

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12756

研究課題名(和文) In vitro膜タンパク質阻害ペプチド創生技術の開発と応用

研究課題名(英文) Constructing an in vitro screening system of peptides that inhibit the function of membrane proteins

研究代表者

松浦 友亮 (Matsuura, Tomoaki)

大阪大学・工学研究科 ・准教授

研究者番号：50362653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、in vitroで膜タンパク質の機能を阻害するペプチドをスクリーニング可能な技術を確立し、これを大腸菌由来の多剤排出トランスポーターEmrEの輸送活性阻害ペプチドのスクリーニングに適用する事を目指した。まず、高品質な10アミノ酸からなるランダムペプチドライブラリーを構築した。次に、EmrEを阻害するペプチド配列をin vitroでスクリーニングできる技術を確立した。これらを組み合わせ、10 億以上のペプチドライブラリーから阻害ペプチドをスクリーニングする技術の確立に成功した。

研究成果の概要(英文)：We aim to construct an in vitro screening system for peptides that inhibit the function of membrane protein of interest. The method is based on the syntheses of membrane protein of interest and the inhibitor peptide simultaneously using an in vitro transcription-translation system inside cell-sized phospholipid vesicles. Here, we first created a high quality random peptide library with a length of 10 amino acids. Then using EmrE, a multidrug transporter from Escherichia coli as a model protein, the screening system of an inhibitor peptide was established. By combining the constructed peptide library and the gene screening system, we now can screen inhibitor peptides entirely in vitro.

研究分野：進化分子工学

キーワード：進化分子工学

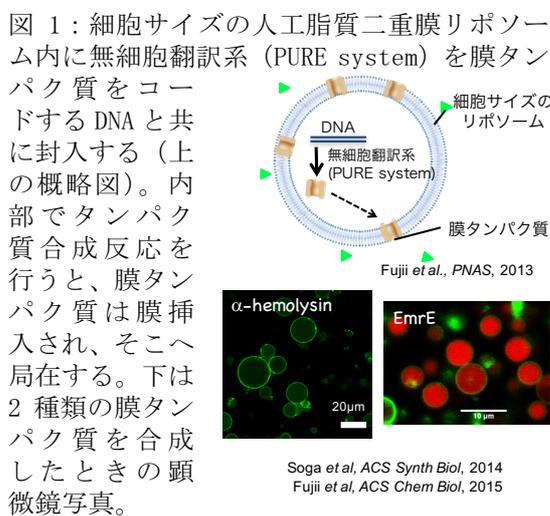
### 1. 研究開始当初の背景

抗菌剤、抗生物質などに耐性を示す多剤耐性菌の出現は人類の健康にとって脅威である。細菌類が多剤耐性を獲得する機構には様々有るが、主には細胞内から外へ抗菌剤を排出する多剤排出トランスポーターに起因すると言われている (Higgins, *Nature*, 2007)。よって、多剤排出トランスポーターの阻害剤の開発は重要である (Ramos *et al.*, *Annu Rev Microbiol*, 2002)。

バイオ医薬品 (ペプチド、抗体、核酸医薬) は、低分子医薬よりも標的分子への特異性が高く、副作用が少ないなどの特徴から、今後著しい成長が期待されている。現在までに、多剤排出トランスポーターをターゲットするいくつかの低分子薬が報告されているが (Yoshida *et al.*, *Bioorg Med Chem*, 2007)、未だ臨床的に有効な阻害剤の開発には至っていない。一方で、バイオ医薬品の阻害剤は、適したスクリーニング技術がないためか、現在までに報告されていない。

### 2. 研究の目的

研究代表者らは、以前に人工脂質二重膜リポソーム内で試験管内で細胞を用いる事なくタンパク質を合成できる無細胞翻訳系 (PURE system) を用いて膜タンパク質合成反応を行う手法を開発した (図1)。本研究では、この手法をベースに以下の3項目を達成する事を目指した。



- (1). 膜タンパク質の機能を阻害するペプチドの候補となる 10 アミノ酸のランダムペプチドライブラリーを構築する。多様性は、 $10^7$  種類以上を担保する。
- (2). 膜タンパク質の機能を阻害するペプチドをハイスループットにスクリーニングする技術を開発する。
- (3). 最終的に、開発した手法を用い、大腸菌多剤排出トランスポーターの 1 つである EmrE の阻害ペプチドを取得する。

### 3. 研究の方法

本研究では、研究代表者らが近年開発した無細胞翻訳系を用いたリポソーム内膜タンパク質合成技術 (Fujii, Matsuura *et al.*, *PNAS*, 2013; Fujii, Matsuura *et al.*, *Nat Protoc*, 2014) を応用し、大腸菌由来の多剤排出トランスポーター EmrE の基質輸送活性を阻害するペプチドの創出を目指した。ここでは EmrE を標的とするが、本研究を遂行することで実験系が確立できれば、様々な膜タンパク質の阻害剤開発にも応用可能である。本技術の概要を図2に示す。

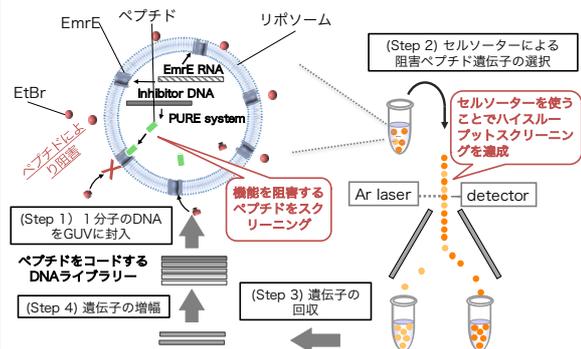


図2: EmrE を阻害するペプチドスクリーニング技術の概略図。(Step 1) 10 アミノ酸のランダムペプチドをコードする遺伝子ライブラリーを構築し、この DNA を各リポソーム当たり 1 分子入るよう無細胞翻訳系 PURE system と共に封入する。(Step 2) PURE system によりリポソーム内部でペプチドを外部で EmrE を合成する。合成されたペプチドが EmrE を阻害する場合、リポソーム外に加えた EtBr の輸送活性が弱くなり、そのリポソームの赤色蛍光は弱くなる。(Step 3) 赤色蛍光が弱い (EmrE の機能が阻害された) リポソームをセルソーターで分取すると、EmrE の EtBr トランスポーター活性を阻害するペプチドをコードする遺伝子が得られる。(Step 4) 回収された遺伝子を増幅し、再びスクリーニングを行う。

### 4. 研究成果

#### (1) ペプチドライブラリーの構築

まず、10 アミノ酸のランダムペプチドライブラリーを構築した。N 末端に FLAG-tag 配列を持ち (NNK)<sub>10</sub> コドンを用いてオリゴ DNA を調製した。NNK を用いているため TGA 終止コドンが入った配列が存在する。そこでリポソームディスプレイ法により、N 末端に付与した FLAG-tag を用いて終止コドンを取り除いたランダムペプチドライブラリーを調製した (図3)。リポソームディスプレイ法で取得した遺伝子量は 1 ng 以上あったため、 $10^7$  以上の多様性は担保されたランダムペプチドライブラリーになっている。

FLAG-tag His-tag TEV  
 MDYKDDDDKGGHHHHHGCXXXXXXXXXXCGENLYFOG

図3：構築したランダムペプチドライブラリーの概略図。Xの部分ランダム配列部分

(2) EmrE の輸送活性を阻害するペプチドのスクリーニング技術の開発

二種類のペプチドをコードする DNA を混合し、阻害活性の高い配列をコードする遺伝子が選択的に濃縮する実験系の確立を目指した。具体的には、リポソーム内に再構成型無細胞翻訳系 PURE system、EmrE をコードする RNA とペプチドをコードする DNA 1 分子を封入し、タンパク質合成反応を行った。その後 EmrE の基質である蛍光物質 EtBr を加え、リポソーム内部の EtBr 蛍光強度の低いリポソームをセルソーターにより分取した。EmrE の活性を阻害する配列として、EmrE と会合することで EmrE の輸送活性を低下させる配列 E14C と会合に無関係な配列 LysZRS の2種類の遺伝子を用意した。EmrE の活性が LysZRS を加えたときより、E14C を添加したときの方が低下する条件を見いだした (図4)。セルソーターのデータからも E14C の遺伝子が分取できるほど明確に E14C が EmrE の EtBr 輸送活性を阻害している事がわかる (図5)。

現在までのところこのライブラリーを用いて、上記で明らかにした実験条件で EmrE を阻害するペプチドをスクリーニングする実験を開始した (図2)。現在、スクリーニングを繰り返しおこなっているところである。

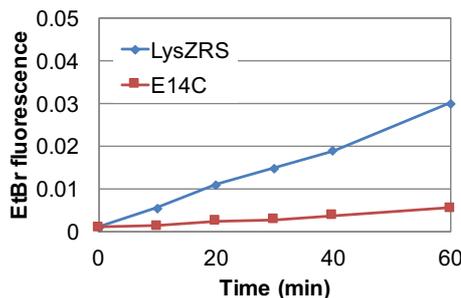


図4：リポソーム内で EmrE を合成し、その後 EtBr 取り込みを計測した結果。LysZRS という EmrE と無関係の配列を合成したときと比べて、阻害活性のある E14C を合成すると EtBr 取り込みの速度が著しく低下している事がわかる。

### (3) 今後の展望

一般に、あるターゲット分子を阻害する分子をスクリーニングする場合、まずターゲットに結合する分取を取得し、次にその内から

機能阻害分子を特定する (e.g., Tanaka *et al. Nature*, 2013)。本研究では、ターゲット膜タンパク質分子を機能阻害するペプチドを直接かつ *in vitro* でスクリーニングする点で新しい。

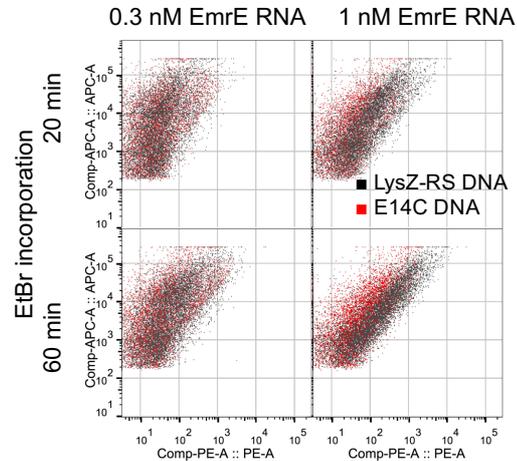


図5：EmrE を合成するとき、同時に Lys-RS もしくは E14C を合成し、その後 EtBr 取り込み実験を行ったときの結果。示しているのはセルソーターで得られた2次元プロット。横軸は EtBr の蛍光強度、縦軸はリポソームのサイズを表す。それぞれの点はリポソーム1粒子を示している。0.3 nM EmrE RNA を用いたときに、Lys-RS と E14C に顕著な差は見られなかったが、1 nM EmrE RNA を用いたとき、60分後に E14C のプロットが明らかに LysZ-RS のそれよりも左にあることがわかる。すなわち、EtBr の取り込みが抑制されている。

本スクリーニング系では、EtBr 輸送活性の違いによってリポソームをソートする。研究代表者らは、EtBr の輸送活性に応じてスクリーニングする技術の開発については既に論文で発表している (Uyeda *et al., Anal Chem*, 2016)。具体的には、EmrE の野生型遺伝子と機能欠損変異体 E14C の遺伝子を 1:99 で混合し、EtBr 輸送活性の高いリポソームのスクリーニングを行った。その結果、野生型の遺伝子が最大約 90 倍濃縮されていた。加えて、EmrE にランダム変異を導入したライブラリーから、野生型よりも EtBr 輸送活性の高い遺伝子プールの取得にも成功している。これらの結果は、EtBr 輸送活性の差異によって遺伝子のスクリーニングが可能である事を示している。

本研究課題の期間内に EmrE の阻害ペプチドの取得にまでは至らなかったが、このように全ての材料と技術は揃っており、今後スクリーニング実験を継続する事で、これが取得できる事が期待される。

バイオ医薬品市場は、今後著しい成長が期待されている。本研究で得られる成果は、バ

イオ医薬品開発の新たな手法の提供、有用なバイオ医薬品創生に貢献する可能性がある。

#### 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1件)

1. Uyeda, A., Nakayama, S., Kato, Y., Watanabe, H. & Matsuura, T. (2016) Construction of an in Vitro Gene Screening System of the E. coli EmrE Transporter Using Liposome Display, *Anal Chem.* **88**, 12028-12035.

[学会発表] (計5件)

1. Tomoaki Matsuura (2017年2月4日) "Evolutionary engineering and characterization of membrane proteins using liposome display" 2nd Korea-Japan Smart Biodesign Workshop: Technology exchange for green biotechnology (Sendai City Information & Industry Plaza, Sendai, Japan)
2. 松浦友亮 (2016年11月30日-12月2日) "Evolutionary engineering and characterization of membrane proteins using liposome display" 第39回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜 (神奈川県))
3. 松浦友亮 (2016年9月25-27日) 「リポソームディスプレイ法を用いた進化分子工学技術の開発と応用」第89回日本生化学会大会 (仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス (宮城))
4. 松浦友亮 (2015年10月26日-28日) 「バイオ界面を利用した *in vitro* 進化分子工学」日本生物工学会第67回大会 (城山観光ホテル・鹿児島市)
5. 松浦友亮 (2015年6月24-60日) 「無細胞タンパク質合成系を用いた膜タンパク質進化分子工学」第15回日本蛋白質科学会年会 (あわぎんホール, 徳島市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.eng.osaka-u.ac.jp/ez/tomomatsu/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松浦友亮 (Matsuura, Tomoaki)  
大阪大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：50362653

##### (2) 研究分担者

該当無し ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

該当無し ( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

該当無し ( )