

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651250

研究課題名(和文) 生物活性化合物を発掘する超高感度ケミカルバイオセンシング技術の新規開発

研究課題名(英文) Development of a chemical biosensing technology for exploring bioactive compounds

研究代表者

和田 章 (Wada, Akira)

独立行政法人理化学研究所・長田抗生物質研究室・専任研究員

研究者番号：90443051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ペプチドタグと結合する蛍光分子提示型プローブを独自に設計・作製すると共に、それらプローブとペプチドタグ融合タンパク質で構成するハイブリッド複合体の形成により、生物活性化合物とタンパク質の特異的相互作用を蛍光検出するケミカルバイオセンシング技術の開発に取り組んだ。そして現在、ハイブリッド複合体形成の確認およびそれらの利用による高感度検出原理の有用性等の検証に至っている。

研究成果の概要(英文)：In this research, to develop a chemical biosensing technology that enables ultrasensitive detection of bioactive compound-protein interactions, fluorescent molecule-displayed probes with specific affinity for peptide tags were originally synthesized. In addition, the utility and potential of a new principle for detecting specific interactions between the fluorescent probes and cell-free synthesized proteins having the peptide tags were evaluated.

研究分野：生物分子科学

キーワード：バイオセンシング 生物活性化合物

### 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞内ネットワークを構成する特定のタンパク質と結合する天然化合物や合成化合物を探索・利用することで、目的の細胞機能を解析もしくは制御しようとする「ケミカルバイオロジー研究」が注目を集めている。そして、そのケミカルバイオロジーの概念と手法の活用により、様々な疾患の原因となる標的タンパク質に結合する生物活性化合物を創出し、それらを新たな医薬品として開発する創薬基盤研究が展開されている。つまり、今後の当該研究分野を加速推進するためには、“生物活性化合物の迅速かつ効率的な探索と同定”を可能にする革新的基盤技術の確立と普及が期待されている。

これまで、微生物や植物などから抽出された天然化合物は、有機合成的手法により合成することが難しいユニークな構造を有するだけでなく、様々な生物活性を発揮することから、数多くの医薬品として開発されてきた経緯がある。それゆえ、天然化合物で構成した大規模なケミカルライブラリーを構築すると共に、それらを基板表面上に固定化したプレートやスライドなどを作製し、生物活性化合物候補と標的タンパク質との相互作用を検出するケミカルスクリーニング法の確立は、創薬候補となり得る生物活性化合物を迅速かつ効率的に発見するにあたり極めて有効となった。

事実、各種化合物を固定化したプレートやアレイなどを利用したケミカルスクリーニング法は、ケミカルバイオロジーおよび創薬基盤研究において威力を発揮しており、新たな生物活性化合物の探索からバイオプローブもしくは創薬シーズの開発までを加速する必要不可欠な技術として認知されるようになった。しかし、解決すべき課題も数多く残されている。例えば、(1)プレートやアレイ基板上において希少性の高い微量の化合物を固定化する特殊機器の開発と整備、(2)生細胞により発現した標的タンパク質の精製・保存などにかかる時間とコストの削減、(3)化合物と標的タンパク質の相互作用を蛍光等で検出する場合に生じる問題(例えば、蛍光分子の化学的修飾によるタンパク質の構造変化や凝集、蛍光検出用抗体の非特異的吸着による検出障害など)が挙げられる。それゆえ、これらの諸問題を早期に解決もしくは改善できる新たな原理・技術の開発が期待されている。

そこで本研究課題では、これまでに研究代表者が取り組んできた「試験管内タンパク質合成システムを利用したバイオディスプレイ法の開発と創薬基盤研究への応用」において獲得した知見を基に、生物活性化合物と標的タンパク質との微弱な相互作用を高感度に検出することを可能にする「超高感度ケミカルバイオセンシング技術」の開発に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、これまでに研究代表者が培ってきた“試験管内タンパク質合成システムの設計およびタンパク質とRNAで構成したハイブリッド複合体の合成”に関する知見を拡張させることで、「標的タンパク質の試験管内高速合成」および「蛍光分子提示型プローブ」を開発する。さらに、それら標的タンパク質とプローブで構成されるハイブリッド複合体を合成することで、極微量の生物活性化合物と標的タンパク質の相互作用を特異的に蛍光検出する「超高感度ケミカルバイオセンシング技術」を開発することを目指す。そして、従来の蛍光検出に関連する諸問題を解決する本原理の確立により、これまでに見落とされてきた生物活性化合物と標的タンパク質の特異的相互作用を見出し、新たなバイオプローブや創薬シーズを創出する創薬基盤技術への展開を視野に入れて取り組む。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、(1)「試験管内タンパク質合成システムによる標的タンパク質の高速合成」、(2)「RNA構造を利用した蛍光分子提示型プローブの作製」、そして、(3)「標的タンパク質とプローブで構成したハイブリッド複合体の形成と利用」により、希少な生物活性化合物に対して特異的に結合する標的タンパク質を迅速に蛍光検出する「超高感度ケミカルバイオセンシング原理」の設計に特徴がある。

具体的には、(1)“小さなRNAモチーフ”に対して高い親和性を示すペプチドおよびペプチドアプタマーなどをタンデムに配向した「RNA結合性ポリペプチドタグ」を新たに設計し、遺伝子工学的手法を用いて標的タンパク質に融合する。一方、(2)「蛍光分子提示型プローブ」は、上記のポリペプチドタグが特異的に結合するRNAモチーフを5'端に導入したRNAと、蛍光分子を取り込むためのRNAの二つの成分で構成されている。そして、(3)「RNA結合性ポリペプチドタグを融合した標的タンパク質」と「蛍光分子提示型プローブ」のRNAモチーフとの結合により、「蛍光性を発揮するハイブリッド複合体」を形成させることで、従来の蛍光修飾型抗体による認識、蛍光分子の化学的修飾、蛍光タンパク質の融合などでは検出できない生物活性化合物とタンパク質の微弱な相互作用を検出する新たな原理の創出に取り組む。

### 4. 研究成果

本研究課題では、RNAモチーフ boxB に結合するペプチドアプタマーBap (= 約 2 kDa)とRNAモチーフ Cv に結合するタンパク質 Cvap (= 約 20 kDa)をタンデム化した融合タンパク質 Bap-Cvap を遺伝子工学的手法により合成すると共に、それら二種類のRNAモチーフをタンデム化した boxB-Cv を有機化学的手法により合成した。そして、それらのペアで構

成されるハイブリッド複合体の形成を電気泳動によるゲルシフトおよび SPR(Surface Plasmon Resonance)測定などにより評価した。その結果、単独のペプチドもしくはタンパク質と RNA モチーフで形成される複合体に比べ、タンデム化した融合タンパク質と RNA モチーフで形成される複合体の安定性が向上していることを明らかにした。しかし、Cvap の分子量は、標的タンパク質に融合するタグとしては大きく、生物活性化合物と標的タンパク質の相互作用における立体的障害が懸念された。そこで、各種 RNA モチーフに対して結合する低分子量のペプチドを選定し、それらのタンデム化ペプチドおよびタンデム化 RNA モチーフの設計と合成に取り組んだ。

具体的なタンデム化ペプチドとしては、Rev ペプチド、boxB 結合性ペプチド、BIV tat ペプチドの組み合わせで構成し、タンデム化 RNA モチーフは、それらペプチドに結合する低分子量の RNA もしくは RNA アプタマーにより構成した。そして、それぞれに対応するハイブリッド複合体の形成および安定性を電気泳動によるゲルシフトを指標にして評価した。その結果、ハイブリッド複合体の形成において最適かつ最小のポリペプチドタグと RNA モチーフのペアを新たに数種類見出すことに成功した。そして、それら RNA モチーフを導入した蛍光分子提示型プローブの作製を試みると同時に、ペプチドタグを融合するための様々な標的タンパク質(例えば、FKBP12, Cyclophilin A, DHFR, KRas, p38 など)の設計および試験管内タンパク質合成システムによる発現の有無とそれらの発現量の比較を実施した。その結果、今回の試験に採用した数十種類の標的タンパク質の発現はすべて確認できたものの、幾つかの標的タンパク質の発現量は予想よりも低く、今後の技術開発に適用するには十分でないことが判明した。そこで、ペプチドタグを導入する配列の改変をはじめ、タンパク質をコードする配列およびスペーサー配列の最適化、試験管内タンパク質合成システムに利用する mRNA の精製度の向上、翻訳反応の時間や温度などの条件を緻密に検討した。この結果、各種タンパク質の発現量を優位に向上させることに成功しただけでなく、様々な分子量(～約 150kDa)の標的タンパク質の発現も可能となった。そして、現在、試験管内タンパク質合成システムにより発現させた各種標的タンパク質と蛍光分子提示型プローブで構成されるハイブリッド複合体の形成を確認すると共に、それら複合体を利用した高感度検出原理の確立・検証に至っている。

今回、本研究課題で得られた成果は、一部ではあるが、シンポジウム・学会・研究会などにおいて発表することで、本技術の有用性や可能性を議論しただけでなく、今後の技術開発の問題点を解決する意見等を得ることができた。また、本研究課題で開発した各要素技術は、試験管内タンパク質合成システム

およびバイオディスプレイ技術の高度化にも適用できることから、それらの特許化も視野に入れながら、今後のケミカルバイオロジー・創薬基盤研究への貢献に繋げていく。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

Akira Wada and Hiroyuki Osada  
Ribosome Display and Photo-Cross-Linking Techniques for Target Identification of Bioactive Compounds  
The 1st CSRS (Center for Sustainable Resource Science)-ITBM (Institute of Transformative Bio-Molecules) Joint Workshop and Pre-meeting  
Jan. 7th, 2015  
Sakata-Hirata Hall, Nagoya University, Aichi (Japan)

Akira Wada  
Development of Molecular Evolution Technology for Selection of Target Binding Peptides/Proteins  
The International Symposium on Material Architectonics for Sustainable Action 2014  
Jul. 18th, 2014  
International Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA) Auditorium in National Institute for Materials Science (NIMS), Ibaraki, (Japan)

原 秀太・和田 章・長田 裕之  
光固定化ビーズを用いて生物活性小分子の標的タンパク質を探索するリボソームディスプレイ法の開発  
日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会  
2013年6月19日  
東京医科歯科大学 M&D タワー(東京)

Akira Wada, Shuta Hara, and Hiroyuki Osada  
Development of Ribosome Display Method for Identification of Target Proteins of Bioactive Small Molecules  
RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology, the 2nd Symposium  
Apr. 16th, 2013  
RIKEN, Suzuki Umetaro Hall, Saitama (Japan)

原 秀太・和田 章・長田 裕之  
生理活性小分子の標的タンパク質を同定する進化分子工学的手法の新規開発  
化学生物学研究会  
2012年10月12日

慶應義塾大学 日吉キャンパス（神奈川）

和田 章・長田 裕之  
生命科学・創薬研究に応用する「生物機能分子探索テクノロジー」の新規開発  
BIO tech 2012  
第 11 回 国際バイオテクノロジー展 /  
技術会議 - アカデミックフォーラム -  
2012 年 4 月 26 日  
東京ビッグサイト（東京）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

和田 章 (WADA, Akira)  
理化学研究所・長田抗生物質研究室・  
専任研究員  
研究者番号：90443051