

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510317

研究課題名(和文)細胞膜透過性ペプチドアプタマーの開発

研究課題名(英文)Development of cell membrane penetrating peptides

研究代表者

長谷川 慎(Hasegawa, Makoto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10367899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規な機能性ペプチド探索の手法であるcDNAディスプレイ法により、高い細胞膜透過性を有する新しいペプチドを創出することを目的とした。cDNAディスプレイ法は、膨大な数の配列多様性から特定の機能配列を見出す技術である。スクリーニングサイクルで提示された配列候補を化学合成し、蛍光標識し、細胞膜への透過性について検証した。同時に、ペプチドの相互作用解析に供することのできる分析用光学系を開発した。組織化された細胞内へのペプチドの拡散を観察するために、蛍光相関分光法によりペプチドの挙動解析を行った。その結果、細胞膜と新規膜透過性ペプチドの構造と膜透過性の相関を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Artificial peptides designed for cell penetrating have been developed by using systematic directed evolution in vitro, a cDNA display method. A surface plasmon resonance-based biosensor and fluorescence correlation spectroscopy to examine binding of peptides to POPC with high affinity. This study describes a new strategy for the development of artificial functional peptides, which are promising materials in biochemical analyses and medical applications.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：バイオプローブ 機能性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年、医薬品開発効率の著しい低下傾向と高コスト化(開発費 1,700 億円/1 品目)が問題となっている。従来の化合物ライブラリーから新規リード化合物が発見されにくい状況下で、ペプチドなどミドルサイズの分子製剤(中分子製剤)が注目されている。それは、低分子医薬では困難な蛋白-蛋白間相互作用が可能であり、かつ蛋白製剤など高分子医薬よりも体内動態・コストに優れるからである。新規ペプチド医薬品の認可数は増えており(2012 年は欧米で 6 品目認可)市場規模の拡大が予想されている。

現在、分子標的薬として注目される抗体は、任意の生体分子に対して特異的かつ高い結合力で作用するため、医薬・診断・研究用試薬に幅広く利用されている。しかし、抗体を取得するのに数ヶ月を要し、大量調製には大きなコストがかかる。また、抗体は比較的安定なタンパク質とはいえ、失活や分解を受けやすい。近年、抗体と同様の分子認識能をもち、特異的に特定の物質と結合する“アプタマー”と呼ばれる人工抗体様分子の開発が進んでいる。アプタマーは、RNA、DNA であるが、ペプチドについても進化工学的手法が考案されており、これをペプチドアプタマーと称している。アプタマーは、ランダム配列の中から標的分子に対する結合活性を基に選択されることを特徴とする。

1990 年に報告された初めての RNA アプタマー取得の例では、 10^{14} 程度の多様性を持った RNA ライブラリーから標的分子の結合性を指標とした RNA の選別、RNA から cDNA への逆転写、PCR 法による DNA の増幅、DNA から RNA への転写を一連のステップとして、途中で抗原への結合性による選択を行い、これを複数回繰り返すことで標的分子に強く結合する RNA の取得に成功した(SELEX 法)。このような手法は、ランダムな配列群から、世代を経て機能性配列に収束することから試験管内分子進化と称される。

RNA アプタマーの特徴として多様な構造形成が可能という点が挙げられる。RNA は 1 本鎖であることから、その塩基配列に依存して様々な構造をとることが予想される。これまで RNA アプタマーと標的タンパク質は、核酸の負電荷とタンパク質の正電荷が電気的な相互作用で結合すると考えられてきた。しかし、最近の立体構造解析による報告では、RNA 自身が持つ柔軟性を利用して標的タンパク質の形に合わせた構造を作り出し、標的タンパク質を捕捉することが見出されており、RNA アプタマーが様々な結合様式で標的分子を認識することが明らかとなっている。さらに、RNA アプタマーの要所を DNA や非天然型核酸に置換した核酸アプタマーが、機能性向上のために利用される場合がある。加齢黄斑変性の治療薬として VEGF に対する核酸アプタマー Macgen (米国 OSI Pharmaceuticals 社 アステラス製薬が

2010 年に買収)が 2004 年に米国、2008 年に国内でも認可されたように、今後、アプタマー製剤が次々と生み出されてくるだろう。

一方、ペプチドアプタマーもまた核酸のアプタマーと同様に、試験管内人工進化法により創出される。網羅性(すべての配列を含む)を担保したペプチドライブラリーは、配列の長さに対して文字通り指数関数的に増加するため、ペプチドアプタマーは 10 残基以下が主流となっている。そのため、抗体と比較して高い親和性を得ることに課題がある。そこで、構造の土台となるタンパク質に組み込むことで、親和性を高め、安定な立体構造を得て、抗体に匹敵する結合親和性や特異性を実現させるといったアプローチもなされている。

2. 研究の目的

ペプチド医薬には、従来、経口薬剤になりにくく、体内での分解も早いといった欠点があった。従来、膜を通過しない分子を細胞内に導入するための手法として、マイクロインジェクションやエレクトロポレーションといった機械的あるいは物理的方法、あるいは膜融合性のリポソームやナノ粒子などを用いる方法がとられてきた。しかし、前者の方法では例えば分裂しにくい細胞などへの遺伝子導入効率が低く、後者では操作が煩雑なために多数の細胞を一度に処理しにくいことや、細胞に与える損傷の大きさなど、いずれも実用面で課題が残っている。また、ウイルス粒子をベクターとして遺伝子導入する技術は、感染性や抗原性などの問題が解決されていない。

ある特定の配列を有するペプチドが、その後ろに様々な物質をつなげた状態でも高い細胞内移行効率を示すことが知られている(膜透過性ペプチド)。膜透過性ペプチドは、毒性、抗原性の低さと併せ、簡便かつ効率的な細胞内への薬剤送達技術として、近年大きな注目を集めているが、これまでに開発されている細胞膜透過ペプチドには以下のような問題点がある。

免疫原性; HIV 由来配列であることやアグリゲーションを起こすことで免疫反応を惹起しやすい。

安定性; 直鎖状のためプロテアーゼにより分解されやすい。

導入効率; 特定の細胞に対する特異的作用を持たない。受動的拡散のため導入効率も低い。

これらの問題点を克服し、特定のタンパク質や薬剤に付加することで、特定の細胞に由来する脂質膜を効率よく透過するペプチド配列群を同定する。

3. 研究の方法

PCR 法による増幅過程との相性の良い核酸アプタマーと異なり、ペプチドアプタマーの場合は増幅過程に工夫が必要であり、膨大

な数の mRNA とペプチドの対応付けを可能としたディスプレイ法が利用されている。多くのペプチドアプタマーは、80 年代に確立されたファージディスプレイ法を用いて取得されてきた。ファージディスプレイ法はバクテリオファージ（繊維状ファージ M13 など）のコートタンパク質に、ファージミドベクターを利用して任意の配列を挿入できることを利用したものである。提示されたアミノ酸配列の結合活性を基に、標的分子に特異的に結合するファージクローンを濃縮する。しかし、ライブラリーサイズが 10^8 程度に限定されることや細胞毒性をもつペプチドが取得しにくいといった欠点がある。

そこで cDNA ディスプレイ法を採用した（図 1）。この方法は、ピューロマイシン誘導体をリンカー（ピューロマイシンリンカー）として利用することで、mRNA とペプチドの複合体を生成する。ピューロマイシンは、リボソーム上で合成途中のポリペプチドの C 末端に結合し、タンパク質合成を阻害する抗生物質である。低濃度のピューロマイシン存在下で、終止コドン以降を切除した mRNA を鋳型としてタンパク質合成反応を行うことで、mRNA の 3' 末端がピューロマイシンリンカーを介してペプチド C 末端の結合した複合体を得る。さらに、ピューロマイシンリンカー中に逆転写用のプライマー領域を組み込むことによって、mRNA/cDNA ハイブリッド鎖の状態ではペプチドと直接共有結合させることが可能となり、安定性が大きく向上している。さらに、ビオチン付加や蛍光修飾などの改良を施すことによって、cDNA ディスプレイ法は、 $10^{13} \sim 10^{14}$ の多様性を有するペプチドライブラリーを効率的に作製することが可能である。

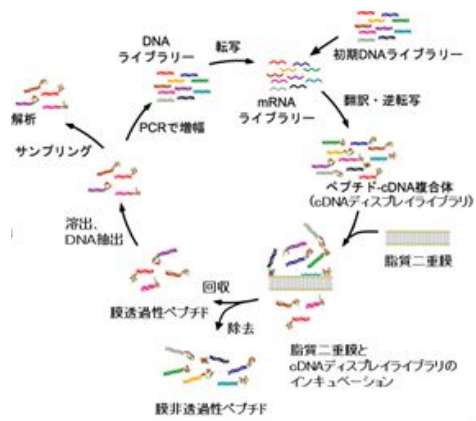


図 1 cDNA ディスプレイ法

4. 研究成果

細胞膜透過ペプチドは、診断・治療・予防の立場から多くの研究が行われている。メカニズムの特定にはじまり、透過性を持つ配列の同定と作用の証明を通して、最終的に治療薬やワクチンの開発につながっている。われ

われは、脂質に特異的に結合する 8 残基のペプチドを cDNA ディスプレイ法により取得した。標的分子であるホスファチジルコリンは、細胞膜構成成分である。

cDNA ディスプレイ法は埼玉大学で考案され、ジェナシス（株）（埼玉県川口市）において事業化されている特許技術である。脂質に対するペプチドアプタマーは図 3 に示す工程により取得された。まず 10^{13} の多様性を持つ 8 アミノ酸をコードするランダムな DNA 配列プール（DNA ライブラリー）を用意する。この DNA ライブラリーを mRNA へ転写し、ピューロマイシンリンカーを連結する。続いて、リンカーを連結した mRNA を無細胞系で翻訳すると、ペプチドの C 末端がピューロマイシンと結合することにより、mRNA-ペプチド複合体が形成される。さらに、逆転写反応によって核酸部分を安定な mRNA/cDNA ハイブリッド鎖とする。そうして得られた mRNA/cDNA-ペプチド複合体群の中から、標的分子である脂質に結合するペプチドを選択し、選択された分子の核酸部分を PCR によって増幅する。これら一連の操作を 5 ラウンド繰り返すことで、標的分子特異的に結合するペプチドを選択した。

得られた 50 クローンあまりの候補ペプチド配列から、システインを含む配列を除いた 30 種のペプチドを化学合成し、濃度 $1 \mu\text{M}$ の脂質に対する結合量を SPR 法により解析した。30 種のペプチドと脂質の相互作用は、程度の差はあるものの、ほとんどが脂質に対して結合性を示した。

次に、脂質に対する結合性とペプチドのアミノ酸配列や構造の関係を考察するために、CD スペクトルを測定した。その結果、高親和性のペプチドと低親和性のペプチドには構造に違いがみられた。これらの結果から、脂質と結合しやすいペプチドアプタマーの構造は、フレキシブルなループ構造を取りやすいものと推定される。

さらに、膜透過性ペプチドの相互作用解析のために蛍光相関分光測定装置をカスタマイズした。作製した仕様の異なる光学モジュールは、プロトタイプ試作機に設置するためのアダプタと固定化モジュールを作製した。本アダプタによりプロトタイプ試作機に新規光学モジュールを設置し、ペプチドと脂質の相互作用解析実験を行った結果、各モジュールにおいて蛍光強度の顕著な低下が認められた。これは対物レンズ観察部から結像レンズまでの間における延長による光学的ケラレの増加に起因するものと考えられた。感度等を検討した結果、脂質の粒子あたりの蛍光強度を維持する条件を見出した。

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 4 件）

1. Hayakawa, Y., Matsuno, M., Tanaka, M., Wada, A., Kitamura, K., Takei, O., Sasaki R., Mizukami, T., Hasegawa, M. (2015) Complementary DNA display selection of high-affinity peptides binding the vacuolating toxin (VacA) of *Helicobacter pylori*. *Journal of Peptide Science*, in press. (査読有)
2. Mino K, Nishimura S, Ninomiya S, Tujii H, Matsumori Y, Tsuchida M, Hosoi M, Koseki K, Wada S, Hasegawa M, Sasaki R, Murakami-Yamaguchi Y, Narita H, Suzuki T, Miyata N, Mizukami T (2014) Regulation of TFPI-2 (Tissue Factor Pathway Inhibitor 2) expression by Lysine-Specific Demethylase 1 and 2 (LSD1 and LSD2). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78, 1010-1017. (査読有)
3. Hasegawa M, Yasuda Y, Tanaka M, Nakata K, Umeda E, Wang Y, Watanabe C, Uetake S, Kunoh T, Shionyu M, Sasaki R, Shiina I, Mizukami T (2014) A Novel Tamoxifen Derivative, Ridaifen-F, Is a Non-peptidic and Small-molecule Proteasome Inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 71: 290-305. (査読有)
4. Wada, A., Wong, P.-F., Hojo, H., Hasegawa, M., Ichinose, A., Llanes, R., Kubog, Y., Senba, M., Ichinose, Y. (2013) Alarin but not its alternative-splicing form, GALP (Galanin-like peptide) has antimicrobial activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434, 223-227. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 早川結実子・松野充宏・武居修・北村幸一郎・長谷川慎、ヘリコバクター・ピロリの産生する空胞化毒素 VacA に対するペプチド/aptamer による光親和性標識、日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会、P-082、大阪大学豊中キャンパス(大阪府) 2014 年・6 月
2. 早川結実子・松野充宏・田中誠・武居修・北村幸一郎・長谷川慎、ヘリコバクター・ピロリの産生毒素 VacA に対するペプチド/aptamer の探索と評価、第 62 回日本生化学会近畿支部例会、C16、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県) 2015 年・5 月

〔図書〕(計 1 件)

長谷川慎・松野充宏・早川結実子・武居修・北村幸一郎「ペプチド/aptamer (人工抗体様ペプチド) 探索法とその応用」*遺伝子医学*

MOOK 別冊 次世代ペプチド医薬創製 2014 年 8 月 20 日 (株)メディカルドゥ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 慎 (HASEGAWA, Makoto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10367899

(2) 研究分担者なし