のオリゴペプチド化合物の大規模コンビナトリアルライブラリーを調製可能であることが判明した。そして、調製した固定化ヒトタンパク質を標的として、mRNA ディスプレイ法を用いた試験管内分子進化を行なったところ、様々な新規の環状ペプチドリガンドを創製することにも成功した。また、プロテオミクスアプローチ等を用いた解析により、創製した環状ペプチドリガンド群がタンパク質・タンパク質間相互作用を阻害していることも判明した。更に、生きたヒト細胞上に発現するタンパク質を標的として、創製した環状ペプチドリガンドがタンパク質・タンパク質間相互作用を阻害するか、蛍光ラベルした標的タンパク質の蛍光顕微鏡観察や蛍光プレートリーダーによる解析を行なったところ、生細胞上のタンパク質・タンパク質間相互作用を創製した環状ペプチドリガンドが阻害可能であることも判明した。また、この完全無細胞系ヒトタンパク質結合環状ペプチドリガンドスクリーニングシステムをヒト腕型ロボット技術により完全自動化し、プロテオミクスによる解析に応用することにも成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Mizuki Yamamoto, Hiroki Suzuki, Tomohiro Iwabuchi, Yu Shimizu, Takashi Kawakami
Peptide Selection against Reactive Small Molecular Probes for Protein Imaging and Opto-genetics by Using the DIVERSE Screening System
Peptide Science, 54, in press, 2017
査読有り
- ② Takashi Kawakami, Koji Ogawa, Tomohisa Hatta, Naoki Goshima, and Tohru Natsume

- Directed Evolution of a Cyclized Peptoid-Peptide Chimera against a Cell-Free Expressed Protein and Proteomic Profiling of the Interacting Proteins to Create a Protein-Protein Interaction Inhibitor
ACS Chemical Biology, 11, 1560-1577, 2016
DOI: 10.1021/acscchembio.5b01014
査読有り
- ③ Miya Kurata, Naoko Yanada, Koichiro Ikai, Daiki Sakamoto, Takashi Kawakami
De Novo Creation of Non-enzymatically Covalent-labeling Peptide Tags for Protein Imaging by Using the DIVERSE System
Peptide Science, 53, 227-228, 2016
査読有り
- ④ Naoko Yanada, Miya Kurata, Daiki Sakamoto, Koichiro Ikai, Takashi Kawakami
Site-specific Labeling of Peptide-tagged Proteins with Nano-sized Fluorescent Probes in Living Cells for Single-molecule Imaging
Peptide Science, 53, 207-208, 2016
査読有り
- ⑤ Takashi Kawakami, Koji Ogawa, Naoki Goshima, and Tohru Natsume
De novo creation of peptide tags for non-enzymatic covalent labeling by *in vitro* evolution for protein imaging inside living cells
Chemistry & Biology, 22, 1671-1679, 2015
DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.10.016
査読有り
- ⑥ Takashi Kawakami, Shinya Ito, Naoki Goshima, Kazuhiro Nagata, and Tohru Natsume
Post-translational modification mapping of collagen that binds to HSP47 by directed ligand evolution and DNLC mass spectrometry
Peptide Science, 52, 321-322, 2015
査読有り
- ⑦ Takashi Kawakami, Kazuma Murakami, Daiki Sakamoto, Mizuho Hanaki, Tohru Natsume, and Kazuhiro Irie
In vitro display evolution of cyclized peptidomimetics targeted to a chemically synthesized amyloid beta protein dimer
Peptide Science, 52, 323-324, 2015
- 査読有り
- [学会発表] (計12件)
- ① 山本美月、鈴木宏輝、岩渕智宏、川上隆史
Peptide Selection against Reactive Small Molecular Probes for Protein Imaging and Opto-genetics by Using the DIVERSE Screening System
日本ペプチド学会第54回ペプチド討論会
2017年11月21日
平塚中央公民館 (大阪府堺市)
- ② 川上隆史
Chemistry から Biology への展開-DIVERSEスクリーニングシステムの開発とバイオイメージングへの応用-
日本化学会第97春季年会 (招待講演)
2017年3月17日
慶応義塾大学 (神奈川県横浜市)
- ③ 川上隆史
DIVERSE システムを用いた蛋白質ラベリング用ペプチドタグ創製とバイオイメージングへの応用
第7回「産と学をつなぐ SENRI の会」(招待講演)
2017年1月13日
千里ライフサイエンスセンタービル (大阪府大阪市)
- ④ 倉田みや、築田奈央子、猪飼航一郎、坂本大樹、川上隆史
De Novo Creation of Non-enzymatically Covalent-labeling Peptide Tags for Protein Imaging by Using the DIVERSE System
日本ペプチド学会第53回ペプチド討論会
2016年10月27日
京都テルサ (京都府京都市)
- ⑤ 築田奈央子、倉田みや、坂本大樹、猪飼航一郎、川上隆史
Site-specific Labeling of Peptide-tagged Proteins with Nano-sized Fluorescent Probes in Living Cells for Single-molecule Imaging
日本ペプチド学会第53回ペプチド討論会
2016年10月27日
京都テルサ (京都府京都市)
- ⑥ 川上隆史
試験管内分子進化法を用いた PPI 阻害環状 N アルキルペプチド化合物の創製
新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」地区ミニシンポジウム~天然物

ケミカルバイオロジーの更なる発展を目指して～（招待講演）
2016年2月23日
京都大学（京都府京都市）

- ⑦ Takashi Kawakami, Naoki Goshima, and Tohru Natsume
Directed evolution of antibody-like peptides for proteomics
The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies
2015年12月15日
Honolulu (USA)
- ⑧ 川上隆史、伊藤進也、五島直樹、永田和宏、夏目徹
無細胞分子進化と超高感度質量分析を用いた翻訳後修飾の網羅的解析
日本ペプチド学会第52回ペプチド討論会
2015年11月16日
平塚中央公民館（神奈川県平塚市）
- ⑨ 川上隆史、村上一馬、阪本大樹、花木瑞穂、夏目徹、入江一浩
アミロイドβ二量体を標的とする非天然型環状ペプチドの試験管内分子進化
日本ペプチド学会第52回ペプチド討論会
2015年11月16日
平塚中央公民館（神奈川県平塚市）
- ⑩ 川上隆史
進化分子工学と有機合成化学を基盤とするペプチドツール創製システムの構築
BioJapan2015 World Business Forum（招待講演）
2015年10月15日
パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑪ 川上隆史、五島直樹、夏目徹
タンパク質ラベリング用ペプチドタグの進化分子工学的創製システムの構築
日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会
2015年6月10日
東北大学（宮城県仙台市）
- ⑫ 川上隆史、五島直樹、夏目徹
プロテオミクスアプローチによるタンパク質間相互作用阻害剤の同定
「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第8回公開シンポジウム
2015年6月8日
東北大学（宮城県仙台市）

〔図書〕（計 2件）

- ① 山本美月、川上隆史
羊土社

実験医学 2018年1月号、News & Hot Paper Digest、pp62-63、2018
2種類の人工塩基を有する DNA アプタマー

- ② 山本美月、鈴木宏輝、岩渕智宏、清水優、川上隆史
技術情報協会
ペプチド医薬品開発のためのスクリーニング・安定化・製剤化技術 第9章-第4節、pp332-342、2017
細胞膜透過性ペプチド創製を指向したPURE システムと mRNA ディスプレイ法による大環状 N アルキルペプチドの超高速スクリーニング

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1件）

名称：任意の標的物質と共有結合可能な（ポリ）ペプチド／タンパク質タグの選択方法及び選択されて得られた（ポリ）ペプチド／タンパク質タグ
発明者：川上隆史、夏目徹
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-160191
出願年月日：平成27年8月14日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/kenkyu/index.php?content_id=20

6. 研究組織

(1) 研究代表者
川上 隆史 (KAWAKAMI, Takashi)
山梨大学・大学院総合研究部・助教
研究者番号：60638881

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし