

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13269

研究課題名（和文）split inteinを利用した細胞膜透過性ペプチドスクリーニング法の開発

研究課題名（英文）Development of a screening system for cell penetrating peptides mediated by split intein

研究代表者

宮房 孝光（Miyafusa, Takamitsu）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：70760271

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）：細胞内で生じるタンパク質間相互作用は生命現象の根幹であり、その阻害を機序とする創薬は大きな期待を集めている。しかし、細胞内のタンパク質間相互作用を精緻に制御するような分子の開発は未だ困難を極めている。本研究では、細胞内で機能する人工分子の創出を目指した。細胞内への分子送達を可能にする細胞膜透過性ペプチドの簡便な選抜手法の開発に取り組んだ。また、送達に適した機能性分子の開発に取り組み、モデル分子を創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、開発と利用が広がっている抗体医薬品などは細胞表面の標的分子に結合して機能する分子群であり、治療の対象は本質的に制限される。一方で、細胞内で生じるタンパク質間相互作用を阻害する創薬は、より多くの分子を標的にできることから大きな期待を集めている。しかし、細胞内のタンパク質間相互作用を精緻に制御するような分子の開発は極めて困難であり、未だ基盤技術の整備が進んでいない。本研究の成果は、この困難を突破し次世代の医薬品開発の端緒となるものである。

研究成果の概要（英文）：Protein-protein interactions in cells are the basis of life phenomena, and promising drug targets. However, it remains extremely difficult to develop the molecules that precisely control protein-protein interactions in cells. In this study, we aimed to create artificial molecules that function in cells. We worked on the development of a simple selection method for peptides that enable molecular delivery into cells. We also worked on the development of functional molecules suitable for delivery.

研究分野：複合新領域

キーワード：タンパク質 タンパク質工学 バイオ医薬品 バイオテクノロジー 分子設計

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内で生じるタンパク質間相互作用は生命現象の根幹であり、その阻害を機序とする創薬は大きな期待を集めている。しかし、タンパク質間相互作用はフラットで広大な界面を有するため、従来の低分子化合物による阻害は一般的に困難である。一方で、足場タンパク質に標的結合能を付与した「タンパク質性阻害剤」は、相互作用の点で優位であるが、細胞壁を通過できないという決定的な課題を抱える。その課題を取り除く、即ち、タンパク質を細胞内に送達する技術の開発は、次世代の創薬基盤として極めて重要な位置を占める。

### 2. 研究の目的

細胞膜透過性ペプチド(cell penetrating peptide、以下 CPP)は、細胞膜透過性を有するポリペプチド鎖の総称である。これまでに 1000 種類以上の配列が提案されており、目的タンパク質に連結するだけで細胞膜透過性を付与できる単純さが訴求力となって、研究ツールとしての利用が広がっている。しかし、1000 種類以上の配列の中から、用途に適した CPP を選択することは容易ではなく、技術的なボトルネックとなっていた。本研究では、タンパク質と CPP の連結体を簡便・並列に調製する手法の開発し、CPP の選択実験を容易にする技術開発を目的とした。また、それに加えて、細胞内に送達させる小型の人工タンパク質の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) タンパク質と CPP の連結体を簡便・並列に調製する手法の開発

CPP-タンパク質連結体を作製する場合の多くは、その全長をコードする DNA を含むベクターを構築し、大腸菌を宿主に発現・精製する。その場合 CPP の種類ごとにベクター構築・発現・精製が必要であり、配列探索の規模拡張が困難である。そこで、目的タンパク質と CPP を個別に調製し、試験管内で酵素反応によって連結する手法を提案する。酵素には、反応後に認識配列やタグドメインが残らない split intein を採用した。

#### (2) 細胞内に送達させる小型人工タンパク質の開発

CPP と連結させて細胞内に送達するタンパク質に関しては、小さいほど送達の効率が高いが、小さい程プロテアーゼ等による分解を受けやすいというジレンマがある。そこで、高い構造安定性を有する小型タンパク質を足場として、機能部位を付加する方法をとることとした。小型タンパク質にはユビキチンを採用した。

### 4. 研究成果

#### (1) タンパク質と CPP の連結体を簡便・並列に調製する手法の開発

目的タンパク質には GFP および 2 種類の GFP 点変異体を用い、CPP には細胞膜透過活性を有する代表的なペプチド配列である TAT 配列および SAP 配列を用いた。split intein には *Thermoplasma volcanium* を由来とする VMA intein の断片体(N-intein、C-intein)を利用した。目的タンパク質と N-intein の融合体は大腸菌を宿主とする発現系で調製した。菌体の破碎上清を、ヒスチジンタグを用いたニッケルキレートアフィニティクロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィによって精製し、SDS-PAGE において純度 90%以上と確認された試料を実験に用いた。また CPP と C-intein の融合体は化学合成により得た。逆相クロマトグラフィにおいて純度 90%以上と確認された試料を実験に用いた。

これらの断片を混和し、ライゲーション反応の進行を SDS-PAGE によって評価した。既報をもとに、各断片の濃度 250 nM、反応温度 37℃、反応時間 24 時間を定め、そこから条件を展開した。反応条件(温度、時間、pH、塩濃度、還元剤濃度)の検討を重ねたものの反応効率は十分でなく、副反応分解物が観察された。目的タンパク質によって反応効率が大きく異なることから、split intein と目的タンパク質との間に生じる相互作用が反応に影響していることが示唆された。また、これらの断片の相互作用を表面プラズモン共鳴を用いて分析したところ、CPP と N-intein、CPP と目的タンパク質のそれぞれにおいて、非特異的な相互作用が示唆された。中性付近において正に帯電した CPP と、負に帯電した N-intein および GFP が静電相互作用で結合したものと考察できる。

高効率に連結体を得られる反応系を構築するためには、適切なリンカー配列の導入、反応条件の更なる検討、ひいては反応条件に適した split intein のデザインが必要であると考えられ、今後の研究の進展に重要な知見が得られた。

#### (2) 細胞内に送達させる小型人工タンパク質の開発

##### 小型人工タンパク質(Ubiquitin based Binder: UbB)の設計

ユビキチンを足場タンパク質として利用するにあたって、36 番目のイソロイシンと 37 番目のプロリンで切断しても、自発的に高次構造を形成するという先行報告に着目した。即ち、36 番目のイソロイシンと 37 番目のプロリンの間に制限酵素サイトを挿入し、目的の機能性配列と差し替え可能なコンストラクトを開発し Ubiquitin based Binder(UbB)と命名した、その実用性の評価のために、p53(17-28)ペプチド配列を挿入した UbB\_p53 を作製し物性を評価した。UbB および UbB\_p53 はいずれも大腸菌で発現可能であり、可溶性画分からアフィニティクロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィで精製可能であった。

##### UbB の立体構造評価

精製した Ub および UbB\_p53 は、サイズ排除クロマトグラフィにおいて、いずれも単量体と思しき溶出時間にピークを示した、それらを分画し、円偏光二色性スペクトルで評価したところ、いずれも同様の二次構造を示した。立体構造を維持したまま、機能性配列が挿入されていることが確認できた(図 1)。

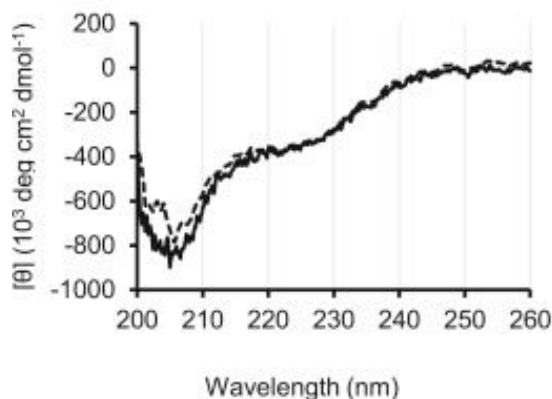


図 1 Ub および UbB\_p53 の円偏光二色性スペクトル (Ub : 実線、UbB\_p53 : 点線)

#### UbB の機能評価

次に UbB の機能評価を、標的タンパク質に対する親和性をもって評価した。p53(17-28)は Hdm2 に対して親和性を有するペプチド配列として知られる。Hdm2 の N 末端ドメインとの親和性を表面プラズモン共鳴法を用いて評価した。Hdm2 の N 末端ドメインは大腸菌を宿主とした発現系で発現、精製し、表面プラズモン共鳴法におけるセンサーチップにはアミンカップリングを介して連結し、親和性評価に供した(図 2)。

UbB\_p53 は、Hdm2 との親和性に関して、解離速度定数において 39.0 nM を示した。これは、p53(17-28) ペプチド単独の解離速度定数 (11.4 μM) と比較して、292 倍強い結合を表している。速度論的なパラメータを比較すると、UbB\_p53 は、p53(17-28) ペプチドと比較して、結合速度定数 ( $k_{on}$ ) が 259 倍大きく、解離速度定数は殆ど違いがなかった。これは、機能性部位が、足場タンパク質に組み込まれることによって立体構造的に制限を受けた状態となり、結果的に親和性が向上したものと考察できる。

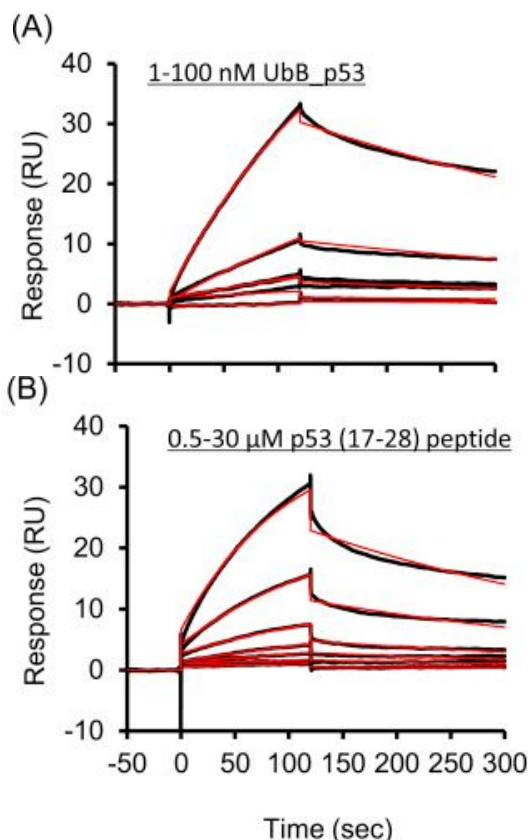


図 2 UbB\_p53(A)、p53(17-28)ペプチド(B)の Hdm2 に対する親和性センサグラム (測定データ：黒線、フィッティングカーブ：赤線)

#### 考察

ユビキチンを足場タンパク質として利用した分子設計は近年高い注目を集めている。ユビキチンの、分子量が小さく安定性が高いという物理化学的性質を備える。それに加えて、真核生物に広く保存されているという生物学的性質が、動物に対する投与試験からヒトに対する投与へとシームレスに実現できる点でアドバンテージになる。ユビキチンを足場とする人工分子の報告例は、表面残基をランダム化し、標的タンパク質に親和性を持つ分子をファージディスプレイ法などを利用して選別するというものが中心的である。本研究で開発した分子は、既知の機能性配列を挿入するという点で異なるアプローチである。ユビキチンを足場とする人工分子設計の可能性を拡げた成果と見なすことができる。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

( 1 ) Backbone Circularization Coupled with Optimization of Connecting Segment in Effectively Improving the Stability of Granulocyte-Colony Stimulating Factor , 宮房 孝光、渋谷 理紗、二島 渉、大原 璃恵、吉田 昼也、本田 真也 ,

(2) Structural insights into the backbone-circularized granulocyte colony-stimulating factor containing a short connector, 宮房 孝光、渋谷 理紗、本田 真也, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 500-2, pp.224-228, 2018/04 DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.045

(3) Generation of Ubiquitin-Based Binder with an Inserted Active Peptide, 宮房 孝光、広田 潔憲、本田 真也, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 503-4, pp.3162-3166, 2018/08 DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.110

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 主鎖環状化を利用した G-CSF の安定化改変, 宮房 孝光、渋谷 理紗、二島 涉、大原 璃恵、吉田 昼也、本田 真也, 生命科学系学会合同年次大会, 神戸、2017/12/06

(2) 主鎖環状化サイトカインの設計と物性評価, 宮房 孝光、渋谷 理紗、二島 涉、大原 璃恵、吉田 昼也、本田 真也, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟、2018/06/28

(3) Backbone Circularization Coupled with Optimization of Connecting Segment in Effectively Improving the Stability of G-CSF, 宮房 孝光、渋谷 理紗、二島 涉、大原 璃恵、吉田 昼也、本田 真也, PEGS Europe 2018, リスボン、2018/11/13

(4) G-CSF の主鎖環状化が構造安定性に及ぼす熱力学的効果, 渋谷 理紗、宮房 孝光、本田 真也, 生命科学系学会合同年次大会, 神戸、2017/12/06

(5) 主鎖環状化 G-CSF が持つ熱力学的安定性と構造安定性の解析, 渋谷 理紗、宮房 孝光、本田 真也, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟、2018/06/26

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

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

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。