

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510253

研究課題名(和文) 低分子化合物を特異的に認識する新機能ペプチドの進化工学的創製

研究課題名(英文) Creation of functional peptides recognizing a low-molecular compound by evolutionary molecular engineering

研究代表者

根本 直人(NEMOTO, Naoto)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：60509727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：cDNA display法のOne-pot調整に成功コストと時間の両面において大幅な削減が可能になった。さらに、無細胞翻訳系と新規ビューロマイシン・リンカーを利用し、簡易かつ迅速に分子間相互作用を解析する方法を開発した。これらをベースに低分子化合物としてビーズ上のアミノ基を特異的に認識する2つのジスルフィド架橋構造をもつペプチドを試験管内淘汰することに成功し、それらが特有の架橋構造を有することを世界で最初に明らかにした。これによりペプチドが低分子化合物を認識することが可能であることからナノ構造の認識分子として有用であることにもなり、今後、ナノテクノロジー分野への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded to improve the preparation of cDNA display molecule easily and efficiently with a one-pot preparational manner. Furthermore, we demonstrated the biotin binding capacity of streptavidin magnetic beads decreased by mRNA-binding ribosomes, resulted in the low yield of cDNA display molecules. Secondly, we developed an easy and rapid molecular-protein interaction analysis using a cell-free translation and a novel puromycin-linker by a pull-down manner. Finally, by using these techniques, in vitro selection using 30 amino acids random library containing cysteine against amino group on the solid-phase was performed. As a result, an amino group-binding peptide aptamer containing two disulfide bonds which have a unique structure has explored. This shows that a peptide has capability to recognize small molecules with a low-molecular weight. In the future, peptides will be more and more applicable for nanotechnology as a recognition material of nano structure.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：進化分子工学 ペプチド アプタマー アミノ基認識 分子間相互作用 試験管内淘汰 cDNA display mRNA display

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らは 1997 年に世界に先駆けて進化工学的手法であるファージディスプレイの試験管内版“in vitro virus”法を開発した(Nemoto et al. FEBS lett 1997)。これは無細胞翻訳系中で mRNA とそれにコードされたタンパク質を mRNA の 3'末端に連結したピューロマイシンを介して結合させるもので mRNA ディスプレイ法とも呼ばれている。In vitro virus 法は従来のファージディスプレイ法に比べスクリーニング可能なライブラリサイズを飛躍的に ( $10^{12}$  程度まで) 向上させることができるものの mRNA に由来する不安定性により選択条件に大きな制限があった。このため申請者らは in vitro virus 法の強みであるライブラリサイズを保ちつつ安定化し、様々な選択条件下でスクリーニングを可能にする cDNA ディスプレイ法を開発した (Yamaguchi, Nemoto et al. Nucleic Acid Res 2009)。無細胞翻訳系を用いたタンパク質の in vitro selection 法としては ribosome ディスプレイが近年、そのライブラリサイズの大きさゆえにファージディスプレイの代りに利用され成功をおさめている。この分野は年々発表される論文数も着実に増えているが mRNA ディスプレイと同様その不安定性による選択条件の制限が大きな課題である。申請者らは cDNA とそれにコードされたタンパク質を共有結合で連結することに成功したため選択条件における温度、pH の幅を飛躍的に拡張したのみならず、選択プロセスに入る前の前処理としてライブラリのタンパク質やペプチドを修飾することが可能になった。具体的には酸化と酵素的リフォールディング過程をペプチドライブラリに施すことでインターロイキン 6 レセプター (IL-6R) 特異的に 10 nM 程度で結合する 32 残基のペプチド アプタマーの取得に成功した (Yamaguchi, Nemoto et al. Nucleic Acid Res 2009)。取得されたペプチドアプタマーの特徴として 2 つのジスルフィド結合を有し、これが活性に不可欠であった。このことより、ランダム配列からジスルフィド結合によって安定化した構造のペプチド (アプタマー) を創出できる、創出したペプチドは極めて特異的に標的分子に結合し得ることが分かった。

従来、低分子化合物を認識するのは抗体のみでペプチドでは不可能と考えられている。しかしながら結晶解析で得られている抗体が蛍光分子 fluorescein を認識する部分や FYVE domain が基質である Phosphatidylinositol 3-phosphatate を認識する領域はアミノ酸にして高々 30 残基程度であることがわかる (Kutateladze, BBA, 2006)。本研究ではジスルフィド結合によって安定化構造をとるペプチドのライブラリを作製し、進化工学的手法により低分子化合物に特異的に結合するペプチド (アプタマー) 取得の技術基盤を構築し、その機能解析を行う。

申請者はすでに次のような予備的結果を得ている。

ランダムな 30 残基のペプチドライブラリより蛍光分子 Cy-3 に特異的に解離定数 10~100 nM 程度で結合するジスルフィド結合を有するペプチドを取得した。

システイン含有量を 20% 程度まで高めたコドン単位のランダムライブラリの合成とその配列確認を行った。

無細胞翻訳系を用いたペプチド合成・精製法と表面プラズモン共鳴法 (SPR) の組合せによる迅速な解離定数決定法の実験で良好な結果が得られた。

### 2. 研究の目的

研究の全体構想は低分子化合物に対し抗体程度の親和性・特異性で結合するペプチドを創製することである。進化工学的手法を用いて大きさが 30 残基程度で複数のジスルフィド結合を有する低分子結合ペプチド (アプタマー) を取得し、その認識メカニズムを解明する。

ペプチドアプタマーは認識分子として抗体の低分子化の流れを究極的に追及したもので、これが実現されれば科学的見地のみならず創薬・診断分野等、産業上のインパクトは極めて大きい。申請者らは in vitro virus 法を改良し飛躍的に安定性と効率性を高めた cDNA ディスプレイ法によって従来は不可能とされた低分子化合物の特異的認識ペプチドの試験管内進化を実現する。

### 3. 研究の方法

cDNA display 法のより効率的な調整法とそれを用いたスクリーニングにより得られた機能ペプチドの迅速かつ簡易な分子間相互作用の解析法を開発する。そして、実際に得られた機能ペプチド配列は、化学合成して特異性、親和性を評価する。

具体的には、

#### 【平成 23 年度】

(1) システイン含有率とジスルフィド結合パターンを考慮した DNA ライブラリの構築  
すでに約 20% のシステイン含有率のコドン単位で合成したランダム DNA ライブラリを準備している。本研究では異なるシステイン含有率をもち、システインの残基を局在化させジスルフィド結合パターンの異なるペプチドを発現させる疑似ランダム DNA ライブラリを新たに合成する。また、その配列の確認、発現効率を検討する。

(2) cDNA display 法による標的分子のスクリーニング

cDNA ディスプレイ法 (Yamaguchi, Nemoto et al. Nucleic Acid Res 2009) の手法により、fluorescein に対してスクリーニングを行う。スクリーニングのサイクル数は 10~20 回を

予定しており、解離定数 Kd は 10 nM 程度以下を目標とする。

本研究ではライブラリデザインが異なる上記の 2 種類のライブラリを用いてスクリーニングを行い比較することにより、ライブラリデザインのスクリーニング効率に与える影響についても理解を深めたいと考えている。

(3) スクリーニングによって得られたペプチドの配列解析

スクリーニング前のライブラリからサイクルを追ってどのように配列が進化してくるか、その経時変化をシーケンシングレベルで確認するため各選択後の DNA をクローニングし、シーケンシングする。特に選択サイクルを回すことにより、配列がクラスター化されるかどうか注目しながら解析を行う。

【平成 24・25 年度】

(1) 第一次候補配列(分子)の絞り込み  
平成 23 年度で得られた fluorescein に特異的に結合するペプチドの配列の中から 5~10 個の配列を選び、申請者が新たに開発した無細胞翻訳系を用いた迅速なペプチドの発現・精製・固定化法(特許出願、論文準備中)を用いて、表面プラズモン共鳴解析装置によって標的分子との解離定数を測定し最も親和性が高いと思われる 2~3 種類の配列を決定する。

(2) 架橋パターンの異なるペプチドの化学合成

ジスルフィド結合を 2 つ以上含むペプチドの場合その架橋パターンが大きな問題となるため、候補分子に対して 2 種類以上の架橋パターンの異なるペプチドを化学合成し、親和性を比較検討することで架橋パターンの解析を行う。

(3) 蛍光分子-ペプチドアプタマー相互作用解析

化学合成したペプチドと標的分子(蛍光分子)との親和性(Kd)は蛍光偏光解消法を用いて測定する。すでに装置は申請者が所有している。ペプチド(分子量約 3,500)に対し Fluorescein は分子量 332 であり、蛍光分子はペプチドに対し一桁以上小さいことから、Kd は蛍光偏光解消法により容易に測定可能である。また、この使用方法に関しては申請者が熟知している(Nemoto et al., FEBS lett. 1999)。

(4) 特異性の解析

Fluorescein 以外の蛍光分子との相互作用を上記の蛍光偏光解消法を用いて簡便に測定することは可能と思われるが、ペプチドの化学合成の際にピオチンを導入しておくことで、競合 ELISA 法により生化学的な手法での検証も行い、多面的に機能確認をする。

#### 4. 研究成果

cDNA display 法の One-pot 調整に成功した。

これによりコストと時間の両面において大幅な削減が可能になり、本研究全体の進展に大きく寄与した。さらに、無細胞翻訳系と特別にデザインしたピューロマイシン・リンカーを利用することで、簡易かつ迅速に分子間相互作用を解析することが可能になった。これらをベースに低分子化合物として当初ビタミンの 1 種 biotin に結合するペプチドの試験管内淘汰を行った。複数の候補ペプチド配列が取得されたが、予想に反し biotin とは親和性がないにも関わらずビーズには結合することがわかった。そこで、ビーズ上のアミノ基修飾に注目し、他のカルボキシル基修飾されたビーズ等の比較検討を行った結果、アミノ基を特異的に認識することを見出した。さらに、認識には 4 つあるシステイン間の架橋構造は不可欠か否か、認識に架橋構造が必要な場合、どのような架橋構造が必要かを明らかにすべく、各架橋パターンをペプチド合成し、その結合能を明らかにした。その結果、従来は知られていない特定にユニークな架橋構造をもつペプチドのみがアミノ基を認識することがわかった。また、架橋構造をもつことにより 2 次構造形成が促進されていることも円偏光二色性分光法により明らかにした。30 残基程度のペプチドによりアミノ基のような小さな原子団を認識することは従来知られておらず、ペプチド科学に新しい知見を加えることができたと考えている。この成果は英国化学雑誌 Chemical communication に掲載された。

#### 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 7 件)

- 1) Y. Mochizuki, K. Nishigaki, N. Nemoto, Amino group binding peptide aptamers with double disulphide-bridged loops selected by in vitro selection using cDNA display, *Chem Commun*, **50**, 5608-5610 (2014) (査読有)
- 2) 根本直人、望月佑樹、上野真吾, cDNA display による分子デザイン - mRNA display(in vitro virus)から cDNA displayへ -, *生物物理*, **53**, 250-253 (2013) (査読有)
- 3) Y. Mochizuki, S. Kumachi, K. Nishigaki, N. Nemoto, Increasing the library size in cDNA display by optimizing purification procedures., *Biol Proced Online*, **15**, 7 (2013) (査読有)
- 4) Y. Mochizuki, F. Kohno, K. Nishigaki, N. Nemoto, A pull-down method with a biotinylated bait protein prepared by cell-free translation using a puromycin-linker, *Anal. Biochem.*, **434**, 93-95 (2013) (査読有)
- 5) N. Nemoto, C. Tsutsui, J. Yamaguchi, S. Ueno, M. Machida, T. Kobayashi, T. Sakai, Antagonistic effect of disulfide-rich peptide aptamers selected by cDNA display on interleukin-6-dependent cell proliferation,

*Biochem Biophys Res Commun*, **421**, 129-133 (2012) (査読有)

- 6) N. Nemoto, S. Kimura, S. Kumachi, W. Cai, M. Suzuki, K. Nishigaki, and T. Kubo, In vitro Selection of Peptide Aptamers against Acetylcholine-binding Protein (AChBP) from Disulfide-rich Peptide Library by cDNA Display, *Peptide Science 2011: K. Sakaguchi(Ed.)*, 89-90 (2012) (査読有)
- 7) Y. Mochizuki, M. Biyani, S. T.-Ueno, M. Suzuki, K. Nishigaki, Y. Husimi, and N. Nemoto, One-pot preparation of mRNA/cDNA display by a novel and versatile puromycin-linker DNA, *ACS Comb. Sci.* **13**, 478-485 (2011) (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

- 1) 根本直人, ペプチドで広がる医療・診断技術 - ペプチドアプタマーを中心にして -, 第4回「医工連携によるイノベーション創出研究会」(さいたま市、2013年12月11日)
- 2) 澤田 貴宏, 望月 佑樹, 鈴木 美穂, 西垣 功一, 根本直人, cDNA display 法を用いた TNF $\alpha$  に対するシステインリッチペプチドライブラリの試験管内淘汰実験, 第36回日本分子生物学会年会(神戸、2013年12月5日)
- 3) 根本直人, 標的分子の多様性を拡張するペプチドアプタマー取得のための cDNA display 法, Biotech 2013 (東京ビックサイト) (東京、2013年5月9日)
- 4) F. Kono, Y. Mochizuki, M. Suzuki, K. Nishigaki, N. Nemoto, Easy-to-use and Rapid Molecular Interaction Analysis by Combination of Pull-down method with mRNA Display, The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, (Fukuoka, 2012年12月12日)
- 5) Y. Mochizuki, N. Nemoto, Optimization of In Vitro Protein Selection using mRNA/cDNA Display Method to Search Functional Peptides and Proteins Rapidly, Protein & Peptide Conference 2012 (Beijing, China, 2012年3月25日)
- 6) Y. Yotsumoto, Y. Mochizuki, M. Suzuki, K. Nishigaki, N. Nemoto, In vitro evolution of peptide aptamers against survivin from a novel three-finger scaffold library by cDNA display, 第34回日本分子生物学会年会(MBSJ2011) (横浜、2011年12月13日)
- 7) 根本直人, 木村真之介, 熊地重文, Cai Weiyang, 鈴木美穂, 西垣功一, 久保 泰, cDNA display 法によるジスルフィド結合を複数含むペプチドライブラリからのアセチルコリン結合タンパク質結合ペプチドアプタマーの試験管内淘汰, 第48回ペプチド討論会(札幌、2011年9月29日)
- 8) 根本直人, タンパク/ペプチドの簡易で迅速な精製・ビオチン化法, イノベーション

ン・ジャパン 2011「新技術説明会」(東京、2011年9月21日)

- 9) T. Fukushima, W. Cai, M. Suzuki, K. Nishigaki, T. Kubo, N. Nemoto, 第49回日本物理学会年会(姫路、2011年9月17日)
- 10) 根本直人, cDNA display 法による新機能分子の創出, 理研シンポジウム 第6回「バイオものづくり」シンポジウム(和光、2011年5月10日)

〔図書〕(計 4 件)

- 1) 根本直人, 遺伝子型 - 表現型対応付け技術, (株)エヌ・ティー・エス, 『進化分子工学 - 高速分子進化によるタンパク質・核酸の開発 - 』 第2編 第3章, 161-170 (2013)
- 2) M. Biyani, M. Biyani, N. Nemoto, Y. Husimi, Evolutionary Molecular Engineering to Efficiently Direct in vitro Protein Synthesis, CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS (Edited by Manish Biyani) (InTech), 51-62 (2012)
- 3) Y. Mochizuki, N. Nemoto, Evolution of Disulfide-Rich Peptide Aptamers Using cDNA Display, *Methods in Mol. Biol.*(Springer), **805**, 237-250 (2012)
- 4) S. Ueno, N. Nemoto, cDNA Display: Rapid Stabilization of mRNA Display, *Methods in Mol. Biol.* (Springer), **805**, 113-135 (2012)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

1) 名称: 核酸リンカー  
発明者: 根本直人, 熊地重文, 塩野博文  
権利者: 埼玉大学, (株)ニコン  
種類: 出願  
番号: 特願 2012-255737  
出願年月日: 2012年11月21日  
国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
<http://park.saitama-u.ac.jp/~nemoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本直人 (NEMOTO, Naoto)  
埼玉大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 60509727