

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350970

研究課題名(和文)人工架橋構造と非天然アミノ酸による多様な分子形状形成と機能創出

研究課題名(英文)Creation of diversified molecular formations and functions using artificial cross-linking and non-natural amino acids

研究代表者

根本 直人(NEMOTO, Naoto)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：60509727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：cDNAディスプレイ法は無細胞翻訳系を試験管内でペプチドやタンパク質を進化させる技術で、非天然アミノ酸や架橋剤を用いた化学架橋が可能である。この特徴を生かして従来にはない複雑な形状のペプチドを作製できると考えた。本研究ではその基盤技術を確立すべく無細胞翻訳系を用いた1)非天然アミノ酸の導入技術 2)架橋剤を用いた翻訳後の化学架橋技術の開発に成功した。1)では翻訳後、クリックケミストリーを用いて30%の効率で従来にない高い非天然アミノ酸の導入に成功し特許出願した。2)では架橋剤の長さの違いにより機能が異なることを示し、論文7報にまとめた。これらより新規能ペプチドの創製が進展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：cDNA display is an in vitro selection method to evolve peptides and proteins, which allow the introductions of non-natural amino acids and chemical modification after translation. This advantage enables a peptide to form a multiple of formation. In this study, we developed two kinds of elemental technologies to diversify peptide formations, 1) introduction of non-natural amino acids, 2) chemical cross-linking of disulfide bonds in a peptide with cross-linking agents. These achievements were published by seven journal papers and three patents.

研究分野：進化分子工学

キーワード：進化学 ペプチドライブラリ 多様性 試験管内進化

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は 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 法はライブラリサイズが 10^{12} 程度と膨大であるが 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 (Yamaguchi, Nemoto et al. Nucleic Acid Res 2009)、さらに改良を加えてハイスループット化のための One-pot preparation 法 (Mochizuki, Nemoto, et al. ACS Comb Sci. 2011) を開発した。これによりスクリーニング対象を従来不可能であった生細胞や RNA といった不安定な分子にまで拡張することが可能となった (根本, 他, 生物物理 2013)。また、このような cDNA ディスプレイ技術を応じわれわれは従来では不可能と考えられた低分子化合物に結合するペプチドアダプターの試験管内淘汰を行った。ペプチドライブラリはシステイン残基の含有率を高めて 30 残基程度ではあるものの複数のジスルフィド架橋結合を有するペプチドアダプターになるように設計し実験したところ、2つのジスルフィド結合を有するペプチドが特異的にアミノ基に結合することを見出した。従来から環状化ペプチドはファージディスプレイを用いて試験管内淘汰の例が多くあったが、最近ではこのように複数の架橋構造を有するペプチドにすることで、より高度な認識能を付与しかつプロテアーゼ耐性を向上させる研究が盛んになってきた (Angelini, et al., J. Med. Chem. 2012, 55, 10187-10197)。従来はシステイン残基を用いたジスルフィド結合のみによる架橋構造であったが、化学架橋剤を用いて従来にはない架橋構造を持たせる例もでてきた。cDNA ディスプレイはペプチドを無細胞翻訳系で合成した後、磁性体ビーズ上に固定化するため、1) 分子間での架橋反応が生じにくい、2) バッファー交換等が容易、といった優れた特徴を有するため、このような架橋剤を用いたペプチドの試験管内淘汰に有利であると考えている。

2. 研究の目的

- 1) 3つのシステインと架橋する架橋剤を用いてシステインの位置もランダム化した際にペプチドの 3 次構造が多様性をもつことを明らかにする。
 - 2) ペプチドアダプターとしての親和性、特異性を明らかにする。
- 進化分子工学における分子多様性の課題

はライブラリ構築における 1 次配列の多様性に依存すると考えられてきた。しかし、天然の生理活性ペプチドは S-S 結合を中心とする多くの架橋構造により、その形状を多様化すると同時に機能的にもその特異性や安定性を著しく向上させている。

本研究は進化工学的には天然の生理活性ペプチドの特徴をさらに人為的に拡張し、人工的な架橋構造による分子表面形状の多様性創出の可能性を実証する試みである。

従来からも人工的な架橋構造の取り組みは環状化ペプチドに代表されるように存在していた。また、最近では 3 カ所のシステインを同時に 1 つの架橋剤で結ぶ Bicyclic ペプチドの試みも報告されている。このような従来の架橋構造をもつライブラリがいずれもシステインの位置を固定し、その間の配列をランダム化しているが、本研究ではシステイン自体の位置をランダム化することで、従来にはない多様な分子表面形状を創製する。すでに申請者はシステイン残基の位置をランダムにして S-S 結合による架橋で従来では取得できなかったアミノ基を特異的に認識するペプチドの取得に成功した。そこで、S-S 結合に代わる化学架橋剤にすることでより世界に類のない多様な分子表面形状を創出させ特異性のみならず安定性も向上した新規のペプチド材料の創出法につながると考えている。

3. 研究の方法

① 無細胞翻訳系を用いた非天然アミノ酸導入ペプチドの合成とその導入効率を明らかにする。

非天然アミノ酸を導入するにあたり、上田らが開発した再構成型無細胞翻訳系 PURE system (文献) を用いる。これはアミノアシル化 tRNA の種類を自由に選択できることによる。また、アミノアシル化 tRNA の調整は菅らが開発した Flexizyme (文献) によって行う。すでに複数の架橋構造を形成させるためのシステインが平均 3 個以上出現するライブラリは構築済みである。このライブラリにおいて最低 2 個以上出現するアミノ酸のコードを有する tRNA に非天然アミノ酸の導入を試みる。予備実験として配列が既知の鋳型テンプレートを用いて PURE system と非天然アミノ酸のアミノアシル化 tRNA を用いて mRNA display (mRNA-ピューロマイシン-ペプチド連結体) を調整し、ヌクレアーゼ処理後、His-tag 精製し、脱塩カラム精製したものを MALDI-TOF 質量分析計により解析、合成を確認する。

② 無細胞翻訳系を用いて cDNA ディスプレイした複数のシステインを含むペプチドを化学架橋しその構造を明らかにする。予備実験としてシステインが 3 個あるいは 4 個入ったテンプレートを鋳型として選り mRNA を合成する。この mRNA に cDNA ディス

プレイ用ピューロマイシンリンカー（文献）を連結させPURE system を用いてペプチドを合成後、磁性体ビーズ上にペプチドを固定化する。この状態でバッファー交換及び洗浄を行った後に、tris-(bromomethyl)benzene (TBMB)と反応バッファーを加えて架橋反応を行う（Angelini ら、J. Med. Chem. 55, 10187-10197, 2012）。反応後、バッファー交換し、ヌクレアーゼ処理により架橋ペプチド部分を磁性体ビーズから切り出した後に、His-tag 精製し、脱塩カラム精製したものをMALDI-TOF 質量分析計により解析、確認する。

③ 上記の技術確立後、インターロイキン 6 レセプターの細胞外ドメインに対し試験管内淘汰を行い特異的に結合するペプチドアダプターを取得する。

上記で構築したライブラリを用いて IL-6R に対して in vitro selection を行う。申請者らはすでに単純な 30 残基のランダムペプチドライブラリから IL-6R に対し cDNA ディスプレイによって試験管内進化実験を行い複数の nM 程度のペプチドアダプターの取得に成功している（Yamaguchi, Nemoto et al. Nucleic Acid Res 2009）。このため本研究で作製したライブラリでの試験管内進化実験との比較・評価が容易となる。実験は前回の論文と同じように IL-6R の細胞外ドメインをカラムや磁性体ビーズに固定化した後、cDNA ディスプレイの試験管内進化サイクルをまわす。

④ 機能ペプチドの機能解析（親和性・特異性）

架橋構造やアミノ酸修飾をもつペプチドは、化学合成が容易ではないが、申請者らは無細胞翻訳系を用いて架橋構造等をもつペプチドを合成し相互作用を調べる方法をすでに確立している（Mochizuki, Nemoto, et al., Anal Biochem, 2013）。また、同様の手法を改良し表面プラズモン共鳴（SPR）装置や蛍光相関分光法（FCS）にも応用できることがわかっている（論文準備中）。これらの手法を用いて IL-6R との相互作用を解析し親和性の高い 2 種類程度のペプチドを絞り込む。

4. 研究成果

2014 年度は次世代抗体としてアダプターが注目されているが、特にジスルフィド結合により架橋されたペプチドは血中安定性や熱安定性といった安定化が大きな強みである。そして、従来にはない多様な分子表面形状を形成させることができるため分子認識においても強みをもつと考えられる。そこで、ジスルフィド結合に架橋剤を導入することを試みた。これによりジスルフィド結合が形成できない還元条件下でも安定した架橋構造を保つことが可能となる。当研究室で開発した cDNA display 法は、無細胞翻訳系で

ペプチドやタンパク質を合成（display）した後に磁性体ビーズ上で固定化できるため、この段階で架橋剤を導入しジスルフィド結合を他の架橋に変換できることを実証した。また、この技術開発の中で未架橋のペプチドを除去する方法も確立した。

一方、非天然アミノ酸の導入には、東京大学菅裕明教授の技術である Flexizyme を利用して導入することに成功した。特に、上記の cDNA display 法の利点を生かして、リボソームには取り込めない嵩だかい非天然アミノの導入を検討した。具体的には、クリックケミストリーを用いて翻訳後修飾の形で Cy-5 のような大きな蛍光団の導入に成功した。

また、2015 年度は、前年度の成果を踏まえて、システインの位置をある程度の間隔で固定化したライブラリとランダムにしたライブラリによる同一のターゲットに対して in vitro selection を cDNA display 法により行った。その結果、あらかじめシステインの位置を固定化してその他の領域をランダムにするよりも N 末端にシステインを 1 個固定化し、ジスルフィド結合するシステインの位置をランダムにした方が効率的にペプチドアダプターを取得できることがわかった。

2016 年度は天然の生理活性が高い複雑な架橋構造を取るコトキシンのような人工ペプチドの取得を試みた。そのためにシステインがランダムに出現するライブラリを cDNA display にした後、有機溶媒中で架橋剤を投入し、本来、水溶液中ではとれない架橋構造を形成させることで従来にはない多様な表面構造を取らせることとした。そのためこれを水溶液中に移し、以前、スクリーニング結果がでていたインターロイキン 6 レセプター（IL-6R）を標的に in vitro selection を行った。この結果、従来とは明確に異なる配列が取得された。

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) Kazuki Takahashi, Masato Sunohara, Takuya Terai, Shigefumi Kumachi and Naoto Nemoto, Enhanced mRNA-protein fusion efficiency of a single-domain antibody by selection of mRNA display with additional random sequences in the terminal translated regions, Biophysics and Physicobiology 14, 23-28 (2017) (査読有)
- 2) 根本直人, cDNA ディスプレイによる機能性ペプチドアダプターの創生, 日本生物工学会誌, 94, 8, 481-484 (2016) (査読有)
- 3) 熊地重文、根本直人, 試験管内進化を加

速する cDNA display システム, 酵素工学ニュース, 76, 21-25(2016) (査読有)

- 4) Yuki Mochizuki, Takeru Suzuki, Kenzo Fujimoto, Naoto Nemoto, A versatile puromycin-linker using cnvK for high-throughput in vitro selection by cDNA display, Journal of Biotechnology, 212, 174-180(2015) (査読有)
- 5) Tanemura Y, Mochizuki Y, Kumachi S, Nemoto N., Easy and rapid binding assay for functional analysis of disulfide-containing peptides by a pull-down method using a puromycin-linker and a cell-free translation system, Biology (Basel), 4, 1, 161-172(2015) (査読有)
- 6) Mochizuki Y, Nishigaki K, Nemoto N., Amino group binding peptide aptamers with double disulphide-bridged loops selected by in vitro selection using cDNA display, Chem Commun, 50, 42, 5608-5610(2014) (査読有)
- 7) 根本直人, 架橋ペプチドの進化学とその応用, 化学工業, 65, 12, 13-18(2014)

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 根本直人, "cDNA display method and its applications for the in vitro selection of functional peptides, 第 68 回日本生物工学会大会, 2S-Ca05, 2016(9/29) 富山国際会議場 (富山県富山市)
- 2) 種村裕太郎, 望月佑樹, 糠塚明, 福田裕章, 根本直人, 試験管内ジスフィドリッチペプチドアプタマー淘汰のためのライブラリデザイン比較, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2P0913, 2015(12/1-4) 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- 3) 水谷真奈, 新井秀直, 種村裕太郎, 望月佑樹, 根本直人, 化学架橋剤導入による高安定化架橋ペプチドアプタマーの試験管内淘汰, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2P0912, 2015(12/1-4) 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- 4) 種村裕太郎, 望月佑樹, 熊地重文, 根本直人, 新規ピューロマイシン・リンカーを利用した翻訳後修飾ペプチドのプルダウン法, 37 回日本分子生物学会年, 2P-0917, 2014(11/26) 横浜パシフィコ (神奈川県・横浜市)
- 5) 望月佑樹, 根本直人, 試験管内選択によ

り取得されたジスフィドリッチペプチドアプタマーは分子認識スキフォールドとなりうるか?, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2P-0908 (2W13-7), 2014(11/26) 横浜パシフィコ (神奈川県・横浜市)

- 6) 根本直人, 進化学による機能分子創出・・・cDNA display 法からのアプローチ 第 19 回分子複合医薬研究会分子複合医薬研究会, 2014 (11/21) 横浜パシフィコ (神奈川県横浜市)
- 7) Yuki Mochizuki, Koichi Nishigaki, Naoto Nemoto, Exploring the peptide aptamer against amino group on a solid-phase by cDNA display and analysis of its molecular recognition mechanism 第 52 回日本生物物理学会年, 54, S76(2P040), 2014(9/25-27) 金沢大学 (石川県金沢市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1) 名称: 試験管内淘汰及び分子間相互作用解析のための高速光架橋型共用リンカー、そのリンカーを用いた試験管内淘汰方法、親和性測定用リンカータンパク質の作製方法及びその方法で作製された親和性測定用リンカータンパク質

発明者: 根本直人、望月佑樹

権利者: 埼玉大学

番号: 特願 2015-072810

出願年月日: 2015 年 3 月 31 日

国内外の別: PCT/JP2016/060611

2) 名称: 架橋ペプチドの作製方法、及びその方法を用いて作製した架橋ペプチド

発明者: 根本直人、種村裕太郎、糠塚明

権利者: 埼玉大学・デンソー

番号: 特願 2015-220862

出願年月日: 平成 27 年 1 月 1 日

国内外の別: 国内

3) 名称: 非天然アミノ酸含有ペプチドライブラリ

発明者: 根本直人、照井直樹

権利者: 埼玉大学

番号: 特願 2016-115257

出願年月日: 平成 28 年 6 月 9 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[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・教授
研究者番号：60509727

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し