

令和 3 年 5 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19389

研究課題名(和文) タンパク質間相互作用を制御する特殊環状ペプチド創薬

研究課題名(英文) Development of novel peptide drugs that regulate protein-protein interaction

研究代表者

加藤 敬行 (Kato, Takayuki)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・准教授

研究者番号：90567760

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、タンパク質間相互作用を制御する特殊環状ペプチド医薬の開発である。しかしながら、そのようなタンパク質間相互作用を制御するペプチドを効率的にスクリーニングする手法がないのが現状である。本研究では複合体を形成するIL28RAとIL10R2にそれぞれ結合する特殊環状ペプチド2種類をRaPIDディスプレイ法を用いて取得し、各ペプチドの標的への結合力は結合解離定数が数十nMと非常に強力であることを確認した。さらに2つのペプチド配列を抗体のFc領域の2箇所の一つずつ導入した分子を作成し、その結合活性及び薬理活性の検証段階に入っている。本研究期間終了後も引き続き解析を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内においては、シグナル伝達に関わるタンパク質群や複合体形成により機能する酵素群など、多くの場面で異種または同種のタンパク質間の相互作用が非常に重要な役割を担っている。これらのタンパク質は疾患の原因に直接関わっているものも多く、タンパク質間相互作用を制御できるようなペプチド医薬を開発できれば創薬におけるインパクトは非常に大きい。特に、相互作用を阻害するような分子と比べて相互作用を促進するような分子の開発はより困難であると考えられており、本研究の成果によりそのような分子を自由自在に開発できるようになれば新しい創薬手法として非常に利用価値が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is the development of novel nonstandard peptide drugs that regulate protein-protein interaction. Unfortunately, no effective methodologies for screening such molecules have been established to date. Here, we first developed two macrocyclic peptides that independently bind to IL28RA and IL10R2 by means of the RaPID display. Both of the peptides showed strong binding affinities against the target molecules with low-nM KD values. Then, we introduced the two peptide sequences into an Fc region of antibody so that both of IL28RA and IL10R2 can be targeted by this molecule at the same time. Currently, evaluation of binding affinity and bioactivity of this molecule is underway.

研究分野：分子生物学

キーワード：特殊環状ペプチド タンパク質間相互作用 遺伝暗号リプログラミング

### 1. 研究開始当初の背景

ペプチドは従来の有機低分子医薬や抗体医薬などに代わる新しい医薬品リード化合物として非常に注目を集めている。ペプチドの場合、有機低分子医薬では難しかったタンパク質間相互作用の促進や阻害が可能であると考えられており、単なる阻害剤ではなく従来にない新しい機能を持つ分子標的薬としてデザインできるポテンシャルを有している(図1)。しかしながら、そのようなタンパク質間相互作用を制御できるペプチドを設計ないしスクリーニングするための有効な方法が無いのが現状である。

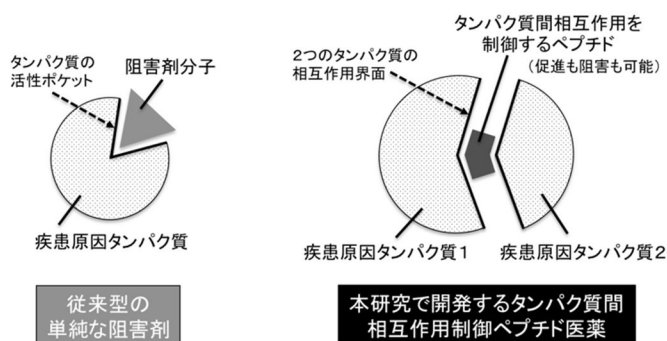


図1:タンパク質間相互作用を制御する特殊環状ペプチドの開発

### 2. 研究の目的

生体内においてはシグナル伝達におけるタンパク質間の機能的連携や、複合体を形成することによって初めて機能する酵素群など、異種または同種のタンパク質間の相互作用が極めて重要な役割を担っているケースが非常に多い。また、疾患の原因に直接関わっているものが多いため、タンパク質間相互作用を制御できるようなペプチド医薬を開発できれば創薬におけるインパクトは非常に大きい。そこで本研究では、そのようなタンパク質間相互作用を制御する特殊環状ペプチド医薬のスクリーニング法の開発を目指した。また、実際にこの手法を適用して IF28RA と IF10R2 との間の相互作用を促進するような環状ペプチド医薬の開発をすることを目指した。

### 3. 研究の方法

(1)ペプチドのスクリーニングの戦略としては以下の A および B の 2 種類の方法を検討した。

戦略 A)標的となる 2 種類のタンパク質 (IF28RA および IF10R2) に mClover3 (緑色蛍光タンパク質) および mRuby3 (赤色蛍光タンパク質) をそれぞれ連結したものを細胞表面上に発現させておき、RaPID display 法によって特殊環状ペプチドのライブラリを提示する方法(図2)。そして、2 タンパク質間の相互作用を蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)により検出し、相互作用の変化を生じた画分のみをセルソーター(FACS)により分離回収することによりタンパク質間相互作用の変化を惹起するペプチド群を得る。

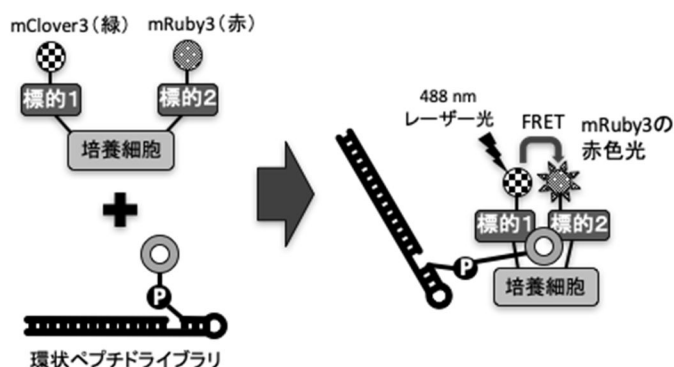


図2:FRETによるタンパク質間相互作用を惹起するペプチドの検出

戦略 B) 2 種類の標的タンパク質 (IF28RA および IF10R2) にそれぞれ結合する特殊環状ペプチドの in vitro セレクションをおこない、各ペプチドの標的タンパク質への結合を確認したのち、2つのペプチドをリンカーを介して連結し、2つの標的タンパク質に同時に結合させる戦略。

(2)特殊環状ペプチドのライブラリの作成にあたっては、遺伝暗号リプログラミング法を用い

て非天然アミノ酸を導入したペプチドライブラリを翻訳合成した。ペプチドの N 末端にはクロロアセチルチロシン( $^{ClAc}Tyr$ )を人工的に導入し、下流に配置したシステイン(Cys)の側鎖のチオール基との間でチオエーテル結合を形成させることによりペプチドを環化させた。チオエーテル結合は Cys-Cys 間のジスルフィド結合とは異なり還元されないため、生理的条件下で安定であり、環状構造が壊れることはない。そのため、ペプチドの環化により剛直性・ペプチダーゼ耐性を付与することができる。 $^{ClAc}Tyr$  と Cys の間のアミノ酸配列はランダム化することでライブラリ化した。翻訳の鋳型となる mRNA の 3'末端にはピューロマイシン・リンカーを結合させておき、リボソーム内で翻訳された環状ペプチドと mRNA とをピューロマイシンを介して連結させた。そして、スクリーニング後に回収されたペプチドに連結された mRNA を逆転写・PCR によって増幅した後、得られた DNA をクローニングし配列解析することで特殊環状ペプチドの構造を決定できる(図 3: RaPID ディスプレイ法)。通常、この一連のセレクションのサイクルを 4-6 ラウンド程度実施することで活性種のペプチドを十分に濃縮できる。

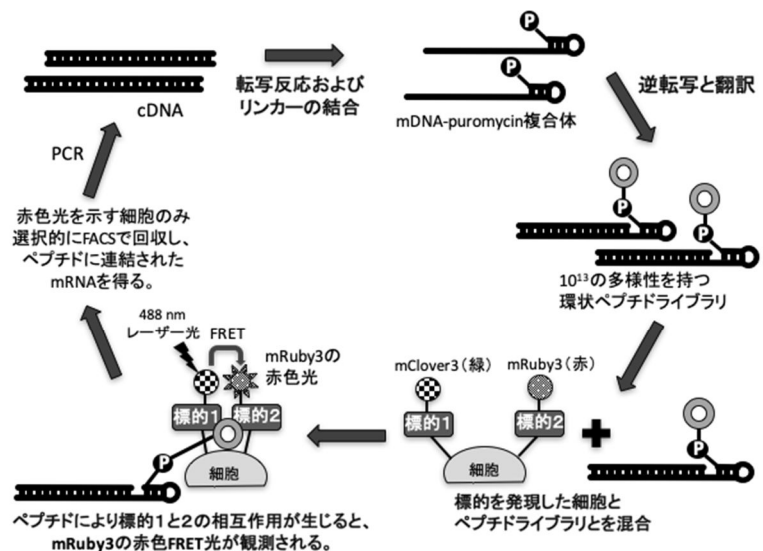


図3: タンパク質間相互作用を制御する特殊環状ペプチドのセレクション法  
RaPIDディスプレイ法における標的タンパク質2種類に蛍光ラベルを施し、両者の相互作用の変化をFRETで検出、セルソーターで分離することにより、相互作用を制御するペプチドを得ることができる。

#### 4. 研究成果

まず、戦略 A のために標的となる 2 種類のタンパク質に mClover3 (緑色蛍光タンパク質) および mRuby3 (赤色蛍光タンパク質) をそれぞれ連結したものの人工遺伝子を細胞に導入し、発現を試みたが十分な発現レベルを示す細胞株を得ることができなかった。そこで、本研究は最終的に戦略 B にフォーカスすることとした。IF28RA および IF10R2 のそれぞれを標的とする環状ペプチドの in vitro セレクションを RaPID ディスプレイ法により実施し、各標的に対する結合ペプチドの配列を取得した。得られた環状ペプチドを化学合成し、その結合力を解析したところ、いずれも結合解離定数 ( $K_D$ ) が数十 nM 程度の非常に強い結合力を示すことが明らかとなった。しかしながら、両ペプチドを PEG リンカーを介して連結したヘテロダイマーの化学合成を試みたところ、目的化合物の単離精製が困難であることが判明したため、最終的には 2 つのペプチドを抗体の Fc 領域の 2 箇所の一つずつ導入した分子の作成を試みた。ただし、セレクションによって得られた元々のペプチドは環状ペプチドであるが、Fc 領域への導入においては直鎖状としたものを導入している。現在、この分子の発現精製を完了し、各標的タンパク質への結合活性及び薬理活性の検証段階に入っている状況であり、本研究期間終了後も継続して解析を実施する予定である。タンパク質間相互作用を阻害するような分子と比べて相互作用を促進するような分子の開発はより困難であると考えられており、本手法により相互作用を促進するような分子を自由自在に開発できるようになれば新しい創薬手法として利用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------