

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760540
 研究課題名（和文） 高度タンパク質固定化技術を用いた分子標的ペプチド薬剤スクリーニングシステムの創製
 研究課題名（英文） Development of molecular target peptide screening system by using a highly effective protein immobilization
 研究代表者
 今中 洋行（IMANAKA HIROYUKI）
 岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
 研究者番号：10379711

研究成果の概要(和文):申請者らが確立してきた高度機能的なタンパク質固定化技術を用いて、ガン関連タンパク質のひとつである FoxP3 の機能ドメインをターゲットとした部位特異的ペプチドのスクリーニングシステム構築の検討を行った。その結果、FoxP3 の機能的な固定化を実証するとともに、ランダムペプチドライブラリーよりターゲットタンパク質に親和性を示すだけでなく、その機能を有意に阻害しうる複数の候補ペプチド薬剤の単離に成功した。

研究成果の概要(英文): We have examined a novel peptide drug screening system by which the affinity peptides that bind to functional domain of FoxP3 (target protein) could be effectively obtained by applying highly functional protein immobilization method developed in our group. As the results, functional immobilization of trimmed FoxP3 was verified at first. In addition, several affinity peptides that could significantly inhibit the binding of relevant oligo DNA to functional domain of FoxP3 were successfully isolated from T7 phage random peptide library.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ペプチド，固定化，相互作用，ELISA，スクリーニング，ランダムライブラリー，創薬，分子標的

1. 研究開始当初の背景

先端医療としての分子標的薬剤について、短期間、低コストで生産可能な低分子化合物への関心が近年高まっている。その中でも、

ペプチド薬剤は、抗体医薬に比べて保存性が高いだけでなく、免疫系における非特異的な相互作用もみられないことから、薬剤の有力な候補の一つであり、注目を集めている。し

かし、そのスクリーニング手法に関しては、現在の主流である *in silico* や *in vivo* 解析法のそれぞれについて、いくつか解決すべき問題点がある。したがって、それらを同時に解決しうる革新的なペプチドスクリーニング手法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

申請者らにより確立された、高度にタンパク質の機能を維持しつつ固体表面上に固定化できる手法を、ペプチド医薬開発に応用可能なペプチド薬剤のスクリーニングに適用する。そして、従来法では困難であった部位特異的な候補ペプチド薬剤取得の基盤技術を確立し、一連のスクリーニングシステムの一般性を向上させることを目的とする。このとき、ターゲットタンパク質として制御性 T 細胞特異的なタンパク質である FoxP3 を用いる。

3. 研究の方法

(1) 各種変異型ヒトFoxP3タンパク質の調製

ヒト細胞の totalRNA を鋳型として oligodT プライマーを用いた逆転写PCRを行い、ターゲット遺伝子である FoxP3 および FoxP2 の各 cDNA を得た。これをプラスミドベクターに挿入した後、FoxP3 の DNA 結合領域 (Forkhead domain : FHD) を含む各種断片を調製した。このとき、遺伝子工学的手法を用いて親水性ポリスチレン高親和性ペプチドを連結しておいた。これを pET22b(+) ベクター中に挿入し、各種タンパク質発現用ベクターを構築した。タンパク質発現用宿主としては *E. coli* Rosetta2 (DE3) などを用いた。

(2) 各種FoxP3タンパク質とDNAとの相互作用解析

親水性ポリスチレン製の96穴マイクロプレートを用いたELISAにより、調製したDNA結合

ドメイン (FHD) と末端をビオチン標識した二本鎖オリゴDNAとの相互作用の評価を行った。相互作用の形態としては、タンパク質を固体表面上に固定化した後にDNAを添加する Conventional ELISA法および溶液中であらかじめタンパク質とDNAを混合した後に固定化する Two step ELISA法を用いた。

(3) T7ファージ提示ランダムペプチドライブラリーの調製

まず One cycle PCR によりランダムペプチドライブラリー配列をコードする一本鎖鋳型オリゴDNAを二本鎖DNAとした。続いて EcoRI および HindIII を用いて制限処理し、得られた DNA 断片を T7 select vector arm へ挿入した後、T7 Packaging Extract と混合させ、T7ファージ提示ランダムペプチドライブラリーを構築した。なお、ファージ表面に提示させるランダム配列 (12アミノ酸) の上流にフレキシブルリンカー (GGGS) が挿入される形とした。

(4) FoxP3タンパク質特異的ペプチドのスクリーニング

タンパク質を固定化後にファージライブラリーと相互作用させる場合およびタンパク質とファージライブラリーを相互作用させ、親水性PSプレート上に固定化する場合のそれぞれについて親和性ペプチドのスクリーニングを行った。固定化後、プレートを洗浄し、大腸菌BL21を添加し、感染・増幅させた。溶菌後のライセートを用いて再度タンパク質と相互作用させた。これら一連の作業を1サイクルとし、5回繰り返すことによって、親和性ペプチドを提示するファージクローンの絞り込みを行った。その際、相互作用させるタンパク質の濃度、ファージライブラリーの前処理について異なる条件を用いて検討を行った。

(5) FoxP3 タンパク質親和性ペプチドの親和性評価

プラークより単離したファージ懸濁液を用いて実際にターゲットタンパク質との相互作用が見られるかどうかを phage ELISA および表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて評価した。なお、SPR においては CM5 センサーチップを用いた。

4. 研究成果

ヒト細胞から抽出した totalRNA より FoxP3, FoxP2 の cDNA を取得し、これを用いて発現用ベクターを構築し、各種大腸菌を宿主としてタンパク質発現を試みたところ、*E. coli* Rosetta2 (DE3) を用いた場合で可溶化することがわかった。さらに、精製した可溶性タンパク質を用いたゲルシフトアッセイにより FHD のみを発現させたタンパク質が DNA との複合体形成能を維持していることを確認した。次に親水性 PS プレートを用いて、各種 FOXP タンパク質とビオチン化二本鎖オリゴ DNA との特異的相互作用の解析を行ったところ、あらかじめタンパク質と DNA を溶液中でインキュベーションした後に表面親和性ペプチドの特性を生かして高度選択的に固定化する Two step ELISA 法を用いることで、Conventional ELISA 法に比べて非常に高感度な相互作用の検出が可能であることがわかった。どちらの手法を用いても検出が可能であったことから、ターゲットタンパク質である FoxP3 タンパク質の DNA 結合ドメインである FHD のみの発現であっても、申請者らの確立したタンパク質の高度固定化法によりドメインの構造を維持しつつ固体表面上に固定化できることがわかった。

続いて、新規に構築した T7 ファージ (Novagen) にランダムペプチドライブラリーを用いて、PS-tag 連結 FoxP3 に親和性を示す

ペプチドのスクリーニングを行った。5 サイクルのパニング後に得られたファージライセートを用いて得られたプラークから 100 個以上のファージを単離し、ダイレクトシーケンシングにより FoxP3 親和性候補ペプチドのアミノ酸配列を決定した。その結果、各サイクルでのパニング操作前に非特異的な吸着を極力避けるために PS プレートでファージライセートを処理することによって高効率な親和性ペプチドの濃縮が示唆され、実際に数種類の配列のみが得られた。二本鎖 DNA との相互作用解析の結果より予測されたように、本固定化法は極めて実用的であると考えられた。

次に、単離したファージ溶液を用いて、ファージ ELISA による親和性評価を行ったところ、FoxP3 に対する有意な特異性が見られた。さらに、提示ペプチドのほとんどがターゲットとする DNA 結合ドメインに対する DNA 結合阻害活性を有することが示唆された。また、FoxP3 をセンサーチップ上に固定化し、表面プラズモン共鳴法によるタンパク質-ペプチド間相互作用解析を行ったところ、特に 2 種類の親和性候補ペプチドについて、FoxP3 に対する高い結合特性および低い解離特性を有することがわかった。したがって、本手法を用いることで、従来のスクリーニング方法では取得が困難であった、様々なガン関連、または腫瘍関連タンパク質の機能を部位特異的に抑制するペプチドをスクリーニングすることが可能であることが強く示唆された。今後はさらに、スクリーニング条件及び評価法の追及や新たなターゲットタンパク質を用いたスクリーニングを検討することにより、本手法の一般性の向上が見込めると考えられる。

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0件)

〔学会発表〕(計6件)

- ① 前川 真光, 今中 洋行, 今村 維克, 近藤 英作*, 中西 一弘 (*岡山大院医歯薬) ヒト FOXP3-DNA 相互作用の迅速検出システムの構築, 第 60 回日本生物工学会, 2008/8/29, 宮城・東北学院大学
- ② 今中 洋行, 前川 真光, 今村 維克, 近藤 英作*, 中西 一弘 (*岡山大院医歯薬), ヒト由来転写因子と DNA との相互作用解析システムの検討, 化学工学会第 40 回秋季大会, 2008/9/24, 宮城・東北大学
- ③ 今中 洋行, 前川 真光, 今村 維克, 近藤 英作*, 中西 一弘 (*岡山大院医歯薬), PS-tag 連結タンパク質-DNA 間相互作用検出システムの検討, 日本化学会第 89 春季年会, 2009/3/29, 千葉・日本大学
- ④ 今中 洋行, 國方 俊暢, 上崎 英範, 山隅 大輔, 今村 維克, 中西 一弘, PS-tag 連結タンパク質の部位特異的固定化を利用したバイオ分子間相互作用検出系の検討, 日本化学会生体機能関連 (24 回)・バイオテクノロジー (12 回) シン

ポジウム, 2009/9/15, 福岡・九州大学

- ⑤ 今中 洋行, 上崎 英範, 國方 俊暢, 今村 維克, 中西 一弘, PS-tag 連結タンパク質を利用したバイオ分子間相互作用解析, 化学工学会第 41 回秋季大会, 2009/9/16, 広島・広島大学
- ⑥ 今中 洋行, 國方 俊暢, 山之内 麻衣, 今村 維克, 中西 一弘, クッションタンパク質を利用したペプチド-タンパク質間相互作用検出系の検討, 第 61 回日本生物工学会大会, 2009/9/24, 愛知・名古屋大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今中 洋行 (IMANAKA HIROYUKI)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号: 10379711