

令和元年6月25日現在

機関番号：82731

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16644

研究課題名(和文) ペプチドアレイ定量に基づいた未踏ペプチドリガンド配列の分子進化的探索

研究課題名(英文) Study for screening and selection of unexplored peptide sequence space based on a quantitative evaluation using a high-density peptide array

研究代表者

上野 真吾 (Ueno, Shingo)

公益財団法人川崎市産業振興財団(ナノ医療イノベーションセンター)・ナノ医療イノベーションセンター・副
主幹研究員

研究者番号：30594650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：基板上無細胞翻訳によって作製する高集積ペプチドアレイを用いて機能性ペプチドをスクリーニングする技術として、無細胞翻訳されたペプチドとそれをコードするDNAを固相上に共結合させる技術を新たに開発した。また、基板上での酵素活性測定の精度向上を目的として、光反応性分子で保護された基質分子と光照射を組み合わせることで、基板上での酵素反応と測定の開始タイミングを、空間的・時間的に同期させる技術の検討を行い、原理実証に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、ペプチド医薬品等で使われる機能性ペプチドの初期スクリーニングは、ペプチドと標的分子の結合能を指標として行われている。本研究では、ライブラリー中の個々のペプチドの活性・機能を直接測定し、その測定結果を元にペプチドをスクリーニングするための技術を開発した。本研究で開発した技術を発展させることで、ペプチド医薬品等に使われる機能性ペプチドの開発効率の向上に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The technique for co-immobilization of the cell-free synthesized peptide and its DNA on a solid-phase have been developed for the screening of functional peptide using high-density peptide array, which is fabricated by on-chip cell-free translation reaction. The cell-free synthesized kinase, which was used instead of peptide for verification, have been successfully immobilized on the solid-phase via a solid-phase-immobilized DNA during the cell-free synthesis reaction by using transpeptidase sortase.

Additionally, the technique for spatiotemporal synchronization of initiation of enzyme reaction with initiation of measurement of the reaction have been investigated. We succeed the control of initiation and progression of enzyme reaction using caged-substrate and photo-irradiation. This technique enables precise measurement of on-chip enzyme reaction for the screening of enzyme-related peptide without injection of a reagent.

研究分野：進化分子工学

キーワード：ペプチドアレイ スクリーニング ペプチド医薬 活性測定

1. 研究開始当初の背景

ファージディスプレイ等の進化分子工学技術による親和性ペプチドの探索は、膨大な分子多様性を持つペプチド配列空間から親和性ペプチドを発見する手段を提供してきた。しかしながら、結合能を評価基準とする既存技術は、生理活性を有するペプチドの探索には不十分である。結合能ではなく、細胞応答や生化学反応等を評価基準とするスクリーニングは、96穴や384穴のマイクロタープレートを用いたハイスループットスクリーニングで行われるのが一般的である。本従来法は、比較的小規模な小分子化合物ライブラリー等では有効だが、たった8アミノ酸でも20の8乗=256億種の多様性を生じるペプチドライブラリーをスクリーニングするのに適したアプローチとは言えない。個々のペプチドの機能を網羅的に調べる技術としてペプチドアレイが挙げられるが、現存する一般的なペプチドアレイは、数百種から数千種のペプチドしか搭載できず、ペプチドライブラリーの分子探索への適用は事実上不可能であった。

研究代表者は、無細胞翻訳系を用いたタンパク質の基板上並列合成法の開発を進め、1cm角に百万種のタンパク質を搭載する高集積タンパク質アレイ技術を開発してきた。本技術では、約50フェムトリットルの微量容器を基板上に高集積し、その個々の微小容器内でタンパク質を無細胞合成する。さらに、その微小容器内でタンパク質の活性測定反応をも行うことで、基板上で並列的にタンパク質ライブラリーの合成とその活性評価を行うものである。本研究では、この技術を元に、基板上に高集積アレイ化したペプチドライブラリーの機能を定量的に評価することで、解析技術としてのみ用いられていたペプチドアレイを、分子探索・分子進化のツールに発展させるための技術開発を進めた。

2. 研究の目的

基板上無細胞翻訳反応によって作製する高集積ペプチドアレイを用いて、受容体や酵素と相互作用し、その応答や活性の誘導・調節を測定し、その測定結果を元にペプチドをスクリーニングする技術の開発を目的とする。本研究では、(1) ペプチドの機能とそのペプチドの配列情報に対応付けるために必要となる、基板上で無細胞合成したペプチドを、基板上のその座標に、その遺伝子配列を保ったまま固定化する技術。(2) ペプチドの機能発現とその測定を空間的・時間的に同期させる技術。を開発項目として研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 固相上での遺伝子型-表現型対応付け手法の開発

基板上で無細胞合成したペプチドを、基板上のその座標に、その遺伝子配列を保ったまま固定化する技術、即ち、固相上での遺伝子型-表現型対応付けを達成するために、グラム陽性菌由来のペプチド転移酵素である Sortase を利用する方法を考案した。Sortase はあるペプチド配列同士を選択的に連結する。固相上に遺伝子型分子である DNA を固定し、その DNA の末端に Sortase の基質ペプチド(オリゴグリシン)を修飾しておく。表現型分子であるペプチドを Sortase とその基質ペプチド(LPETG)の融合体として無細胞合成する。そうすることによって、無細胞合成された Sortase は、同一融合タンパク質内の基質ペプチド(LPETG)を認識し、固相上 DNA 末端に存在するもう片方の基質ペプチド(オリゴグリシン)に転移させる。結果として、表現型分子であるペプチドも固相上の DNA 末端に転移され、固相上での遺伝子型-表現型対応付けが達成される。本新規考案技術の原理実証のため、表現型分子をペプチドではなく酵素とし、その酵素活性を測定することで、固相上での表現型-遺伝子型対応付けの達成を評価する(図1)。

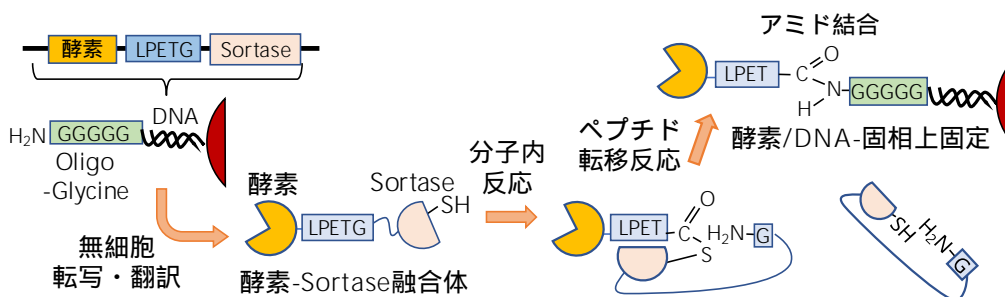


図 1. 固相上での遺伝子型-表現型対応付け手法

(2) ペプチドの機能発現とその測定を空間的・時間的に同期させる技術

ペプチドの生理活性の測定は、細胞膜受容体のリガンドとして働いたときの細胞内カルシウム濃度上昇のように短時間で終了するものや、酵素阻害剤として働いたときの酵素反応速度低下のように比較的長時間持続するものがあるが、反応と測定の開始タイミングを同期させることが、正確な活性測定では重要となる。96 穴プレート等の測定を目的とした既存のマイクロプレートリーダーでは、測定対象ウェルに反応開始溶液を添加する機能を用いて、反応と測定の開始タイミングを同期しているが、50 フェムトリットルの微小容器(口径 4 μm)で構成される本研究のペプチドアレイでは同様の手法は適用できない。そこで、ケージド分子と領域特異的紫外線照射による、反応開始タイミング制御手法について検討した。酵素阻害ペプチドのスクリーニングを想定し、光切断性分子で保護された酵素基質を用いた酵素反応測定系を構築し、紫外線照射による酵素反応開始制御について検討した。

4. 研究成果

(1) 固相上での遺伝子型-表現型対応付け手法の開発

基板上の微小容器内でペプチドを無細胞合成するために、ペプチドの遺伝子をコードした DNA が固定されたマイクロビーズを BEAMing 法 (*Nat. Methods* 3, 551-559, 2006) で調製し、そのビーズを微小容器内に配置する。BEAMing 法におけるエマルジョン PCR のプライマーの 5' 末端にペンタグリシンを修飾しておくことで、ビーズ上に固定された DNA の末端にペンタグリシンが修飾された状態を形成する。PCR プライマーへのペンタグリシン修飾は、アジド修飾 DNA と、アルキン修飾ペプチドの Huisgen 環化反応を用いて行った。

遺伝子型-表現型対応付けの成否を判断する目的で、ペプチドの代わりにキナーゼを用いた。キナーゼ遺伝子の下流に Sortase のペプチド基質 LPETG 配列、スパーサー配列を介して、Sortase の遺伝子を融合させた DNA 配列を人工遺伝子合成と seamless cloning 法を用いて構築した。この融合タンパク質をコードする DNA を、ペンタグリシン修飾プライマーと、ビオチン修飾プライマーを用いた PCR で増幅した。この PCR 産物をストレプトアビジン修飾磁気ビーズにビオチンを介して固定した。

キナーゼ-LPETG-Sortase 融合タンパク質をコードする DNA が固定化された磁気ビーズを、再構成型無細胞翻訳系と混合することにより、上記融合タンパク質を合成し、ビーズ上 DNA の末端に修飾されているペンタグリシンにキナーゼを転移させる反応を行った。陰性対照実験として、DNA の末端にペンタグリシンを修飾していないものを用いて、無細胞翻訳反応を行った。

無細胞翻訳反応後の磁気ビーズを回収し、磁気ビーズ上にキナーゼが存在するか否かを、市販のキナーゼ活性の蛍光測定試薬を用いて確認した。その結果、DNA 末端のペンタグリシン修飾の有無によって、キナーゼ活性に有意な差が見られた(図 2)。この結果より、ビーズ上の DNA から無細胞翻訳されたキナーゼが、キナーゼの融合タンパク質として発現した sortase のペプチド転移反応によって、DNA 末端のペンタグリシンに転移されたことが確認できた。キナーゼの代わりにペプチドを用いることで、微小容器内に配置された磁気ビーズ上の DNA から無細胞合成されたペプチドを、ビーズ上の DNA に結合できることを示している。つまり、基板上で無細胞合成したペプチドを、基板上のその座標に、その遺伝子配列を保ったまま固定化する技術、即ち、固相上での遺伝子型-表現型対応付け手法を開発した。

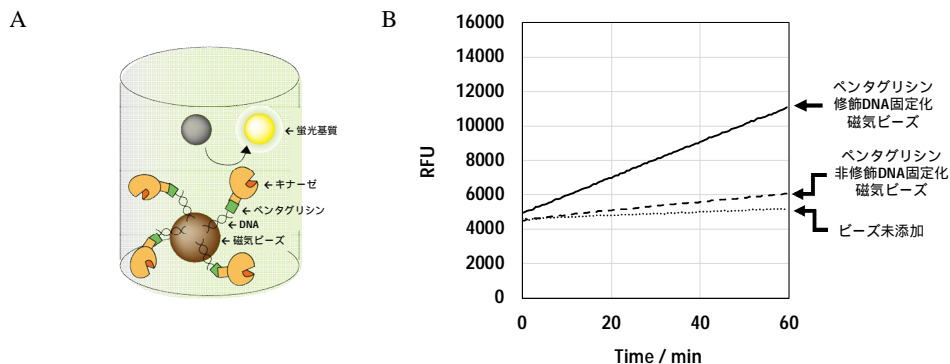


図 2. 固相上での遺伝子型-表現型対応付け手法。A. 磁気ビーズ上の DNA と対応付けられたキナーゼを蛍光試薬で検出する実験系の概念図。B. 磁気ビーズ上のキナーゼ活性の測定結果。

(2) ペプチドの機能発現とその測定を空間的・時間的に同期させる技術

ピルビン酸キナーゼの ATP 合成活性をモデル反応として、その酵素反応の開始タイミングの制御方法について検討した。ピルビン酸キナーゼは、ホスホエノールピルビン酸のリン酸基を ADP に転移させて ATP を産生する酵素である。ADP のかわりに光切断性分子で保護された Caged-ADP を用いることで、酵素反応の開始を紫外線照射で制御できるか否かを検討した。その結果、ADP の代わりに Caged-ADP を用いることで、紫外線照射前は酵素反応が起こらず、紫外線照射によって酵素反応が開始されることが確認できた。また、紫外線照射後の酵素反応進行度は、照射する紫外線のエネルギーに依存することが確認できた(図3)。これは紫外線照射によって発生する ADP の濃度が、紫外線の照射エネルギーに依存するためと考えられる。

ペプチドアレイの活性測定では、センチメートルオーダーの基板上を顕微鏡ベースの測定装置でスキャンする方法が想定される。基板上的微小容器への酵素反応液の充填は、全ての微小容器に一括で行われるが、本手法を採用することにより、スキャン開始前に基板全面で反応が開始することを抑制できる。また、紫外線照射とスキャンを同期させることで、基板上での酵素反応測定を、空間的・時間的に同期させることが可能となるものと考えられる。

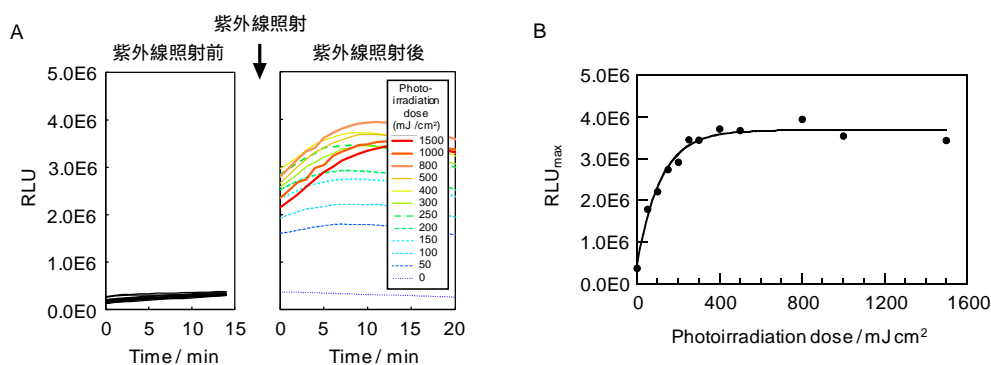


図3. 紫外線照射による酵素反応の開始タイミングの制御。A. 紫外線照射前後の酵素活性測定結果。B. 紫外線照射エネルギーと酵素活性進行度の関係

本研究を通して、ライブラリー中の個々のペプチドの活性・機能を直接測定し、その測定結果を元にペプチドをスクリーニングするための技術を開発した。本研究で開発した技術を発展させることで、ペプチド医薬品等に使われる機能性ペプチドの開発効率の向上に繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Shingo Ueno, Mika Shioya, Takanori Ichiki “Fluorometric measurement of adenosine 5'-triphosphate using exonuclease V activity”, Journal of Photopolymer Science and Technology”31, 699-704 (2018) (査読有)

DOI:10.2494/photopolymer.31.699

Shingo Ueno, Takanori Ichiki “Phototriggered control of enzyme reactions toward high-throughput screening on a microwell array chip”, Journal of Photopolymer Science and Technology”30, 657-660 (2017) (査読有)

DOI:10.2494/photopolymer.30.657

[学会発表](計29件)

白形優依、若井涼、上野真吾、一木隆範「Sortase を用いたロバストなタンパク質マイクロアレイの作製」、第66回応用物理学会春季学術講演会、東京工業大学大岡山キャンパス、文京区、東京都、2019年3月9日

Shingo Ueno, Shusuke Sato, Mika Shioya, Yui Shirakata, Shoichi Tsuchiya, Takanori Ichiki “Development of the high-density microwell array-based protein screening system”, 12th Annual Symposium on Nanobiotechnology, Nanyang Technological University, Nanyang Avenue, Singapore, 2019年2月27日-3月1日 (国際学会)

Yui Shirakata, Ryo Wakai, Shingo Ueno, Takanori Ichiki “Fabrication of a transpeptidase-mediated protein microarray by microintaglio printing”, 31st International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Sapporo, Hokkaido, Japan, 2018年11月16日 (国際学会)

Ankita Jain, Shingo Ueno, Shusuke Sato, Takanori Ichiki “Development of high-density microarray-based aptamer screening system”, 31st International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Sapporo, Hokkaido, Japan, 2018年11月16日 (国際学会)

白形優依、若井涼、上野真吾、一木隆範「ペプチド連結酵素を用いたタンパク質マイクロアレイの作製」、第79回応用物理学会秋季学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県、2018年9月18日

佐藤秀介、上野真吾、一木隆範「マイクロリアクターアレイチップの表面改質」、第79回応用物理学会秋季学術講演会、名古屋国際会議場、名古屋市、愛知県、2018年9月18日

Shingo Ueno, Shusuke Sato, Mika Shioya, Takanori Ichiki “Fluorescence-based ATP detection method for measurement on a microwell array chip”, 35th International Conference of Photopolymer Science and Technology, International Conference Hall, Makuhari Messe, Chiba, Japan, 2018年6月26日 (国際学会)

Ankita Jain, Shingo Ueno, Shusuke Sato, Takanori Ichiki “Development of DNA aptamer screening system based on high-density microarray platform”, 35th International Conference of Photopolymer Science and Technology, International Conference Hall, Makuhari Messe, Chiba, Japan, 2018年6月26日 (国際学会)

上野真吾、一木隆範「高集積マイクロウェルアレイシステムによるネオバイオ分子創出」、日本農芸化学会2018年度大会、名城大学、名古屋市、愛知県、2018年3月18日 (招待講演)

若井涼、上野真吾、白形優依、一木隆範「ペプチド連結酵素による共有結合を利用したタンパク質その場固定化技術の開発」、第65回応用物理学会春季学術講演会、早稲田大学西早稲田キャンパス、新宿区、東京都、2018年3月17日

上野真吾、佐藤秀介、塩谷美夏、飯塚怜、ジェーンアンキタ、若井涼、白形優衣、船津高志、一木隆範「人工生体分子創製を目的とした高集積マイクロウェルアレイシステム」、理研/iCONM/物材機構 医工学ネットワーク、川崎生命科学・環境研究センター/ナノ医療イノベーションセンター、川崎市、神奈川県、2017年12月12日

上野真吾「ネオバイオ分子の in vitro セレクションから on chip セレクションへ」、2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県、2017年12月7日 (招待講演)

上野真吾、佐藤秀介、若井涼、塩谷美夏、一木隆範「マイクロアレイでの分子セレクション技術の開発」、2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017、神戸国際会議場、神戸市、兵庫県、2017年12月6日

Shusuke Sato, Ankita Jain, Hiromi Kuramochi, Shingo Ueno, Takanori Akagi, Takanori Ichiki, “Fundamental study for quantitative screening of mutant proteins on a glass-made microwell array chip”, 第27回日本MRS年次大会、横浜産業貿易センタービル、横浜市、神奈川県、2017年12月6日

Ankita Jain, Shingo Ueno, Shusuke Sato, Takanori Ichiki “Development of quantitative aptamer screening using a microarray chip”, 第27回日本MRS年次大会、横浜産業貿易センタービル、横浜市、神奈川県、2017年12月6日

Ryo Wakai, Shingo Ueno, Takanori Ichiki “In situ covalent immobilization of peptide on glass substrate using transpeptidase sortase”, 第27回日本MRS年次大会、横浜産業貿易センタービル、横浜市、神奈川県、2017年12月6日

Yui Shirakata, Shingo Ueno, Takanori Ichiki “Effects of surface modification of reactor materials on cell-free synthesis” 第27回日本MRS年次大会、横浜産業貿易センタービル、横浜市、神奈川県、2017年12月6日

Shingo Ueno, Takanori Ichiki “Spatiotemporal phototriggered control of biochemical reactions for on-chip ultrahigh-throughput screening of enzyme activities”, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Savannah International Trade & Convention Center, Savannah, Georgia, USA, 2017年10月22-26日 (国際学会)

Ryo Wakai, Shingo Ueno, Takanori Ichiki “In situ covalent immobilization of protein on a chip by sortase-mediated peptide ligation”, The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Savannah International Trade & Convention Center, Savannah, Georgia, USA, 2017年10月22-26日 (国際学会)

Shingo Ueno, Shusuke Sato, Takanori Ichiki “Photo-assisted control of the initiation of enzyme reaction”, 34th International Conference of Photopolymer Science and Technology, International Conference Hall, Makuhari Messe, Chiba, Japan, 2017年6月28日 (国際学会)

⑲ Shingo Ueno, Ryo Wakai, Takanori Ichiki “On-chip cell-free synthesis and in-situ covalent immobilization of protein for fabrication of robust protein microarray”, 9th International Conference of Molecular Electronics and Bioelectronics, Ishikawa Ongakudo and ANA Crowne Plaza Kanazawa, Kanazawa, Japan, 2017年6月26日 (国際学会)

⑳ 白形優衣、竹原宏明、上野真吾、一木隆範「集積回路上へのエラストマー製マイクロウェルアレイ形成に関する基礎検討」、第64回応用物理学会春季学術講演会、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県、2017年3月16日

㉑ 若井涼、上野真吾、一木隆範「ペプチド連結酵素を用いたタンパク質のその場合成・固定化

技術」, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県、2017 年 3 月 16 日

②4 上野真吾、佐藤秀介、倉持宏美、ジェーンアンキタ、若井涼、白形優依、赤木貴則、一木隆範「人工分子進化を目的としたマクロアレイシステムの開発」, 電気学会ケミカルセンサ/バイオ・マイクロシステム合同研究会、東京大学、文京区、東京都、2016 年 12 月 21 日

②5 上野真吾、佐藤秀介、一木隆範「酵素活性のハイスループットスクリーニングのためのマイクロウェルアレイテクノロジー」, 第 26 回日本 MRS 年次大会、横浜産業貿易センタービル、横浜市、神奈川県、2016 年 12 月 20 日

②6 佐藤秀介、ジェーンアンキタ、倉持宏美、上野真吾、赤木貴則、一木隆範「PDMS チップ上で変異体タンパク質の熱安定性を評価する基礎研究」, 第 26 回日本 MRS 年次大会、横浜産業貿易センタービル、横浜市、神奈川県、2016 年 12 月 20 日

②7 若井涼、上野真吾、一木隆範「共有結合によるタンパク質のその場合成・固定化法の開発」, 第 26 回日本 MRS 年次大会、横浜産業貿易センタービル、横浜市、神奈川県、2016 年 12 月 20 日

②8 Ankita Jain, Shingo Ueno, Shusuke Sato, Takanori Ichiki, "Development of high-density microarray technology for DNA aptamer screening using self-assembled beads", 33rd International Conference of Photopolymer Science and Technology, International Conference Hall, Makuhari Messe, Chiba, Japan, 2016 年 6 月 24 日 (国際学会)

②9 Shusuke Sato, Manish Biyani, Shingo Ueno, Ankita Jain, Subhashini Raj Kumal, Hiromi Kuramochi, Takanori Akagi, Takanori Ichiki, "Large-scale high-density microarray technology for screening of highly diverse protein mutant library", The 11th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, Hotel Matsushima Taikanso & L-Park Sendai, Miyagi, Japan, 2016 年 4 月 20 日 (国際学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ペプチド-核酸複合体
発明者：上野真吾，一木隆範
権利者：川崎市産業振興財団
種類：特許
番号：特願 2018-209874
出願年：2018 年
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。