

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710210

研究課題名（和文）マイクロRNAの発現量を制御する特殊環状ペプチド創薬

研究課題名（英文）In vitro selection of non-standard cyclic peptides that regulate maturation of miRNAs

研究代表者

加藤 敬行（TAKAYUKI KATOH）

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：90567760

研究成果の概要（和文）：

本研究では、miRNA 前駆体に特異的に結合し、その成熟化を阻害する特殊環状ペプチド医薬の探索を行った。ペプチドの探索手法としては、遺伝暗号リプログラミング法による特殊ペプチド翻訳合成法と mRNA ディスプレイ法を組み合わせた独自の方法（=RaPID system）を用いた。これまでに、特殊ペプチドライブラリから miR-21 前駆体に結合するペプチド配列を得ることに成功したため、現在それらのペプチド配列の特異性や結合力の評価を引き続き行っている。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we tried to develop non-standard cyclic peptides that can inhibit the maturation of miRNA precursor by using RaPID display method, which is a combination of genetic code reprogramming and mRNA display. So far, we have successfully obtained several cyclic peptides that have binding affinity to miR-21 precursor. Evaluations of specificity and binding affinity of the peptides are under way.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学、生物分子科学

キーワード：ケミカルバイオロジー・マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

ペプチド医薬は、従来の低分子医薬並みの低い分子量と抗体医薬に匹敵する高い特異性を併せ持つことから、次世代医薬品として近年非常に注目が集まっている。特に、本研究で用いた特殊ペプチドは生体内でのタンパク質翻訳合成に通常用いられる 20 種類の

アミノ酸以外のアミノ酸を含むペプチドのことであり、さらに大環状構造を含むことによってペプチダーゼ耐性や細胞膜透過性、腸管吸収性の獲得が期待され、未修飾直鎖型ペプチドと比較して医薬品としてのポテンシャルが飛躍的に高まると期待される。例えば、天然から単離され実際に医薬品として用い

られているシクロスポリン（免疫抑制剤）やバシトラシン A（抗生物質）などのペプチド医薬にも大環状構造をはじめとする様々な特殊構造が含まれている。しかしながら、従来のペプチド医薬探索手法はこのような天然から単離されたペプチドの薬理活性を一つ一つ検証してゆくと言う古典的で非効率的な手法に頼っており、現在までに実用化されているペプチド医薬の発見は偶然の産物と言うべきものがほとんどであった。

そのような現状を打破し、より効率的に高活性な特殊ペプチド医薬を探索できる手法の開発を目指して、代表者らの研究室ではこれまでに「遺伝暗号リプログラミング法」を用いた特殊ペプチド翻訳合成法を確立し、様々な非天然アミノ酸や大環状構造のペプチドへの導入を達成してきた。さらに、ランダム配列を含む mRNA を翻訳させることで、 10^{13} を超える多様性をもつ特殊ペプチドライブラリを合成することを可能にした。そして、このような多様な特殊構造をもった特殊ペプチドライブラリを mRNA ディスプレイ法と組み合わせることで、標的分子に特異的に結合する活性種を効率的に探索できるようになった。実際に、現在では約 1-2 週間という短期間で標的分子に対して数十 nM-数十 pM という解離定数をもつ高活性特殊ペプチドを取得することができるまでになっている。我々はこの手法を RaPID (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) ディスプレイと名付けた。代表者の研究室では、これまでに 20 種類を超えるタンパク質標的 (E6-AP、Sirt2、Akt-2、EpCAM、JMJD2 など) に対して結合する特殊ペプチドの探索を行っており、その成功率は 90% 以上に上り、非常に高い信頼性をもつ技術であることを実証している。今回標的とした miRNA はこの RaPID ディスプレイの技術をはじめタンパク質以外の標的に適用させた事例となり、新しい試みである。

miRNA は、ノンコーディング RNA の一種であり、これまでにヒト細胞において 1500 種類以上の存在が報告されており、それぞれの miRNA は塩基配列特異的にターゲット mRNA を認識し、その翻訳抑制を引き起こすことが知られている。近年の報告によると、miR-17-92 クラスターや miR-21、miR-155 などは癌抑制遺伝子の翻訳を抑制することによって細胞の癌化を促進することが明らかとなっており、これら一群の miRNA は oncomir と呼ばれている。実際に様々な癌細胞において oncomir の発現量が顕著に上昇していることが知られている。逆に let-7 や miR-15a、miR-16 のように癌の発現を抑制する方向に働く miRNA の存在も知られている。また、肝臓に特異的に発現する miR-122 は脂質やコレステロール代謝の制御に関与

しているほか、HCV のゲノム RNA の複製を助ける働きがある。このように miRNA は癌をはじめとする様々な疾患や生体機能の調節に深く関わっていることが明らかになってきている。そこで、これらの miRNA を標的として、その発現量を自在にコントロールすることが可能になれば癌化の抑制や抗ウイルス効果をもたらすことが可能となると考えられる。

細胞内における miRNA の発現量は、転写の効率のみならず転写後の前駆体のプロセシング効率の違いによっても調節されていることが知られており、たとえ転写量は同じであってもプロセシングの効率は細胞・組織の種類によって大きく異なることがわかっている。核内で転写された miRNA 前駆体 (primary-miRNA: pri-miRNA) は、Drosha/DGCR8 複合体によってまず pre-miRNA へとプロセスされ、さらに核外へ輸送された後に Dicer/TRBP 複合体によって最終的に成熟 miRNA へと変換されている。そこで、本研究ではこれら miRNA 前駆体に特異的に結合する特殊環状ペプチドを in vitro セレクション法によって取得し、前駆体から成熟体へのプロセシング過程を人工的に制御することによって、miRNA 成熟体の発現量をコントロールし、抗癌作用・抗ウイルス作用を実現することを目指した。

また、KSRP、hnRNP A1、lin28 などのように生体内で miRNA 前駆体に結合し成熟化を制御しているタンパク質因子の存在も近年明らかとなっている。KSRP は miR-1、15、16、21、let-7 などの miRNA の成熟化、hnRNP A1 は miR-18a の成熟化を促進する効果がある。一方、lin28 は let-7 前駆体の 3'末端にオリゴ U を付加することによって分解を促進し、miRNA の成熟化を抑制する効果がある。したがって、これらの miRNA 結合型タンパク質因子も特殊環状ペプチド創薬のターゲット分子となりうる。すなわち、KSRP や lin28 等に特異的に結合し、その機能を制御するような特殊環状ペプチドを取得できれば、その制御下にある miRNA の発現量をコントロールすることが可能となる。lin28 は iPS 細胞を作製する際に必要な因子の一つとしても挙げられており、let-7 前駆体や lin28 に結合する特殊環状ペプチドによって iPS 化や細胞分化をコントロールする効果を得られることも期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト miRNA 前駆体または miRNA 前駆体結合タンパク質に特異的に結合する特殊環状ペプチドの in vitro セレクションを RaPID ディスプレイ法を用いて行い、前駆体から成熟体 miRNA へのプロセシング過程を制御（抑制または促進）する機能を持

つ特殊環状ペプチドの取得を目指した。具体的には、(1)癌化を促進する miRNA (miR-17-92 クラスター、miR-21、miR-155) の成熟化を抑制する特殊環状ペプチド、(2)癌化を抑制する miRNA (let-7、miR-145) の成熟化を促進する特殊環状ペプチド、(3)C型肝炎ウイルス(HCV)の複製を促進する miRNA (miR-122) の成熟化を抑制する特殊環状ペプチド等の取得を目指した。また、(4)miRNA 前駆体のみならず、miRNA 前駆体に結合するタンパク質因子(lin-28)を標的とする阻害剤ペプチドの探索も行った。得られた特殊環状ペプチドについては、その結合力や特異性、実際の阻害活性の測定を行い、新規抗がん剤・抗ウイルス剤としての開発を試みることにした。

3. 研究の方法

(1)試験管内セレクションに使用する特殊環状ペプチドのライブラリは、代表者の所属研究室で独自に開発されたフレキシザイム技術を用いた遺伝暗号リプログラミング法によって作製した。開始 tRNA にメチオニンの代わりにクロロアセチル基を導入した α -アミノ酸をチャージさせ、これを用いて翻訳を開始させることによりペプチド鎖 N 末端にクロロアセチル基を導入した。さらに、ペプチド鎖下流にシステインを配置することにより、N 末端のクロロアセチル基とシステイン側鎖を分子内で反応させ、チオエーテル結合を形成させて環状化した。開始コドンとシステインコドンに対応する箇所以外のコドンについては配列をランダム化し、ペプチドのアミノ酸残基数は 4~12 残基とした。ペプチドの翻訳合成には大腸菌由来の再構築無細胞翻訳系 (FIT システム) を用いた。

(2)in vitro セレクションの手法としては mRNA ディスプレイ法を用い、ビーズ担体に固定化した miRNA 前駆体 (または miRNA 結合タンパク質) に対して特殊環状ペプチドのライブラリを加え、結合能を有するペプチドのみを回収した。

このとき、鋳型 mRNA ライブラリの 3'末端にピューロマイシンを結合させておき、リボソーム内で翻訳された特殊ペプチドと mRNA とをピューロマイシンを介して連結することができる。そして、標的タンパク質に特異的に結合した特殊ペプチドを回収し、その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、標的に結合する特殊ペプチド構造を容易に決定することができる。

4. 研究成果

(1)平成 22 年度においては、まず環状ペ

プチドライブラリの構築を行い、環状化したペプチドの試験管内翻訳が十分に出来ていることを確認した。さらに、let-7a、miR-21、miR-122、miR-145、miR-155 前駆体をそれぞれ試験管内転写合成し、これをストレプトアビジン磁気ビーズに固定化して、特異的に結合するペプチドの探索を実施した。しかしながら、セレクション・サイクルを 10 サイクル程度継続しても miRNA 前駆体に特異的に結合するペプチド配列が得られなかった。その理由としては、ターゲットとなる miRNA 前駆体に対して、ペプチド自体ではなくペプチドの鋳型となる cDNA が相補的な配列を持つ部分を介して結合してしまったためであると考えられたため、このような結合様式を介して回収される cDNA 画分を減らすために、ペプチド鎖中に FLAG タグやビオチンタグを導入し、翻訳されたペプチド/mRNA 複合体をいったん精製した後にセレクションに用いるなどの手法を検討した。

また、miRNA 前駆体だけでなく、miRNA 前駆体結合タンパク質 lin28 に作用するペプチドの探索についても実施した。His-tag を持つ lin28 を His-tag 固定化用の磁気ビーズに結合させ、環状ペプチドライブラリと混合して特異的に結合するペプチドの探索を行ったが、lin28 が RNA 結合タンパク質であることから mRNA ライブラリが直接 lin28 と結合してしまいセレクションによる配列の濃縮ができないという問題が生じたため、有効なペプチドは得られなかった。

(2)平成 23 年度においては、セレクション条件のさらなる検討を行い、ペプチド鎖中にエンドプロテイナーゼである Glu-C による切断サイトを導入し、標的 miRNA からの cDNA の溶出の際に Glu-C を加えてペプチドを切断させることにより標的に直接結合した cDNA を排除し、ペプチドを介した標的への結合のみを増幅できるように改良を行った。また、ビーズ担体をストレプトアビジン磁気ビーズからヒドラジド-ポリスチレン-ポリアクリルアミドビーズに変更した。さらに、miRNA 前駆体との結合力を高めるためにペプチドライブラリの構造自体も α -ヘリックス含有型ペプチドライブラリへと変更した (図 1)。その結果、核酸同士の相互作用によるセレクションの阻害を効果的に抑制することに成功した。そして、FLAG 配列と Glu-C 切断サイトを有する特殊ペプチドライブラリから miR-21 前駆体に結合するペプチド配列を得ることに成功したため、それらのペプチド配列の標的 miRNA 前駆体特異性や結合力の評価を開始した。in vitro セレクションによって特定の RNA 分子に結合するペプチドを取得できたのは今回が初めての事例であり、非常に意義の大きい成果であると言える。今回の結

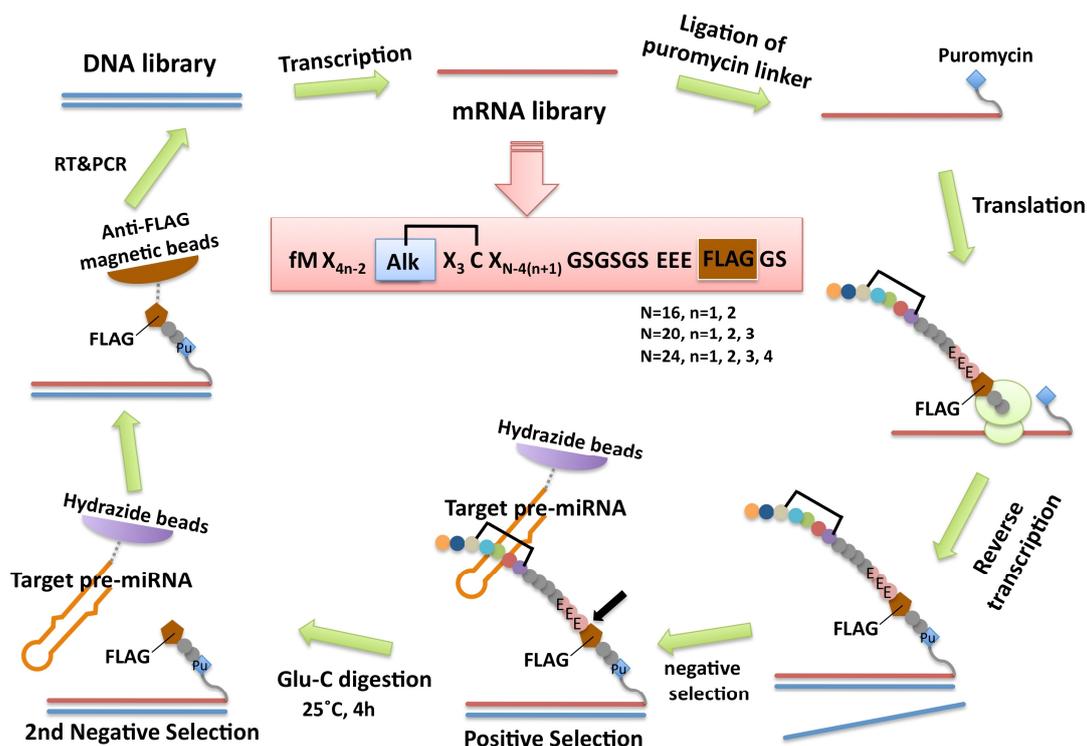


図1. 改変したin vitroセレクション法のスキーム

果は、今後 miRNA だけに限らず様々な RNA 分子を標的とした特殊環状ペプチド医薬探索のための足がかりとなりうると考える。in vitro での標的への結合の評価が出来次第、培養細胞を用いた in vivo での活性の評価も実施する予定である。

(3) 今後は、本研究によって得られた miRNA 前駆体結合ペプチドの結合力の評価や標的特異性の評価等を表面プラズモン共鳴法などを用いて行う予定である。また、in vivo でのペプチドの活性の評価を行うために培養細胞を用いたアッセイを行う見込みである。既に、miR-21 の標的配列を EGFP 遺伝子の下流に組み込み、HEK293 細胞に導入した安定発現株を構築済みであるため、これを用いてペプチドを細胞に導入した際の EGFP の蛍光強度をモニタリングすることによって、ペプチドが miR-21 前駆体のプロセッシングに与える効果を評価できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Reid PC, Goto Y, Katoh T, Suga H., Charging of tRNAs using ribozymes and selection of cyclic peptides containing thioethers. *Methods Mol Biol.* 査読無, 2012, 805, 335-348
DOI:10.1007/978-1-61779-379-0_19

② Iwasaki K, Goto Y, Katoh T, Suga H., Selective thioether macrocyclization of peptides having the N-terminal 2-chloroacetyl group and competing two or three cysteine residues in translation. *Org Biomol Chem.*, 査読有, 巻号未定, 2012
DOI:10.1039/C2OB25306B

③ Goto Y, Katoh T, Suga H. Flexizymes for genetic code reprogramming. *Nat Protoc.*, 査読有, 6, 2011, 779-790
DOI:10.1038/nprot.2011.331.

④ Katoh T, Goto Y, Reza MS, Suga H. Ribosomal synthesis of backbone macrocyclic peptides. *Chem Commun*, 査読有, 2011, 47, 9946-9958
DOI:10.1039/C1CC12647D

⑤ Yamagishi Y, Shoji I, Miyagawa S, Kawakami T, Katoh T, Goto Y, Suga H., Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library. *Chem Biol.*, 査読有, 18, 2011, 1562-1570
DOI:10.1016/j.chembiol.2011.09.013

⑥ 山口 淳, 加藤 敬行, 菅 裕明
Drug Delivery System, 査読無, 26, 2011, 584-592

〔学会発表〕（計4件）

①小嶋達矢、加藤敬行、菅裕明「ヒストンリシン脱メチル化酵素 JMJD2A に対する特殊環状ペプチド阻害剤のセレクション及び活性評価」

日本化学会第 92 春季年会，2012年3月27日，慶應義塾大学

②寺坂尚紘、加藤敬行、菅裕明「in vitro セレクションによる小分子結合性 small non-coding RNA の探索」

第34回日本分子生物学会，2011年12月15日，パシフィコ横浜

③ 加藤敬行 "In vitro selection of macrocyclic peptide inhibitors against various target proteins by means of ribosome-expressed peptide library"

第34回日本分子生物学会，2011年12月13日，パシフィコ横浜

④加藤敬行「特殊環状ペプチドライブラリを用いた分子標的医薬の開発」

第11回日本蛋白質科学会，2011年6月7日，大阪・ホテル阪急エキスポパーク

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.s.u-tokyo.ac.jp/users/bioorg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 敬行 (TAKAYUKI KATO)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：90567760

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し