

平成23年5月2日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20241054

研究課題名（和文）多成分蛍光標識ペプチドライブラリーを用いた薬剤検索システムの構築

研究課題名（英文） Construction of Drug-Discovering System by using Multiple

Fluorescent Labels on Peptide Library

研究代表者

宍戸 昌彦（SISIDO MASAHIKO）

岡山大学・大学院自然科学研究科・特命教授（研究）

研究者番号：60026268

研究成果の概要（和文）：がん細胞だけに特異的に結合するペプチドの探索は、世界の研究者が試みているがいまだに成功していない。その大きな原因は、生体中から離れた条件で探索が行われていることにある。本研究では、特定のがん細胞にだけ結合するペプチドを生体中に近い条件で探索する新手法を構築する。すなわち、多数の異なる蛍光基で標識されたペプチドライブラリーを作製し、その溶液を細胞と接触させて、細胞に結合あるいは導入されたペプチドをその蛍光スペクトルから同定する。これを繰り返すことによって、もっとも強く細胞に結合するペプチドを見出す。実際に、乳がん細胞に結合する8量体ペプチドを見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：A lot of researchers have been trying to discover peptides that bind onto specific cancer cells, however, without success. A major reason for the unsuccessful attempts may be that the discovery processes have been done under conditions far from the conditions inside the living body. The purpose of this project is to establish a novel screening process by using multiple fluorescent labels on peptide library. Putting a solution of the peptide library onto cancer cells and identifying those bound onto the cells with fluorescence spectroscopy, we found several cancer cell specific octapeptides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2009年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
2010年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
年度			
年度			
総計	34,300,000	10,290,000	44,590,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：蛍光性アミノ酸、ペプチドライブラリー、がん細胞、インビトロスクリーニング、ステルス標識、2次元蛍光スペクトル

### 1. 研究開始当初の背景

がんの診断や薬物輸送のためには、患者の体内でがん細胞だけに結合する分子（プローブ分子）が必要である。プローブ分子に放射性元素を結合させることによって、微小がんの診断が可能になるし、あるいは抗がん剤を結合させることによってがん細胞だけに薬剤を送達することができる。プローブ分子としては生体親和性に優れたペプチド分子が有望である。世界の多くの研究者が30年以上前からそのようなペプチドの探索に取り組んでいるが、いまだに決定的なものが見つかっていない。いままでの分子探索方法に問題があることは明らかである。問題の一つは、探索過程でペプチドをファージ（ウィルス的一种）や樹脂ビーズなどの担体に固定していることにある。担体に固定することによりペプチドはその分子構造を変化させるし、またペプチドが結合する相手である蛋白質も担体近傍ではその状態を変化させる。これらの問題を避けるため、本研究では一切の担体を用いない新規スクリーニング法を世界に先駆けて開発した。すなわち多数の蛍光基で標識したペプチド混合物（ライブラリー）を溶液のまま細胞と接触させ、細胞に結合した分子を蛍光スペクトルから同定する新方法（多成分蛍光標識法）を提案し、実行する。

### 2. 研究の目的

多成分蛍光標識ペプチド混合物を溶液中で細胞と接触させ、細胞に強く結合したものを

同定するための新方法を開発すること、またその新方法により実際にかん細胞結合ペプチドを見出すことが目的である。

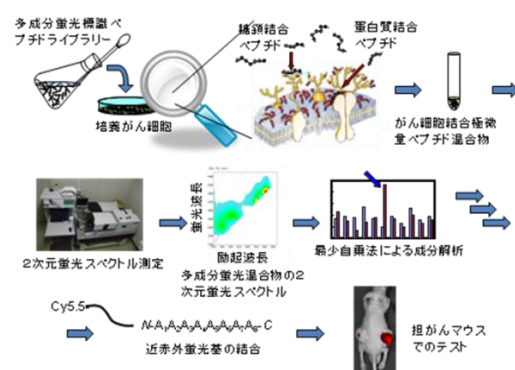


図1. 多成分蛍光標識ペプチドライブラリーを用いた溶液中でのペプチドスクリーニングの原理

### 3. 研究の方法

がん細胞に結合するペプチドはごく微量であり、また非常に多数種類の混合物である。この混合物中に含まれるペプチドを同定するためには、感度の点からは蛍光法が最適である。しかし1種類の蛍光基では異なるペプチドの区別は不可能なので、多種類の蛍光基を使う。多種類の蛍光基を側鎖にもつ蛍光性アミノ酸を合成し、それを通常のペプチド化学合成法でペプチドに導入した。このとき蛍光基自体が細胞に認識されるのを防ぐため、蛍光基の周囲を負電荷でブロックする「ステルス標識」法を考案した。また多種類の蛍光基を同時に定量するために、励起波長を変化させて蛍光スペクトルを測定する2次元蛍光スペクトル法を採用した。

### 4. 研究成果

(1) 蛍光性アミノ酸の作製

合成ペプチドを確実に蛍光標識するためアミノ酸側鎖に蛍光基を導入した蛍光性アミノ酸を作製した。これらの多くは現在企業から市販されている。

図2はそれらのアミノ酸の化学構造と、2次元スペクトルを示す。

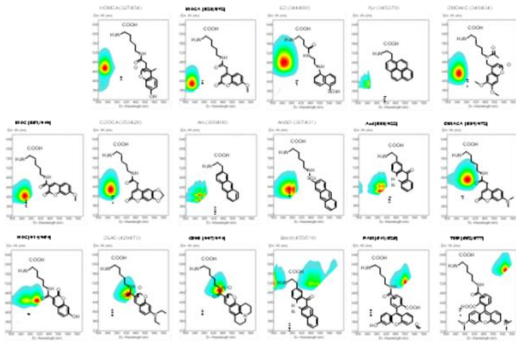


図2. 使用した蛍光性アミノ酸とそれらの2次元蛍光スペクトル

(2) 2次元蛍光スペクトルと最小自乗解析

多成分蛍光標識したペプチド混合物中で、それぞれの蛍光基がどれだけ存在するかを定量することが必要である。このため、蛍光スペクトルを励起波長を変化させて測定し、2次元でスペクトルを表示した。さらに混合物の2次元スペクトルから、個々の蛍光基の存在量を評価する最小自乗解析プログラムを作製した。これらの結果、最大で30種類程度の蛍光基を分離、定量できるシステムを作製した。

(3) ステルス蛍光標識

多成分蛍光標識法では、異なるペプチド群を異なる蛍光基で標識する。このとき個々の蛍光基の細胞親和性がペプチドのスクリーニングに影響を与えることが懸念される。蛍光基の特性を最小限に抑えるため、蛍光基の周囲に4個の負電荷を配置して、負に荷電した細胞との接触を抑制した。具体的には、各ペプチドのN末端にAc-e<sub>2</sub>-Fla-e<sub>2</sub>-Sp<sub>6</sub><sup>-</sup> (Ac=

acetyl, e=D-Glutamic acid, Fla= fluorescent amino acid, Sp<sub>6</sub>=hexa(ethylene glycol) unit)配列を導入することによって、蛍光標識を行った。

(4) がん細胞に結合するジペプチド単位スクリーニング

最初にスクリーニングにかけたペプチドは Ac-e<sub>2</sub>-Fla-e<sub>2</sub>-Sp<sub>6</sub>-x-x-x-o<sub>4</sub>-o<sub>5</sub>-x-x-x-NH<sub>2</sub> (x=mixture of 14 different D-amino acids, including, a, v, i, m, s, t, r, d, n, h, f, y, w, p), o<sub>4</sub>, o<sub>5</sub>= one of the same 14 D-amino acids)の配列を持つライブラリーである。特定の(o<sub>4</sub>, o<sub>5</sub>)ごとに異なる蛍光性アミノ酸を割り当て、どの蛍光基が細胞に結合するかを見ることによって、どのジペプチド配列がもっとも細胞に結合するかを知ることができる。その結果を図3に示す。

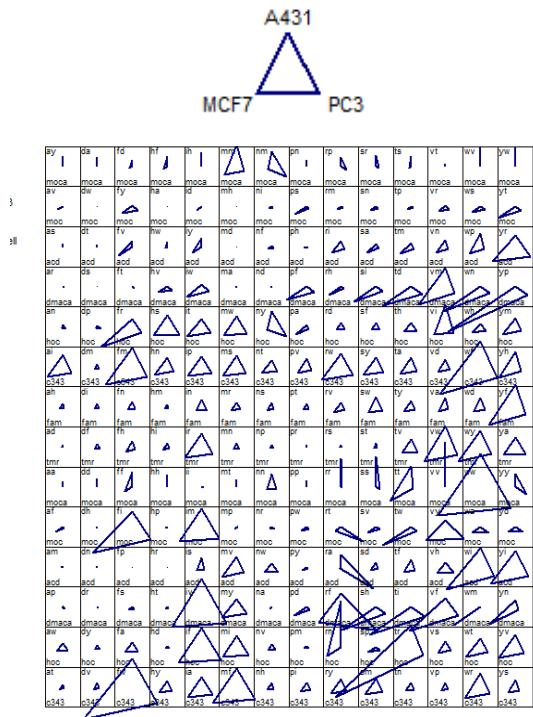


図3. ジペプチドユニットの3種類のがん細胞に対する結合力評価結果。

これらの結果からfwというジペプチド配列が

MCF7細胞に特異性があり、かつ結合力が高いことが分かった。

(5) さらに後段のスクリーニング

そこで4番目のアミノ酸をf、5番目をwに固定し、それ以外のアミノ酸を順次変化させてペプチドのスクリーニングを行った。その結果、このインビトロスクリーニングで特定のがん細胞にもっとも特異的に結合するペプチドを見出すことができた。現在この配列については特許申請準備中である。

(6) 成果のまとめ

本研究により、担体を使用せずに、効率的に特定のがん細胞に結合するペプチドを見出せることが明らかになった。近い将来、この手法でマウスに移植されたヒトがん細胞にもっとも特異的に結合するペプチドを見出す予定である。さらに将来は手法の自動化や効率化により、患者から取り出したがん細胞について、実用的なスクリーニングを行うシステム構築に進みたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計17件)

- ① M. Kitamatsu, T. Yamamoto, M. Futami, M. Sisido, Quantitative Screening of EGF Receptor-Binding Peptide by Using a Peptide Library with Multiple Fluorescent Amino Acids as Fluorescent Tags, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 5976-5978 (2010) 査読有
- ② M. Kitamatsu, K. Akagi, M. Sisido, Prevention of Absorption of Fluorescent Amino Acids to Gels by Using a Peptide Containing Dendritic Amino Acids, *Chem. Lett.*, 39, 1240-1241 (2010) 査読有
- ③ M. Taki, Y. Yamazaki, Y. Suzuki, M. Sisido, Introduction of a highly photodurable and common-laser excitable fluorescent amino acid into a peptide as a FRET acceptor for protease cleavage detection, *Chem. Lett.*, 39, 818-819 (2010) 査読有

- ④ M. Kitamatsu, M. Futami, M. Sisido, A Novel Method for Screening Peptides that Bind to Proteins by Using Multiple Fluorescent Amino Acids as Fluorescent Tags, *Chem. Comm.*, 46, 761-763 (2010) 査読有
- ⑤ Kawakami, M. Ikeuchi, J. Hirabayashi, M. Sisido, and M. Taki, N-Terminal Specific Point-Immobilization of Active Proteins by the One-Pot NEXT-A Method, *ChemBioChem*, 10(15), 2460-2464 (2009) 査読有
- ⑥ M. Taki, H. Kuroiwa, M. Sisido, Chemoenzymatic transfer of fluorescent nonnatural amino acids to the N-terminus of a protein/peptide, *ChemBioChem.*, 9(5), 719-722 (2008) 査読有

〔学会発表〕 (計約80件)

- ① M. Sisido, T. Fukuda, Multi-labeled fluorescent peptide library for *in situ* screening against cancer cells, *The 5th International Peptide Symposium*, Dec 12 (2010), Kyoto, Japan
- ② M. Taki, H. Kuroiwa, M. Sisido, Introduction of positron emission tomography(PET) probes at the N-terminus of peptide/protein by the NEXT-A reaction, *The 5th International Peptide Symposium*, Dec 12, 2010, Kyoto, Japan
- ③ M. Sisido, T. Fukuda, In vitro and in vivo peptide screening from peptide libraries labeled with multi-fluorophores, *The 13th Akabori Conference*, Sept. 13, 2010, Leipzig, Germany.
- ④ M. Kitamatsu, T. Yamamoto, M. Sisido, A Method for Screening Peptides Bound to EGFR by Using Multiple Fluorescent Amino Acids as Fluorescent Tags, *The 31st European Peptide Symposium*, Sept, 5, 2010, Copenhagen, Denmark.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宍戸 昌彦 (SISIDO MASAHIKO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：60026268

(2) 研究分担者

北松 瑞生 (KITAMATSU MIZUKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：60379716 (H20：連携研究者)