

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15696

研究課題名(和文) 中分子創薬を指向したTag-assistedファージディスプレイ法の開発

研究課題名(英文) Development of Tag-assisted Phage Display for screening of peptide drug

研究代表者

三木 卓幸 (MIKI, Takayuki)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：20823991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ファージディスプレイ法は標的分子と結合するペプチド配列を探索する優れた手法である。しかし、単離・精製が困難な膜蛋白質に適用が困難という大きな課題が残されていた。そこで、筆者はファージにNi錯体を化学修飾することで、細胞表層に発現するHis-tag融合蛋白質に選択的なりガンド探索ができると考えた。まず、ファージに対する化学修飾反応を確立するため、蛍光色素NBDを用いて反応条件を確立した。この結果をもとにNi錯体をファージに修飾し、His-tag融合hDM2に対してペプチドリガンドの探索を行った。その結果、Ni錯体を修飾した場合、有意に標的蛋白質と結合するファージが濃縮されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファージディスプレイ法は、中分子医薬品開発の実績のある基盤技術である。しかし、リガンド探索において、バイアスが強い点や膜蛋白質に適用できない点など致命的な欠点も多い。そのため、これらを解決したりガンド探索法は、創薬の革新的技術となり得る。本研究で開発した手法は効率的にペプチドリガンドを探索でき、次世代の創薬技術の前進的な手法である。本手法の発展と更なる改良によって、より実践的な中分子リガンド探索法に進化すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The phage display is an excellent method to discover peptide sequences that bind to target molecules. However, it has been challenging to apply this method to membrane proteins that are difficult to be isolated and purified. Therefore, the author attempted to obtain peptide ligands selective for target proteins expressed on the cell surface by chemically modifying phage with Ni complexes. First, to establish the chemical modification reaction on phage, the reaction conditions were elucidated using the fluorescent dye NBD. Based on these results, the author modified the phage with Ni complexes and performed selection of peptide ligands for His-tag fused hDM2. The results showed that the modification of Ni complexes significantly enriched the phage to bind the target protein.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ファージディスプレイ 膜蛋白質 His-tag Ni(II)錯体 ペプチド

### 1. 研究開始当初の背景

創薬において、ペプチドを用いた中分子医薬品は注目を浴びる。これは、抗体医薬品の利点である高い標的特異性を有し、同時に、高コストや投与法の制限等の抗体医薬の欠点を克服できる(Nielsen et al, Chem. Rev. 2017)。その新規リード中分子の探索には、ファージディスプレイ法が有用である。ランダムなペプチド配列を提示したファージライブラリーの中から、標的蛋白質と結合するファージのみを回収することで、リードペプチド配列が得られる。特に、近年ではファージの遺伝子工学的な改変により、環状ペプチドのスクリーニングが可能となった。これにより、標的蛋白質と高い親和性で結合できる中分子医薬品のリードを探索できるようになった(Heinis et al, Nat. Chem. Biol. 2009)。

しかし、ファージディスプレイ法は万能ではなく、膜蛋白質への適応が困難という大きな課題がある。その主な要因は、膜蛋白質の単離・精製が困難なことである。更に、単離後の膜蛋白質は本来の構造と異なる場合があるため(Gray et al, Chem. Rev. 2014)、精製膜蛋白質に対するファージディスプレイ法は有効的ではない。その為、生細胞に発現した膜蛋白質を単離精製せずにスクリーニングする方法(Whole cell panning)は有効と思われる。しかし、細胞膜上は標的以外の蛋白質や脂質、糖等が共存する複雑な環境であるため、標的蛋白質に特異的なペプチドの探索は非常に困難である。更に、膜蛋白質は中分子医薬の主な標的となることから、これらの問題を解決する技術が求められる。

### 2. 研究の目的

申請者は、複雑な細胞表層でも標的蛋白質選択的なスクリーニングを目指して『Tag-assisted Phage Display 法』を考案した。これは、通常ファージディスプレイ法に、分子生物学で多用される His-tag と金属錯体との相互作用を組み込んだ新規の方法である。この方法では、ランダム配列近傍に金属錯体を化学修飾したファージライブラリーを調製し、His-tag 融合膜蛋白質を発現した細胞に添加する。His-tag と金属錯体間の相互作用によって、錯体修飾ファージは、複雑な環境の中で His-tag 融合蛋白質に近接できる(図1)。ファージを標的蛋白質に誘導することで、ファージと標的蛋白質の衝突確率を高められるだけでなく、洗浄条件を厳しくすることができ、非特異的な吸着によるバックグラウンドを軽減できる。

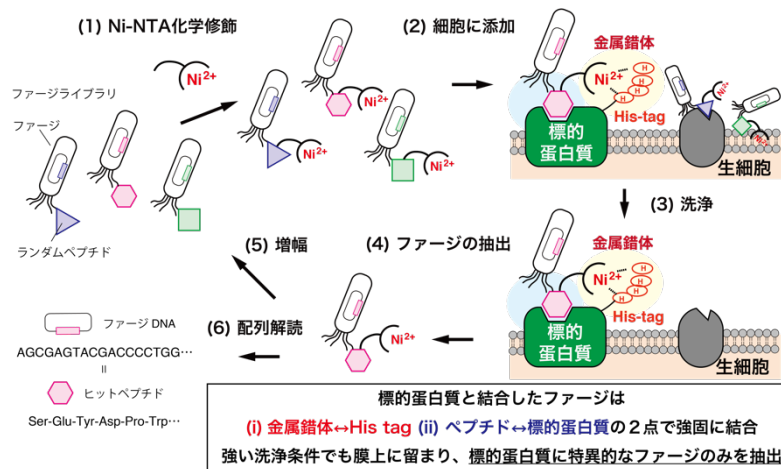


図1. Tag-assisted phage display 法の概念図

Ni 錯体と His-tag 間の相互作用、標的蛋白質とペプチド間の相互作用が協奏的に働き、ヒットペプチドを提示するファージはより強固に細胞に結合する

### 3. 研究の方法

本研究は、(step 1)ファージライブラリーの構築、(step 2)修飾化合物の合成、(step 3)化学修飾条件の確立、(step 4)His-tag 融合蛋白質の調整、(step 5)His-tag 融合蛋白質に対するセレクション、(step 6)シーケンス解析、の6段階から構成される。

本手法を確立するためには、まずファージに機能性分子を化学修飾する条件(step4)を検討する必要があった。そこで、蛍光色素を用いて修飾条件を確立し、実際に修飾ファージを用いてセレクションを試みることにした([成果1] 蛍光色素 NBD 修飾ファージライブラリーの構築と Gal-3 に対するセレクション)。この後に、Ni 錯体修飾ファージライブラリーの構築と、His-tag 融合蛋白質を標的にしたセレクション([成果2] Ni 錯体修飾ファージライブラリーの構築と His-hDM2 に対するセレクション)を行った。

### 4. 研究成果

[成果1] 蛍光色素 NBD 修飾ファージライブラリーの構築と Gal-3 に対するセレクション  
 蛍光バイオセンサーは、標的分子を検出・可視化する重要な分子ツールであり、リガンドに蛍光色素を修飾することで構築される。しかし、リガンドをもたない標的蛋白質に対してはセンサーを構築できない。そこで、本実験では、(目的1)ファージの化学修飾反応の条件を確立し、(目的2)標的と結合する蛍光修飾ペプチドを探索しバイオセンサーを獲得する新たな手法を確立することにした。

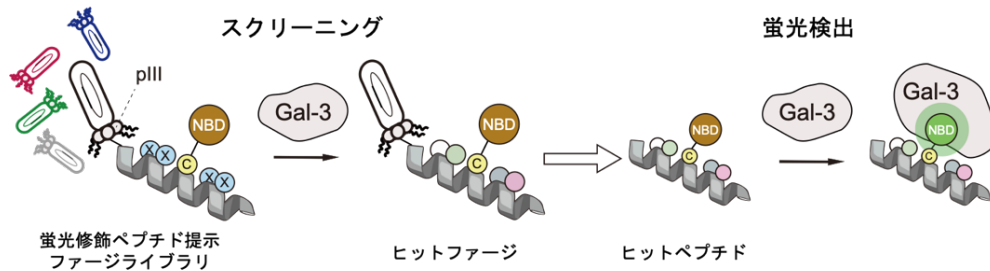


図2. NBD 修飾ファージライブラリによる Gal-3 に応答するバイオセンサーの探索

まず、ファージに対する部位特異的な化学修飾を確立した。プロモアセチル基を有する NBD 蛍光色素を合成し、ファージに添加した。ここでは、 $\alpha$ ヘリックスの片面にランダム残基と化学修飾のためのシステイン残基を含むペプチドをファージの外殻蛋白質 pIII に導入している (図 2)。ファージへの化学修飾を SDS-PAGE 及び蛍光検出によって確認した結果、ペプチドを導入した pIII 外殻蛋白質から蛍光が観察され選択的に NBD が修飾されることが明らかとなった。

次に、糖尿病などの疾患に関わるガレクチン 3 (Gal-3) を標的蛋白質として、NBD 修飾ライブラリを用いた蛍光修飾ペプチドのセレクションを行った。具体的には、Gal-3 を固定化したプレートに NBD 修飾ファージライブラリを添加し、結合するファージのみを回収した。これを大腸菌に感染させ、増幅した。これを 5 回繰り返す、最終的に濃縮されたファージを獲得した。その中で、Gal-3 に有意に結合するファージを ELISA 法によって同定した。これらのヒットした蛍光修飾ペプチドは Gal-3 の濃度に応じて蛍光強度が増加し、センサーとして働くことが明らかとなった (図 3-a)。さらに、この蛍光応答は目視で観察することができた (図 3-b)。

本論文は、雑誌 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* で発表された。

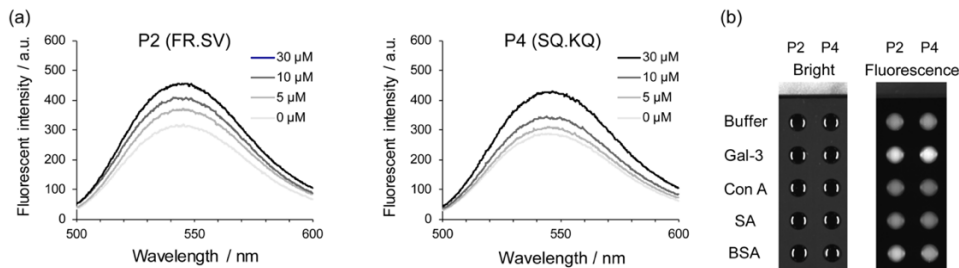


図2. ヒット NBD 修飾ペプチドの蛍光応答性評価

(a) Gal-3 溶液中でのヒットペプチドの蛍光スペクトル (b) マイクロスライドガラス上でのヒットペプチドによる Gal-3 検出

### [成果 2] Ni 錯体修飾ファージライブラリの構築と His-hDM2 蛋白質に対するセレクション

成果 1 での知見を得て、Ni 錯体を修飾したファージライブラリの構築を実施した。

Ni (II) 錯体として、Ni (II)-monoNTA (ニトリロ三酢酸) 錯体、Ni (II)-IDA (イミノ二酢酸) 錯体と Ni (II)-bisNTA 錯体を選択した (図 4A)。これらの His タグとの親和性は bisNTA >> IDA > NTA の順に大きい。ファージのランダムペプチド (XCX6CX) 部位近傍に位置する 2 つのシステインに対して、Ni (II) 錯体部位を有した 3 種の架橋剤を部位選択的に化学修飾した (図 4B)。

次に、Ni (II) 錯体修飾ファージライブラリを用いてスクリーニングを行った。モデルとして hDM2 (human Double Minute2) を選択した。まず Ni (II) 錯体の修飾で、ファージと標的の親和性が向上するか検討した。His-hDM2 に対し、3 種の Ni (II) 錯体修飾ファージを添加し、洗浄の後、標的蛋白質と結合したファージを回収した。その結果、Ni (II) 錯体修飾の有無で回収率に最大約 540 倍もの差が生じた。したがって Ni (II) 錯体と His タグ間の相互作用で、ファージがより強く His-hDM2 へ結合したことが確認された。

3 ラウンドのスクリーニングの後に回収されたファージのペプチド配列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。hDM2 は強く結合するペプチドリガンド (FCEYWAQLCS) が既知である。特に F, W, L の 3 アミノ酸残基は結合に重要であるため、“回収された配列”と“FWL 配列”の類似度を

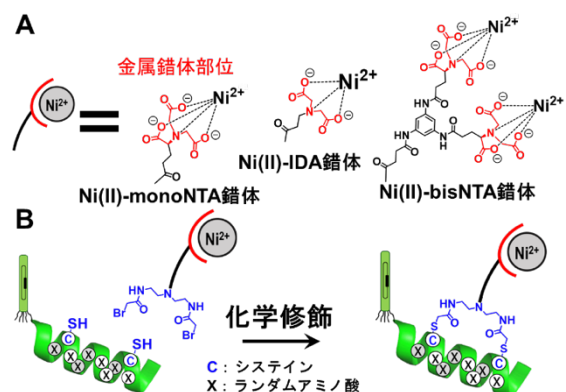


図4. ファージライブラリに対する Ni(II) 錯体修飾

(A) 修飾する Ni(II) 錯体の分子構造、(B) XCX6CX ペプチドを導入したファージに対する化学修飾

アミノ酸行列 BLOSUM により計算し比較することで評価した。Ni(II)-NTA・Ni(II)-IDA 錯体を修飾した際には類似度の高いプロット (類似度 10 以上, 黒色) が濃縮される傾向にあった (図 5)。一方で錯体未修飾・Ni(II)-bisNTA 錯体を修飾した場合は、それらのプロットが淘汰される傾向にあった。Ni(II)-bisNTA 錯体は His タグとの親和性が高すぎるために、ファージと標的の親和性に関係なく感染バイアスにより一部の配列が濃縮されたと考えられる。以上の結果から His タグと適切な親和性の Ni(II) 錯体を化学修飾することで、hDM2 に特異的なペプチド配列を濃縮できることが示唆された。

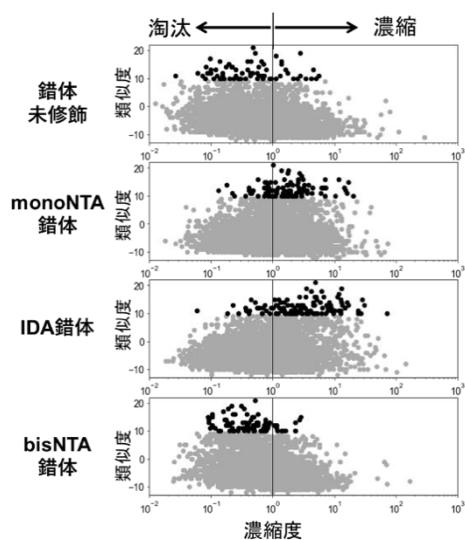


図 5. His-hDM2 に対する Tag-assisted phage display 法の結果、monoNTA 錯体及び IDA 錯体を修飾した場合、有意にヒットペプチドに類似した配列が濃縮された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Teerapat Ananuchatkul, Iou Ven Chang, Takayuki Miki, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara	4. 巻 5
2. 論文標題 Construction of a Stapled $\alpha$ -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 Masahiro Hashimoto, Takayuki Miki, Iou Ven Chang, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara	4. 巻 37
2. 論文標題 Selection of fluorescent biosensors against galectin-3 from an NBD-modified phage library displaying designed $\alpha$ -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
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 Masahiro Hashimoto, Takayuki Miki, Iou Ven Chang, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara
2. 発表標題 A fluorophore-conjugated phage library for screening of a peptide-based fluorescent biosensor for Galectin-3
3. 学会等名 The 56th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta Seko, Takayuki Miki, Teerapat Ananuchatkul, Hiroshi Tsutsumi, Hisakazu Mihara
2. 発表標題 Improvement of phage binding ability to target proteins in combination with his-tag and Ni(II)- complex interaction
3. 学会等名 The 56th Japanese Peptide Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋本 匡浩, 三木 卓幸, Iou Ven Chang, 堤 浩, 三原 久和
2. 発表標題 9. 蛍光修飾 ヘリックス設計ペプチドを提示したファージライブラリによるgalectin-3検出蛍光バイオセンサーの探索
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬古 健太, 寛 翔太, 三木 卓幸, Iou Ven Chang, 堤 浩, 三原 久和
2. 発表標題 10. Ni(II)-NTA修飾ペプチドを提示したファージライブラリの構築とHisタグ融合蛋白質に対するリガンドスクリーニング
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------