

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15H01810

研究課題名（和文）進化分子工学を用いた診断・治療用機能化分子認識ペプチドの創成

研究課題名（英文）Creation of molecular recognition peptides for therapy and diagnosis by evolutionary molecular engineering

研究代表者

伊藤 嘉浩 (Ito, Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・創発物性科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40192497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 30,900,000円

研究成果の概要（和文）：進化分子工学技術（環境応答性蛍光基、電気化学重合性基、タンパク質リガンドを非天然アミノ酸として組み込んで行う化学拡張型）を用いて、有用な診断用、治療用ペプチドを開発した。

具体的には、混合するだけでバイオマーカーと相互作用し、蛍光を発生できるペプチドや、電気化学重合によって標的を分子認識・感知できるペプチドを診断用分子として開発するとともに、高活性な阻害剤薬剤、厳密な標的指向性をもつドラッグ・デリバリーシステム用リガンドを治療用ペプチドとして開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療分野では様々な診断用、治療用の試薬が用いられ、中でも抗体は、タンパク質を検出したり、抗体医薬として多様な疾患に用いられている。しかし、抗体は通常マウスなどの動物や動物細胞を用いて作られ、分子量も高く、製造コストも高い。抗体機能を代替するもっと低分子量のものができれば有用である。

本研究では、進化分子工学を用いて、中分子量（数千）で固相法などの有機合成法で製造できるペプチドをベースにした抗体代替物ができることを明らかにした。これにより具体的に、がんの早期発見、感染症に関係するウイルスの簡便な検出法、新しい抗癌剤、副作用を抑制する抗癌剤デリバリーなどが可能であることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Peptide molecules for diagnosis and therapy were developed using chemically extended evolutionary engineering which contains environment-dependent fluorescent group, electrochemical polymerizable group, or protein ligand as a non-coding amino acid.

The incorporation of fluorescent group enabled fluorogenic peptides by interaction with biomarkers. By using the polymerizable group, electro-biosensing peptide was developed. The utilization of protein ligand enhanced the activity of inhibitor drug and the selectivity of drug targeting.

研究分野：生体材料学

キーワード：進化分子工学 ペプチドアプタマー 蛍光プローブ 電気化学プローブ 中分子創薬 ドラッグデリバリーシステム ナノメディシン

### 1. 研究開始当初の背景

任意のターゲットに結合できる核酸やペプチドを探索する進化分子工学は、天然核酸やアミノ酸を用いて、1990年前後に各々 SELEX やファージ・ディスプレイ法として確立された。得られる核酸やペプチドは、アプタマーと呼ばれるようになった。生体内で免疫反応が行う抗体生産を試験管内で行えるようになった。しかし、当然ながら、その機能は抗体と同じで結合するだけであった。そのような中、1990年後半から非天然核酸が、10年ほど前から非天然アミノ酸が導入されるようになった。それでも依然、結合性の強化や触媒活性の付与に終始していた。申請代表者は、1990年前後に生体分子を用いた進化分子工学が提唱されると、この分子認識を創成する概念に魅了され、この概念を人工分子へ拡張し、機能化分子認識を創成することを目指してきた。

そして、我々の研究グループでは、進化分子工学を化学拡張することで、全くこれまでにない機能を付与することに成功してきた。一連の研究は注目を集め、例えば、アゾベンゼンを導入した光応答性ペプチドについては、最近、アメリカやカナダのグループが著名学術雑誌などで我々の報告を引用しながら、標的を変えて追従する論文を発表するようになってきた。現在、我々は、先導的な立場で、新規機能を発現する分子認識機構を開発している。本申請では、このような状況を踏まえ、特に医療応用を目指した診断用、治療用機能分子の創成を目指すことを企画した。

### 2. 研究の目的

特に最近、人工機能化アミノ酸を導入した進化分子工学の方法論を生み出し、診断、治療に応用できる機能化分子認識ペプチド創出のシステムを確立した。本申請では、確立した技術を用いて、混合するだけでバイオマーカーと結合し、蛍光を発生させる分子認識ペプチドや電気化学重合性基を導入したペプチドを診断用分子として創成することを、そして一方で、厳密な標的指向性をもつドラッグ・デリバリー (DDS) 用リガンドや高活性・高選択性阻害剤あるいは活性化剤を治療用ペプチドとして開発することを目指した。

本研究は、従来のホスト・ゲスト化学、分子認識化学で培われた基礎化学に、任意の標的を分子認識できるようにする進化分子工学を融合するという独創性から、新しい研究領域を開拓し、さらに機能化分子認識として医療応用展開できるようになると期待される。

### 3. 研究の方法

本研究で用いる化学拡張進化分子工学の全体像を図1に示す。通常の進化分子工学では、ランダム配列の DNA から転写、翻訳が行われ、リボソーム・ディスプレイ (mRNA ディスプレイ) で、ランダム配列ペプチドが、mRNA 情報を伴って提示されるが、無細胞翻

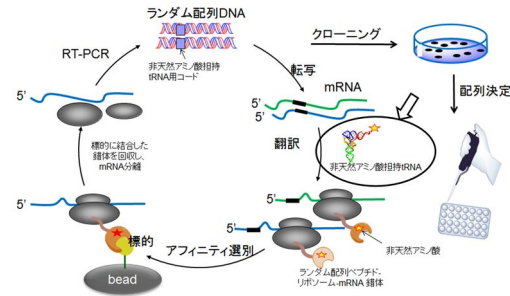


図1. ペプチド進化分子工学の基本工程。翻訳段階で、非天然アミノ酸保持 tRNA を加えることで、非天然アミノ酸含有ペプチド・ライブラリーを構築 (リボソームディスプレイ) し、アフィニティ選別し、mRNA を RT-PCR 増幅し、再度同じ工程を繰り返す。この一連のサイクルを 5, 6 回循環させ、最終的に得られた RNA(DNA) をクローニングして配列を明らかにする。

訳系に、非天然アミノ酸を担持した tRNA を加えることで、非天然アミノ酸を含んだランダム配列ペプチド・ライブラリーが形成されることになる。本研究では、非天然アミノ酸として、環境応答性の蛍光基、電気化学重合性基、および低分子リガンド (抗がん剤や葉酸) を tRNA に結合し、翻訳系に添加し、ペプチドを選別し、その機能評価、応用性を評価した。

### 4. 研究成果

第一には、抗体のように標的の検出のために結合体と非結合体を分離することが不要で、検体に加えるだけで蛍光分子自身の環境応答能による蛍光変化によって直ちに検出ができるような進化分子工学システムを構築し、ペプチドを調製できるようにした。導入する環境応答性蛍光基には、7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD)を用いた。標的として、ペロ毒素、ウイルス (インフルエンザ、HIV など)、癌マーカー (サイトケラチン、ヒートシ

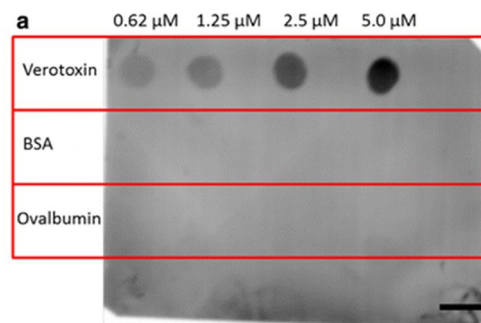


図2. ポリフッ化ビニリデン膜上にペロ毒素、ウシ血清アルブミン (BSA)、オボアルブミン (Ovalbumin) を、濃度を変えてスポット状に染み込ませ、ペプチドを添加すると、ペロ毒素の存在下でのみ高濃度ほど蛍光量が減少し、存在を確認することができた。ふき取り検査などで、ペロ毒素の存在を調べる際に有効であることがわかった。

ヨックプロテイン)、カルモジュリンを選び、選別を行った。

ペロ毒素では、相互作用すると蛍光量が減少するペプチドプローブを得ることができ、図2に示すように、ポリフッ化ビニリデン膜上にペロ毒素、ウシ血清アルブミン、オボアルブミンを、濃度を変えてスポット状に染み込ませ、一定濃度のペプチドを添加すると、ペロ毒素の存在下でのみ高濃度ほど蛍光量が減少し、存在を確認することができた。ふき取り検査などで、ペロ毒素の存在を調べる際に有効であることがわかった。

インフルエンザを標的とした場合には、ペプチド選別の結果、異なる配列を持つ3種類のペプチドプローブが得られた。図3に示すように、一定濃度の各ペプチド溶液に、様々な濃度のインフルエンザA型抗原を添加して蛍光強度を測定すると、NP1ペプチドでは蛍光強度の減少、NP2とNP3の各ペプチドでは蛍光強度が増加した。よって、これらのペプチドも、飛沫中や粘膜ぬぐい液中のウイルス検出に有効であることが分かった。

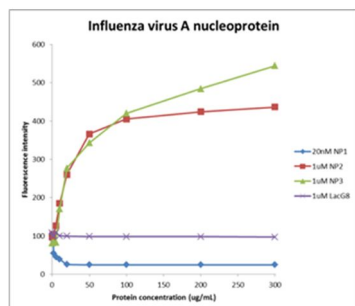


図3 選別によって得られた3種のペプチドプローブNP1-3と、標的であるインフルエンザA型抗原を混合した際の蛍光強度変化。NP1ペプチドでは標的濃度に応じた蛍光量減少、NP2,3では蛍光量増加が確認された。

さらに、ヒートショックプロテイン(Hsp90α)では図4に示すように、得られたペプチドプローブを用いて培養細胞を染色すると、細胞内Hsp90との結合に伴う蛍光増強が観測された。今回使用したT98G細胞株は42での熱ショック付与によりHsp90α発現量が増加することが知られており、選別されたペプチドでの細胞染色によってHsp90の発現量変化を可視化できることを示した。

また、すでにカルモジュリンに対して得られた環境応答性の蛍光基をNBDから4-N,N-dimethylamino-1,8-naphthalimideに変換すると、さらに蛍光強度の変化量が100倍以上に増し、検出に有効であることもわかった。さらに、環境応答性蛍光基の応用として、血液中を循環する癌細胞に高発現されている上皮細胞接着分子に対してファージ・ディスプレイで見つけられていたペプチドアプタマー配列に、NBDを導入することにより、洗浄無しでモデル癌細胞を蛍光検出できることを示した。

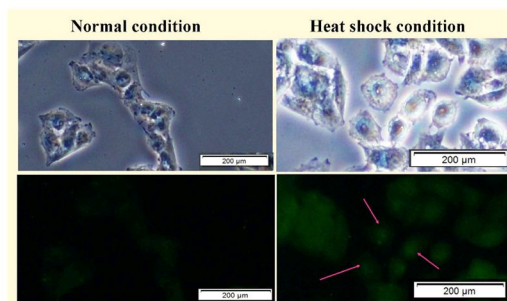


図4 ペプチドプローブを用いて細胞内Hsp90を染色したところ、熱ショックの有無によるHsp90発現量の変化を蛍光像から確認できることがわかった。

あらたに電気重合性基を導入したインフルエンザ検知ペプチドの選別に成功し、インフルエンザが存在するときには重合が阻害され、電極表面を修飾せず、インフルエンザ量が増加するほど電流量が増えるターンオン型の電気センサーの作製に成功した。原理を図5に示す。

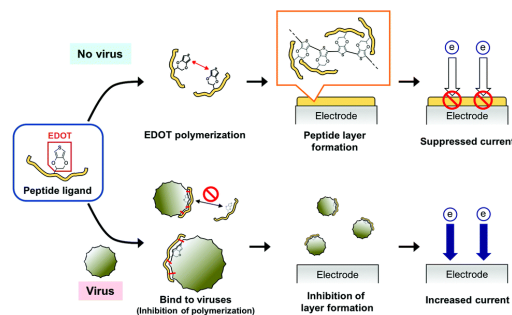


図5 電気重合性基導入ペプチドプローブによる標的ウイルスの検出原理。ウイルス不在時はペプチド同士が重合して電極表面が被覆されるが、ウイルス存在時はペプチド同士の重合による電極の修飾が阻害されるため、より高い電流値が計測されるようになる。

図6には、インフルエンザ量の増加に比例して電流値が増加することを示す。インフルエンザウイルス添加時は100 µg/mLの濃度までほぼ直線的に電流値が増加したが、エプスタインバーウイルスやウシ血清アルブミン添加時は電流値の増加は見られず、標的ウイルスを定量的に検出できることを示した。

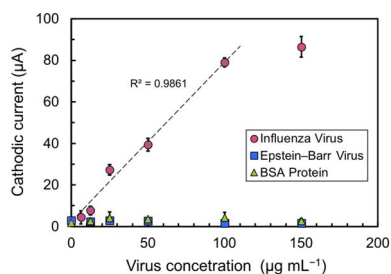


図6 電気重合性基導入ペプチドによるインフルエンザウイルス存在下での電流値変化。インフルエンザウイルス添加時のみ濃度依存的な電流値の増加が確認された。

第二には、低分子リガンドを tRNA に担持してその相互作用を基にして、アプタマーを選別する方法で高活性、高選択性を新たに付与することを目指した。

キナーゼ阻害剤である purvalanol B を担持した tRNA を調製し、その存在下で翻訳を行い、阻害剤担持ペプチド・ライブラリーを調製し、その中からサイクリン依存性キナーゼ 2 (CDK2) に結合性のペプチドを選ぶと、サイクリン依存性キナーゼ 5 (CDK5) や cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) など他のキナーゼの阻害活性も高めることがわかった。その促進効果は 10 倍から 100 倍以上にのぼった。これはアプタマー構造の付加により低分子リガンドとの相互作用だけでなく、アプタマー構造との相互作用も加わるために、作用点の増加による活性促進と考えられる。図 7 には、調製したリガンド結合ペプチドと標的キナーゼとの相互作用を分子ダイナミクス・シミュレーションした結果を示す。

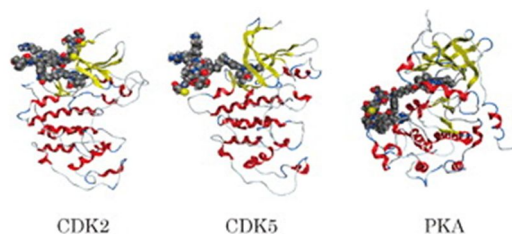


図 7. 分子ダイナミクス・シミュレーションによる、CDK2 結合性ペプチドアプタマーの結合様式の解析。CDK2 に加え、CDK5 や PKA への相互作用点増加が確認された。

次に DDS 開発で標的とされる代表的な分子の一つであり、腫瘍細胞表面に過剰発現する葉酸レセプター  $\alpha$  に特異的な親和性を示す葉酸結合ペプチドを、インシリコドッキング・シミュレーションも併用しながら生み出すことに成功した。 $\alpha$  型 (FR $\alpha$ ) と  $\beta$  型 (FR $\beta$ ) で、解離定数 ( $K_D$ ) で数十倍から数百倍の相違があるペプチド・リガンドになることが、大腸菌で生産したヒト型の葉酸レセプターを用いて明らかとなった。

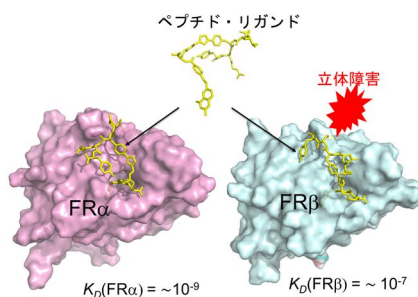


図 8. FR $\alpha$  特異的なペプチド・リガンドの調製。得られたペプチド・リガンドは、FR $\alpha$  に FR $\beta$  と比較して、100 倍程度強く結合した。

## 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 12 件)

1. Tara Bahadur K. C., Seiichi Tada, Liping Zhu, Takanori Uzawa, Noriko Minagawa, Shyh-Chyang Luo, Haichao Zhao, Hsiao-hua Yu, Toshiro Aigaki, and Yoshihiro Ito, "In vitro selection of electrochemical peptide probes using bioorthogonal tRNA for influenza virus detection", Chem. Commun., 54, 5201–5204 (2018) (査読あり)
2. Roopa Dharmatti, Hideyuki Miyatake, Chen Zhang, Xueli Ren, Akiko Yumoto, Daisuke Kiga, Masayuki Yamamura, and Yoshihiro Ito, "Escherichia coli expression, purification, and refolding of human folate receptor  $\alpha$  (hFR $\alpha$ ) and  $\beta$  (hFR $\beta$ )", Protein Expr. Purif, 149, 17–22 (2018) (査読あり)
3. Tara B K. C., Kanako Suga, Takashi Isoshima, Toshiro Aigaki, Yoshihiro Ito, Kiyotaka Shiba, and Takanori Uzawa, "Wash-free and selective imaging of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) expressing cells with fluorogenic peptide ligands", Biochem. Biophys. Res. Commun., 500, 283–287 (2018) (査読あり)
4. Shin-Hye Park, Takanori Uzawa, Fumiyuki Hattori, Shuichi Ogino, Shuichi Ogino, Naoki Morimoto, Satoshi Tsuneda, and Yoshihiro Ito, "All-in-one" in vitro selection of collagen-binding vascular endothelial growth factor", Biomaterials, 161, 270–278 (2018) (査読あり)
5. Tran Thi Thanh Thoa, Noriko Minagawa, Toshiro Aigaki, Yoshihiro Ito, and Takanori Uzawa, "Regulation of photosensitisation processes by an RNA aptamer", Sci. Rep., 7, 43272 (2017) (査読あり)
6. Yasodha Manandhar, Wei Wang, Jin Inoue, Nobuhiro Hayashi, Takanori Uzawa, Yutaka Ito, Toshiro Aigaki, and Yoshihiro Ito, "Interactions of in vitro selected fluorogenic peptide aptamers with calmodulin", Biotechnol. Lett., 39(3), 375–382 (2017) (査読あり)

7. Wei Wang, Liping Zhu, Yoshinori Hirano, Marziyeh Karamiavargani, Seiichi Tada, Guanxin Zhang, Takanori Uzawa, Deqing Zhang, Takuji Hirose, Makoto Taiji, and Yoshihiro Ito, "Fluorogenic enhancement of in vitro selected binding peptide ligand by replacement of fluorescent group", *Anal. Chem.*, 88(16), 7991–7997 (2016) (査読あり)
8. Chen Zhang, Hideyuki Miyatake, Yu Wang, Takehiko Inaba, Yi Wang, Peibiao Zhang, and Yoshihiro Ito, "A bioorthogonal approach for the preparation of a titanium-binding insulin-like growth factor-1 derivative using tyrosinase", *Angew. Chem. Int. Edn.*, 55, 11447–11451 (2016) (査読あり)
9. Wei Wang, Yoshinori Hirano, Takanori Uzawa, Makoto Taiji, and Yoshihiro Ito, "Assisted enhancement of inhibitory effects of small molecular inhibitors for kinases", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 89, 444–446 (2016) (査読あり)
10. Qingmin Zang, Seiichi Tada, Takanori Uzawa, Daisuke Kiga, Masayuki Yamamura, and Yoshihiro Ito, "Two site genetic incorporation of varying length polyethylene glycol into the backbone of one peptide", *Chem. Commun.*, 51, 14385–14388 (2015) (査読あり)
11. Zha Li, Tomoshi Kameda, Takashi Isoshima, Eiry Kobatake, Takeshi Tanaka, Yoshihiro Ito, and Masuki Kawamoto, "Solubilization of Single-Walled Carbon Nanotubes using a Peptide Aptamer in Water below Critical Micelle Concentration", *Langmuir*, 31, 3482–3488 (2015) (査読あり)
12. Yasodha Manandhar, Tara Bahadur K.C., Wei Wang, Takanori Uzawa, Toshiro Aigaki, and Yoshihiro Ito, "In vitro selection of a peptide aptamer that changes fluorescence in response to verotoxin", *Biotechnol. Lett.*, 37(3), 619–625 (2015) (査読あり)

[学会発表](計 69 件)

1. Md. Mofizur Rahman, Motoki Ueda, Takuji Hirose, Yoshihiro Ito, "Peptide-

lipid-hybrid multi-lamellar vesicular carrier for drug delivery system" 第 67 回高分子学会年次大会、2018 年 3 月 23 日、名古屋、口頭発表

2. 多田誠一、Xueli Ren、Hongli Mao、宮武秀行、伊藤嘉浩「3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) 含有ペプチドの導入による表面結合性上皮増殖因子の創製」第 17 回日本再生医療学会総会、2018 年 3 月 21 日、横浜 口頭発表
3. Xueli Ren, Hideyuki Miyatake, Yoshihiro Ito. "The preparation of mussel-inspired adhesive vascular endothelial growth factor by sortase-mediated reactions". *ConBio2017 Dec.6-9, 2017, Kobe, Japan.*
4. Yoshihiro Ito, "Adhesive Growth Factors Inspired by Underwater Adhesion Proteins", 2017-TERMIS-AP, 2017 年 9 月 22 日、Nantong, China, Invited lecture  
他 65 件

[図書](計 7 件)

1. 伊藤嘉浩「第 3–4 節 生物進化をまねた分子部品的设计」、「ナノテクノロジーが拓く未来の医療」片岡一則編集、丸善プラネット、p.186-204 (2017)
2. 伊藤嘉浩「第 3 章 新しいナノメディン材料の作り」、「ナノテクノロジーが拓く未来の医療」片岡一則編集、丸善プラネット、p.149-151 (2017)
3. 多田誠一、宮武秀行、伊藤嘉浩、「接着性成長因子ポリペプチドの設計と合成」、「医療・診断をささえるペプチド科学—再生医療・DDS・診断への応用—」平野義明監修、シーエムシー出版、p.150-156 (2017)
4. Yoshihiro Ito, Xuesi Chen, Inn-Kyu Kang, "Preface", in "Advances in Bioinspired and Biomedical Materials, volumes 1 and 2", American Chemical Society, p.ix–x (2017)
5. Motoki Ueda, Stefan Muller, Siyoong Seo, Md. Mofizur Rahman, and Yoshihiro Ito, "Integrated nanostructures based on self-assembled amphiphilic polypeptides", in "Advances in Bioinspired and Biomedical Materials, volume 1" ed by Yoshihiro Ito,

Xuesi Chen, and Inn-Kyu Kang,  
American Chemical Society, p.19-30  
(2017)

6. Chen Zhang, Hideyuki Miyatake, and Yoshihiro Ito, "Adhesive growth factors inspired by underwater adhesive proteins", in "Advances in Bioinspired and Biomedical Materials, volume 1" ed by Yoshihiro Ito, Xuesi Chen, and Inn-Kyu Kang, American Chemical Society, p.83-91 (2017)
7. Seiichi Tada, Takanori Uzawa, and Yoshihiro Ito, "Creation of functional peptides by evolutionary engineering with bioorthogonal incorporation of artificial components", in "Green Polymer Chemistry III: Biobased Materials and Biocatalysis", ed. by H. N. Cheng, R. A. Gross, and P. B. Smith, ACS Symposium Series, Am. Chem. Soc., p.169-180 (2015)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：ポリペプチドを結合した成長因子及びその利用

発明者：伊藤嘉浩、宮武秀行、串田尚

権利者：国立研究開発法人理化学研究所、帝国  
人株式会社

種類：特許

番号：特願 2015-165014 (P2015-165014)

出願年月日：平成 27 年 8 月 24 日 (2015.8.24)

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.riken.jp/nano-  
med.eng.lab/index.html](http://www.riken.jp/nano-med.eng.lab/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤嘉浩 (ITO Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・創発物性  
科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40192497

(2)研究分担者

上田 一樹 (UEDA Motoki)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ  
医工学研究室・研究員

研究者番号：10615040

多田 誠一 (TADA Seiichi)

国立研究開発法人理化学研究所・創発物性

科学研究センター・研究員

研究者番号：30598165

宮武 秀行 (MIYATAKE Hideyuki)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ  
医工学研究室・専任研究員

研究者番号：50291935

植木 雅志 (UEKI Masashi)

国立研究開発法人理化学研究所・伊藤ナノ  
医工学研究室・専任研究員

研究者番号：90312264