

## 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11日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760609

研究課題名（和文） 高度特異的タグシステムを利用したペプチド創薬手法の開発

研究課題名（英文） Development of efficient peptide drug discovery system by using highly specific tag-mediated protein immobilization technique

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タグシステムによるタンパク質固定化技術を用いて、ガン関連タンパク質である FOXP3 および NFkB(p50)をターゲットとした部位特異的阻害ペプチドのスクリーニングに関する検討を行った。その結果、効率的なスクリーニングに有効なランダムライブラリー処理条件を見出すとともに、それぞれのタンパク質に対して高い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も成功した。

研究成果の概要（英文）：We have tried to develop an efficient peptide drug discovery system utilizing highly specific tag-mediated protein immobilization technique. Two cancer-related proteins, FOXP3 and NFkB(p50), were adopted as targets and site specific inhibitory peptides were screened from T7 phage random peptide library. The clear correlation between effective isolation of candidate peptides and pretreatment of phage library with solid substrate for protein immobilization was found. In addition, a number of functional inhibitory peptides with high binding affinity with target proteins were successfully obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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，タンパク質，固定化，相互作用，創薬，スクリーニング，ランダムライブラリー，分子標的薬剤

## 1. 研究開始当初の背景

先端医療としての分子標的薬剤の開発に関して、近年、抗体医薬に着目した取り組みが推し進められている。しかし、その有効性が広く認知される一方で、構造安定性、生産性

や生産コストといった問題も依然として存在している。そこで、これらの問題点を克服しうる薬剤として、抗原性が低く、短期間、低コストで生産可能なペプチド医薬への関心が高まっている。しかし、既存の*in silico*または

*in vivo*解析によるペプチド創薬手法は効率が悪い、手間がかかるなどの問題を抱えており、これらを克服しうる新たな手法の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

既存のペプチド創薬手法が抱えている問題の解決を本研究の目的とする。すなわち、申請者らが開発した親水性ポリスチレン高親和性ペプチドタグ(PS-tag)を用いた、配向・構造をナノレベルで精密制御することが可能なバイオ分子固定化技術を利用して、標的タンパク質に対する部位特異的結合性ペプチド薬剤を迅速かつ高効率にスクリーニングする手法を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) T7ファージ提示ランダムペプチドライブラリーの調製

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2本鎖DNAとした。これを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(6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。ランダムにファージクローンを単離し、ライブラリーの多様性を評価した。

### (2) 各種組換えヒトNFkB(p50)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NFkB(p50)およびのcDNAを得た。これをプラスミドベクターに挿入した後、NFkB(p50)のDNA結合領域を含む、クローニング用各種DNA断片を調製した。必要な場合は、遺伝子工学的手法を用いてPS-tag

を連結した。これらをpET22b(+)ベクター中にそれぞれ挿入し、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。

### (3) 各種NFkB(p50)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、調製したPS-tag連結NFkB(p50)と5'末端をそれぞれ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、あらかじめ溶液中でタンパク質とDNAを混合した後に固定化するTwo step ELISA法を用いた。

### (4) 標的タンパク質特異的ペプチドのスクリーニング (バイオパニング)

#### ①FOXP3

T7ファージライブラリー(12 aa提示型)の親水性PSプレートに対する前処理の有無、固定化したFOXP3と相互作用させるファージの力価などを変化させ、バイオパニングを行った。標的タンパク質とファージライブラリーを相互作用させた後、プレートを洗浄し、*E. coli* BL21を添加して、残存ファージを感染・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を濃縮した。

#### ②NFkB(p50)

親水性PSプレート上にタンパク質を固定化した後にファージライブラリーと相互作用させる、あるいはタンパク質とファージライブラリーを相互作用させた後、固定化する場合のそれぞれの手法で親和性ペプチドのスクリーニングを行った。FOXP3の場合と同様に5サイクルのパニングによって親和性ペプチ

ドを提示するファージクローンを濃縮した。なお、あらかじめ30℃で一晩、ファージライブラリーを親水性PSプレート上で静置し、非特異クローンを取り除いておいた。

#### (5) 標的タンパク質とペプチドとの相互作用評価

約200種類の標的タンパク質高親和性候補ペプチド配列について、それぞれのペプチドをPS-tagに連結する形で固相合成した後、各ペプチド（候補薬剤）を親水性PSマイクロプレート上に固定化し、相互作用および結合特異性を標的タンパク質に対する濃度依存性を指標としてELISAにより評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種 NFκB(p50)発現ベクターの構築およびバイオパニング

DNA 結合ドメインをクローニング領域として含む各種組換え NFκB(p50)発現用ベクターを構築し、大腸菌 BL21(DE3)Rosetta2 株を宿主として、それぞれタンパク質の発現を試みた。発現後の可溶化度を指標にスクリーニングに使用するコンストラクトを決定した。その後、精製タンパク質の量体構造を評価した上で、結合塩基配列を基に設計した（ビオチン化）デコイ核酸を用いた ELISA による相互作用解析を行った。その結果、PBS 中において十分な相互作用検出が可能であった。さらに、6 アミノ酸からなるペプチドを提示する T7 ファージランダムペプチドライブラリーを新たに構築した。得られたライブラリーの多様性は  $1.2 \times 10^7$  pfu であり理論上の最大ライブラリー数の約 20%であった。さらに、各アミノ酸の出現頻度を調査したところ、理論値との高い近似性を示した(Fig. 1)。このランダムペプチドライブラリーを用いて、2 種類の相互作用形態によるバイオパニングを 5 サイクル行い、計 80 個のファージクローンを単離した。

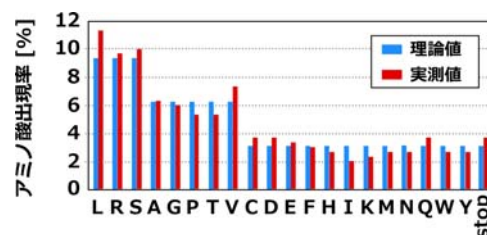


Fig. 1 ランダムペプチドライブラリーにおけるアミノ酸出現頻度の評価 (300 aa)

#### (2) NFκB(p50)親和性ペプチドの解析

単離したファージクローンをを用いて、固定化した NFκB(p50)との親和性をファージ ELISA により評価したところ、ほぼ全てのクローンが顕著な親和性を示した。また、デコイ DNA を用いた相互作用解析実験により、ファージをペプチド提示担体とした場合においては、NFκB(p50)とデコイ DNA との相互作用を阻害し、すなわち結合阻害活性を有していることが強く示唆された。また、得られたファージクローンについてペプチドコーディング領域の DNA シーケンシングを行い、NFκB(p50)親和性候補ペプチドのアミノ酸配列を決定した。約 80 種類の配列について、それぞれのペプチドを PS-tag に連結する形で固相合成した後、各ペプチド（候補薬剤）を親水性 PS マイクロプレート上に固定化し、結合特性をペプチド ELISA により評価した (Fig. 2)。その結果、ファージ ELISA の結果と同様に、ほぼ全てのペプチドが NFκB(p50)に対する親和性を有することがわかった。特に 5 種のペプチドについては再現性良く高い親和性を示したことから、候補ペプチド薬剤として引き続き機能解析を進める。

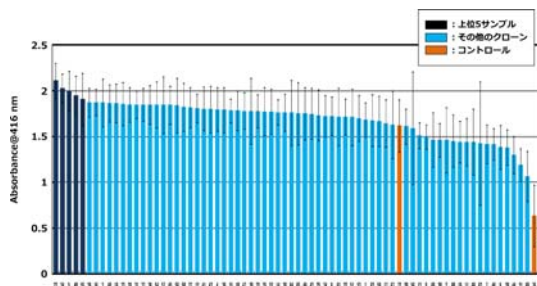


Fig. 2 NFκB(p50)に対する相互作用評価

### (3) FOXP3 親和性ペプチドの解析

12 アミノ酸を提示する T7 フェージランダムペプチドライブラリーを用いた標的タンパク質(FOXP3)親和性ペプチドのスクリーニングについて、フェージライブラリーの前処理および作用させるフェージの量がそれぞれ異なる3つの条件について検討を行った。それぞれ5サイクルのバイオパニングを行い、得られたフェージ懸濁液から各40個のプラークを単離し、計120サンプルについてペプチドコーディング領域の塩基配列をダイレクトシーケンシングにより決定した。ランダムライブラリーのコドン出現頻度の理論値を考慮し、実際に得られたフェージの提示ペプチドを構成するアミノ酸の偏りについて解析したところ、疎水性アミノ酸および塩基性アミノ酸の出現頻度が高いことがわかった。また、配列を決定したそれぞれのペプチドを PS-tag に連結する形で固相合成し、ペプチド ELISA によって標的タンパク質に対する結合特性を評価した(Fig. 3)。

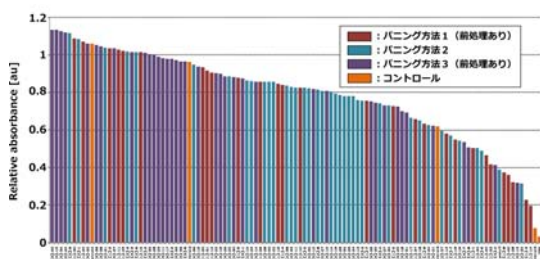


Fig. 3 FOXP3 に対する相互作用評価

その結果、スクリーニングにより得られたペプチドの多くが標的タンパク質に対して高い親和性を示すことがわかったが、特に高い親和性を示したペプチドの多くは、ランダムライブラリーを前処理し、非特異クローンを除いたものを利用したバイオパニングによって得られたクローンであった。したがって、ランダムライブラリーの前処理が、バイオパニングで効率的に標的タンパク質高親和性ペプチドを取得するための重要な要素であ

ることが強く示唆された。また、デコイオリゴ DNA を用いた競合実験を行ったところ、標的タンパク質への部位特異的な結合特性を有するペプチドを複数同定できた。得られた配列をもとにいくつかのモチーフ配列を推定し、コントロールペプチドとして合成後、同様に標的タンパク質との相互作用を調べたところ、それぞれ高い親和性を示した。

### (4) まとめ

2種類の標的タンパク質について、パニング条件を含む様々な検討により、ペプチド製剤のプロトタイプと成りえる機能性ペプチドの取得操作の好適条件を見出すとともに、本手法の今後の実用化の可能性を示した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計7件)

①國方 俊暢, 今中 洋行, 今村 維克, 中西 一弘

クッションタンパク質を用いた機能的ペプチド固定化法の検討

化学工学会 第42回秋季大会, W1P63

2010/9/6

京都・同志社大学

②Hiroyuki Imanaka, Masami Maekawa,

Koreyoshi Imamura, and Kazuhiro Nakanishi

Efficient Peptide Aptamer Screening System

Using Affinity Tag Mediated Functional Protein

Immobilization

The 16<sup>th</sup> Symposium of Young Asian

Biochemical Engineers' Community (YABEC

2010)

2010/11/21

Taipei (Taiwan)

③宮原徹也, 今中洋行, 今村維克, 近藤英作,

中西一弘

機能的タンパク質固定化技術を利用した  
NFκB(p50)阻害性ペプチドの探索  
日本農芸化学会中四国支部第29回講演会  
2011/1/22  
徳島・徳島大学

④今中洋行, 前川真光, 今村維克, 中西一弘  
機能的タンパク質固定化技術を利用したペプ  
チドアプタマースクリーニング法の検討  
化学工学会 第76年会  
2011/3/22  
東京・東京農工大学

⑤松本亘平, 梶谷友希, 前川真光, 今中洋行,  
今村維克, 中西一弘, 近藤英作  
ヒトFOXP3親和性ペプチドの同定と結合特性  
評価  
化学工学会 第43回秋季大会  
2011/9/14  
愛知・名古屋工業大学

⑥瀧本貴之, 宮原徹也, 今中洋行, 今村維克,  
近藤英作, 中西一弘

機能的タンパク質固定化技術を利用した  
NFκB(p50)阻害性ペプチドの探索  
第63回日本生物工学会大会  
2011/9/27  
東京・東京農工大学

⑦今中洋行  
生体分子の機能的固定化技術の開発  
第4回化学工学3支部合同福井大会  
2011/12/8  
福井県

〔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