

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19H02838
研究課題名(和文) 化学修飾ペプチドファージライブラリを駆使した標的指向型ペプチド創薬基盤の確立

研究課題名(英文) Construction of a Peptide Drug Discovery Platform Using Chemically Modified Peptide Phage Libraries

研究代表者
三原 久和 (Mihara, Hisakazu)
東京工業大学・生命理工学院・教授

研究者番号：30183966
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬代替分子の開発が求められる中、ファージディスプレイ法などの大規模ライブラリを利用した中分子ペプチド創薬が注目されている。本研究では、化学修飾により低分子を複合化したペプチドファージライブラリを駆使することにより、低分子のタンパク質活性中心指向性とペプチドのタンパク質表面認識特性を合わせもつ低分子-ペプチド複合体の獲得を実施することを目的とした。遺伝子工学的手法と有機合成的手法により低分子を修飾した種々のペプチドファージライブラリの構築に成功した。疾患に関連するタンパク質に対してスクリーニングを実施した結果、標的タンパク質に結合する低分子複合化ペプチドの獲得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、低分子修飾(化学的手法)とファージディスプレイ法(分子生物学的手法)を融合させて研究代表者等が独自に開発した標的指向型ファージディスプレイ法を駆使して、標的タンパク質に対して特異的なペプチド分子を創出するものであり、抗体医薬に続く新しい創薬モダリティとしてのペプチド創薬の発展に貢献するものとして、学術的および社会的意義の高い研究として位置づけられる。

研究成果の概要(英文)：As the development of alternative molecules to antibody drugs, the discovery of small molecule-peptide conjugates using large libraries such as phage display methods has been attracting attention. In this study, we aimed to obtain small molecule-peptide conjugates that possess both the protein active center directivity of small molecules and the protein surface recognition properties of peptides by utilizing peptide phage libraries. Various peptide phage libraries modified with small molecules were successfully obtained by genetic engineering and synthetic chemistry. By screening against disease-related proteins, small molecule-peptide conjugates that bind to the target proteins were obtained.

研究分野：生物分子化学

キーワード：ペプチド ファージ提示 薬剤複合体 タンパク質相互作用

1. 研究開始当初の背景

抗体は標的タンパク質に対して優れた特異性と結合活性を示すため、分子生物学研究において有用なツールとして利用されているだけでなく、近年では、さまざまな疾患の治療薬(抗体医薬)として幅広く利用されるようになった。しかしながら、高い製造コストや厳密な品質管理、血中投与の必要性から、抗体代替分子(医薬品)の開発が期待されている。

一方、低分子の阻害剤・リガンドはタンパク質の活性中心に結合することでタンパク質の機能を制御できるため、抗体同様に有用な分子ツールとして利用されている。低分子薬剤は有機合成により安価かつ安定に供給することができ、また経口投与が可能であることや優れた組織移行性から、現在でも多用されている医薬品であり、さらなる活用が期待されている。しかしながら、標的タンパク質と相同性の高い活性中心の構造をもつタンパク質(アイソフォーム)がある場合、低分子薬剤はこれらのタンパク質を見分けることができず、アイソフォームに非特異的に結合して副作用を示してしまう。低分子薬剤を活用して副作用のない抗体代替分子を開発するためには、タンパク質の活性中心だけでなく活性中心近傍のタンパク質表面も識別して、標的タンパク質のみに対する特異性を高めた分子設計・探索が必要である(図1)。

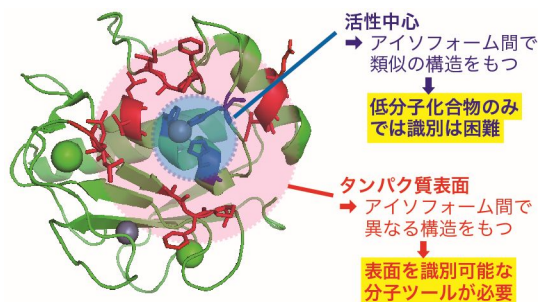


図1. 低分子薬剤を活用した抗体代替分子の開発に必要な要素の概念図。低分子薬剤はタンパク質の活性中心を標的にしているため、アイソフォームを識別するためには、低分子薬剤にタンパク質の表面認識能をもたせることが重要である。

2. 研究の目的

これまでに研究代表者等は、タンパク質表面を認識するための分子ツールとして設計ペプチドライブラリが有効であることを見出している。本研究では、ペプチドライブラリを構築するための手法としてファージディスプレイ法を用い、ファージ上に提示したペプチドライブラリに選択的の化学修飾により低分子薬剤などの誘導体を導入することにより、薬剤-ペプチド複合体ライブラリを構築することを目的とした。また、構築したライブラリを用いて、疾患に関連したタンパク質を標的としたスクリーニングを実施し、疾患関連タンパク質に特異的に結合して機能する薬剤-ペプチド複合体を探索し、標的指向型ペプチド創薬の基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

M13 ファージの一種で、外殻タンパク質 pIII にシステイン残基をもたない変異型 fd ファージを利用した。αヘリックスやβループなどの設計ペプチドを提示したファージライブラリを遺伝子工学的手法により調製した。ペプチドライブラリには、低分子誘導体を導入するためのシステイン残基を特定の位置に固定して導入した。ファージミドベクターにペプチドライブラリをコードした DNA 断片を挿入した後、大腸菌 TG1 株に形質転換し、培養上清からファージライブラリを回収した。

ペプチドライブラリに化学修飾するための低分子誘導体として、糖誘導体や酵素阻害剤の誘導体などの各種化合物を設計し化学合成した。それぞれの誘導体には、システイン側鎖のチオール基と選択的に反応させるために、プロモアセチル基等を導入した。合成した低分子誘導体をファージライブラリと反応させることにより、低分子化合物を修飾したペプチドファージライブラリを調製した。

スクリーニングの標的となるタンパク質を、大腸菌発現系を用いて調製した。ガン細胞の増殖などに関与するタンパク質として、ガラクトース結合タンパク質やアポトーシス抑制タンパク質などを選択した。発現プラスミドにより大腸菌 BL21 株を形質転換し、大量培養を行った後、アフィニティクロマトグラフィにより目的タンパク質を精製した。各タンパク質をビオチンで標識し、スクリーニングに用いた。

ストレプトアビジン-磁気ビーズにビオチン化タンパク質を固定し、低分子化合物を修飾したペプチドファージライブラリを相互作用させてスクリーニングを行った。結合の弱いファージを洗浄操作により除去した後、標的タンパク質に結合したファージを酸処理により溶出した。溶出したファージを大腸菌に感染させて増幅した後、低分子化合物の修飾を行い、次のラウンドのスクリーニングに用いた。3 ラウンドのスクリーニングの後、回収したファージをクローニングし、ファージミドベクターを抽出して DNA 配列を解析することによりペプチド配列を同定した。同定したペプチドを化学合成し、低分子化合物を修飾した後、標的タンパク質との相互作用を解析した。

4. 研究成果

α ヘリックスや β ループなどの種々の設計ペプチドを提示したファージライブラリを調製することに成功した。形質転換効率率はライブラリの理論的な多様性の 10 倍程度であり、調製したペプチドファージライブラリが十分な多様性をもつことが明らかとなった。

ペプチドライブラリに修飾するための各種低分子誘導体の合成に成功した。合成した化合物は ^1H NMR により同定した。また、合成した低分子化合物をペプチドファージライブラリに選択的かつ定量的に修飾できる条件を見出し、低分子化合物を修飾したペプチドファージライブラリの調製に成功した。

ガラクトース結合タンパク質やアポトーシス抑制タンパク質などを腸菌発現系を用いて調製することに成功した。SDS-PAGE 解析により、アフィニティクロマトグラフィ精製したタンパク質がスクリーニングに用いるのに十分な純度をもつことが明らかとなった。

ストレプトアビジン-磁気ビーズに固定したタンパク質を用いて 3 ラウンドのスクリーニングを行った結果、特定のペプチド配列が濃縮されることが明らかとなった。同定したペプチド配列を化学合成し、低分子化合物を修飾した後、標的タンパク質との相互作用を解析した結果、スクリーニングにより得られた低分子修飾ペプチドが標的タンパク質に対して高い選択性と結合活性を示すことを明らかにした。

以上の結果から、ファージ上に提示したペプチドライブラリに選択的修飾により低分子薬剤などの誘導体を導入して薬剤-ペプチド複合体ライブラリを構築することに成功し、疾患に関連したタンパク質に選択的かつ強く結合する薬剤-ペプチド複合体を探索でき、標的指向型ペプチド創薬の基盤を確立することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Anananuchatkul Teerapat, Chang Iou Ven, Miki Takayuki, Tsutsumi Hiroshi, Mihara Hisakazu | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Construction of a Stapled α -Helix Peptide Library Displayed on Phage for the Screening of Galectin-3-Binding Peptide Ligands | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 ACS Omega | 6. 最初と最後の頁 5666 ~ 5674 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.9b03461 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Anananuchatkul Teerapat, Tsutsumi Hiroshi, Miki Takayuki, Mihara Hisakazu | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 hDM2 protein-binding peptides screened from stapled α -helical peptide phage display libraries with different types of staple linkers | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 127605 ~ 127605 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2020.127605 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Hashimoto Masahiro, Miki Takayuki, Chang Iou Ven, Tsutsumi Hiroshi, Mihara Hisakazu | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Selection of fluorescent biosensors against galectin-3 from an NBD-modified phage library displaying designed α -helical peptides | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 127835 ~ 127835 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2021.127835 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Teerapat Anananuchatkul, Takayuki Miki, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara |
| 2. 発表標題 Screening of peptide ligands for Galectin-3 using a designed stapled α -helix peptide phage library |
| 3. 学会等名 The 56th Japanese Peptide Symposium |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 滝間宏基, Anananuchatku Teerapat, 梶原圭悟, 三木卓幸, 三原久和, 堤浩 |
| 2. 発表標題 ベンゼンスルホンアミド修飾環状ペプチドフェージライブラリの構築 |
| 3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 橋本匡浩, 三木卓幸, Chang lou Ven, 堤 浩, 三原久和 |
| 2. 発表標題 蛍光修飾フェージライブラリを用いたスクリーニングによるgalectin-3検出蛍光バイオセンサーの開発 |
| 3. 学会等名 第31回バイオ・高分子シンポジウム |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Keigo Namii, Takayuki Miki, Hisakazu Mihara |
| 2. 発表標題 Construction of photoreactive group-modified phage libraries and selection against hDM2 |
| 3. 学会等名 The 58th Japanese Peptide Symposium |
| 4. 発表年 2021年 |

〔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 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 堤 浩 (Tsutsumi Hiroshi) (70398105) | 東京工業大学・生命理工学院・准教授 (12608) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究 分 担 者 | 三木 卓幸 (Miki Takayuki) (20823991) | 東京工業大学・生命理工学院・助教 (12608) | |

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 |
|---------|---------|
| | |