

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02791

研究課題名(和文) 棒状ウイルスの磁場配向による高選択的ファージディスプレイ法の開発

研究課題名(英文) Advanced phage-display method with high efficiency by magnetic orientation of rod-like viruses

研究代表者

石田 康博 (Ishida, Yasuhiro)

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：20343113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：M13ファージを用いたファージディスプレイ法は、望みの物質に選択結合するペプチドを得る有力な方法であるが、ファージ外殻は提示ペプチドより遥かに巨大なため、標的物質と非特異的に吸着したり、提示ペプチドと標的物質との相互作用を阻害したりすることで、吸着選択の効率を下げるのが懸念されてきた。一方で繊維状ファージは、磁場により配向できることが知られている。本研究では、ファージを標的物質表面に対し垂直に磁場配向させることで、ファージ外殻による標的物質への非特異吸着を抑制したり、ライブラリから選択されるクローン群の組成を変化させたりすることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2018年ノーベル化学賞の対象ともなったファージディスプレイ法が、その創設以来抱える問題(巨大なファージ外殻による吸着選択効率の低下)に対し、化学物質の添加を必要とせずクリーンな物理的刺激のみを用い、様々な標的物質に対し適応できる解決法を提示した。

研究成果の概要(英文)：Although phage display selection using a library of M13 bacteriophage has become a powerful tool for finding peptides that bind to target materials on demand, a remaining concern of this method is the interference by the M13 main body, which is a huge filament >1000 times larger than the displayed peptide, and therefore would nonspecifically adhere to the target or sterically inhibit the binding of the displayed peptide. Meanwhile, filamentous phages are known to be orientable by an external magnetic field. This work proved that the magnetic orientation of M13 filaments vertical to the target surface significantly affects the selection. When the target surface was affinitive to the M13 main body, this orientation notably suppressed the nonspecific adhesion. Furthermore, when the target surface was less affinitive to the M13 main body and intrinsically free from the nonspecific adhesion, this orientation drastically changed the population of M13 clones selected from the library.

研究分野：材料化学 超分子化学 高分子化学

キーワード：ファージディスプレイ法 分子進化学 親和性選択 ライブラリ 磁場配向

1. 研究開始当初の背景

我々は2013年より今日まで、様々な1次元・2次元ナノ構造体のコロイド分散液を強磁場中に置くことでナノ構造体を配向させ、その構造を系内重合反応で固定することにより、巨視的に配向した構造を持つ機能性ソフトマテリアルを開発してきた。その研究の途中、典型的な1次元名の構造体である繊維状ファージもまた、強磁場に対し平行に配向することを知り、当初は材料科学の観点から興味を持った。その後、繊維状ファージに関する情報を集めるうちに、ファージディスプレイ法が長年、「提示ペプチドより遥かに巨大なファージ外殻による吸着選別への干渉」という問題を抱えていることを知った。これら2つの知見を鑑みるに「ファージディスプレイ法を強磁場の中で行うことで、どのような磁場効果が得られるのか？」という問いは、学術的にも実用的にも極めて興味深く、本研究の端緒となった。

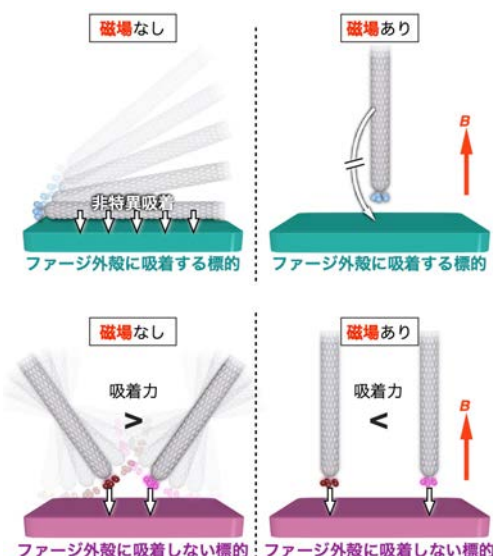


図1

2. 研究の目的

ファージディスプレイ法においてファージ外殻による吸着選別への干渉を軽減する方法として、ファージ外殻をポリマーで被覆したり、標的物質表面をブロッキング剤で被覆したりする方法がこれまでに提案されてきた。しかしながらこれらの方法は標的物質ごとに煩雑な条件最適化が必要であり、また、添加物(ポリマー・ブロッキング剤)による吸着選別への干渉という新たな問題を発生しうる。その一方、磁場は非接触・非破壊で繊維状ファージに直接作用できるクリーンな物理的刺激である。そこで本研究では、代表的な繊維状ファージであるM13ファージノライブラリを用いた吸着選別において、磁場が結果に与える影響を系統的に調べた(図1)。

3. 研究の方法

平滑基板形状を取る標的物質に対し、10テスラ磁場を特定の方向に印加しながらM13ファージのライブラリを相互作用させることで吸着選別を行い、磁場を印加しない状態での吸着選別の結果(吸着したファージの総量・吸着したファージの組成)を比べた。ファージ外殻が非特異的吸着を起こすシリカガラス(図1上)、ならびに、非特異的吸着を起こさない糖脂質(ガングリオシド)を代表的な標的物質として用いた(図1下)。

4. 研究成果

まず、ファージ外殻との非特異的吸着が無視できない標的物質の代表例として、シリカガラス基板を用いた。モデル実験として、ウイルス外殻による非特異的吸着のみが起きうる状況を作り出すべく、ペプチドを提示していない「ペプチド非提示ファージ」

(M13-Non)をシリカガラス基板に作用させた。まず、磁場を印加しない状態にて、M13-Nonのバッファー溶液をシリカガラス基板に接触させ、吸着したファージを洗浄回収したところ、予期した通り、多量(初期量の0.04%)のM13-Nonがシリカガラス基板に吸着した(図2左)。その一方で、磁場を基板に対し垂直に印加した状態にて同様の操作を行ったところ、M13-Nonの吸着量は磁場なしのそれにくらべ、7分の1(初期量の0.006%)まで減少した(図2中央)。ファージ外殻が基板表面に対し垂直配向することで、ファージ外殻と基板表面との接触頻度が減少し、非特異的吸着が抑制されたと考えられる。磁場印加の効果は磁場の方向に強く依存し、磁場を基板に対し平行に印加した場合には、非特異的吸着の抑制

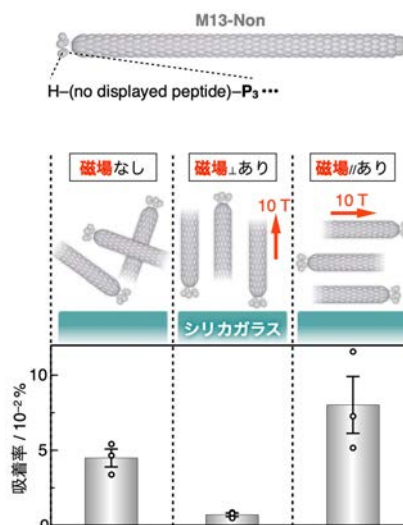


図2

が見られない (図 2 右) ことも、この機構を支持している。

上記とは対照的なモデル実験を行うべく、提示ペプチドによる吸着が支配的に起こる状況を作り出すべく、シリカに対し選択吸着することが知られているペプチドを提示した「シリカ吸着ファージ」(M13-Si) のモノクローナル体を調製した。上記と同様の手法により、M13-Si のシリカガラス基板への吸着挙動に与える磁場の影響を調べたところ、今度は磁場の有無に関わらず、一定量の吸着が起こることが明らかとなった (図 3)。一連の結果より、磁場によりファージ外殻を基板に対し垂直に配向させることで、提示ペプチドの特異的吸着には影響を与えずに、ファージ外殻の非特異吸着を抑制できることが分かった。

上記 2 つのモデル実験は、M13-Non または M13-Si 単独で行われている点において、異種クローンが共存する実際のファージディスプレイ法の状況を再現できていない。すなわち、両クローンが共存する状況で上記と同じ実験を行ったとき、この結果の重ね合わせではない現象が起きてしまうならば、磁場による非特異吸着抑制を実際のファージディスプレイ法に適用できないことになる。この懸念を排除すべく M13-Non と M13-Si の混合系 (比率 = 1:99 程度) を作成し、ガラス基板への吸着選別を通じて M13-Si を濃縮するモデル実験を行った。吸着選別後に回収されたファージを大腸菌培養し、無作為抽出した 100 個程度のコロニーの DNA 配列を読むことにより、両ファージの比率を見積もった。磁場なしで吸着選別した場合には、両クローンの比が 2:97 までしか偏らないのに対し、磁場を基板に対し平行に印加して吸着選別した場合には、両クローンの比が 11:89 まで偏ることが明らかとなった (図 4)。すなわち、磁場配向により「シリカ吸着ファージ」の濃縮率が 5 倍となり、標的物質とファージ外殻との非特異的吸着が懸念される状況において、ファージディスプレイ法による吸着選別効率の向上につながりうることが実証された。

以上の結果を受けて我々は、ファージ外殻が非特異的吸着を起さない標的物質についても、ファージの磁場配向が吸着選別の結果に影響を与えか否かを調べることにした。標的物質としては、協力研究者である松原・佐藤らにより通常のファージディスプレイ法に関する十分な知見が蓄積されており、単分子膜として平滑な基板に集積可能であり、なおかつ抗インフルエンザ薬開発に繋がりうる魅力を持つ糖脂質「ガングリオシド (図 5 上)」を選んだ (T. Matsubara et al. FEBS Lett. 1999, 456, 253.)。その際、少数種のファージクローンの吸着挙動を調べるのではなく、吸着選別と増幅を繰り返すことにより、約 10^9 種類のペプチドライブラリの中からガングリオシドに強く吸着するクローンを選び出す通常のファージディスプレイ法を、磁場なし・磁場ありの条件で行い、結果を比較した。その結果、磁場の有無に関わらず、吸着選別と増幅のサイクルを繰り返すごとに標的物質に対するライブラリの吸着量は増加し、3 サイクルの後、ガングリオシドに対して選択吸着する 5 つのクローン (以下、M13-G₁~M13-G₅ と表記) が得られた (図 5 下)。しかしながら興味深いことに、磁場の有無により 3 サイクル後に得られるクローン群の組成が異なっていた。すなわち、磁場なしの条件で得られるク

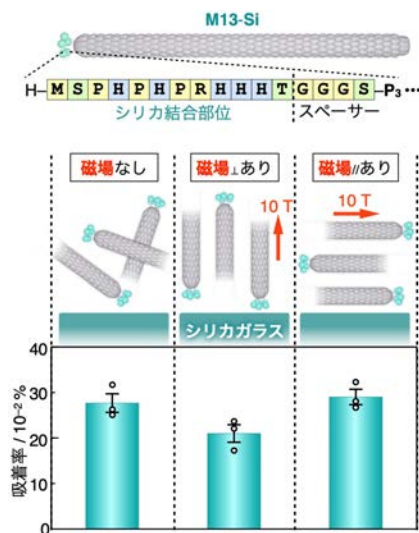


図 3

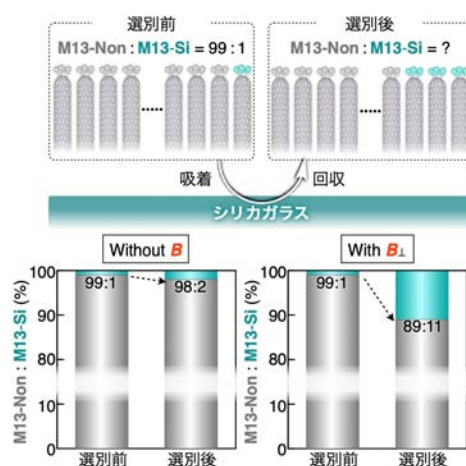


図 4

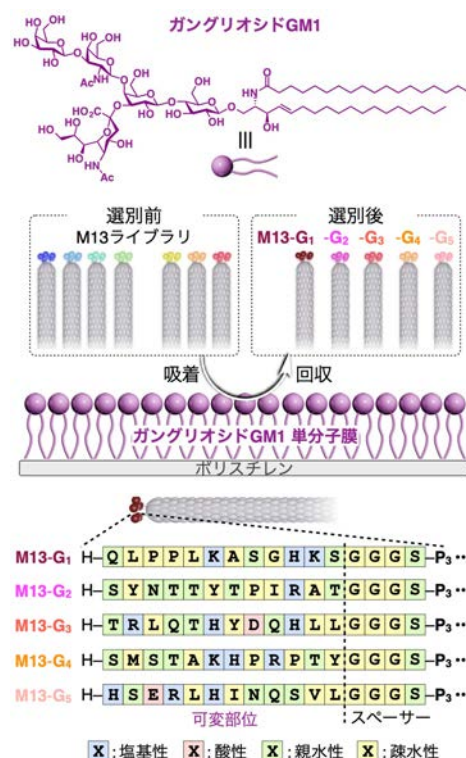


図 5

ローン群では M13-G₁ が最多 (全体の 50%)、M13-G₂ が次点 (全体の 39%) であったのに対し (図 6 左)、磁場ありで選別されるクローン群の中では M13-G₂ が最多 (全体の 61%) で M13-G₁ が次点 (全体の 17%) と、両者の組成が逆転した (図 6 右)。

この観察に加え、M13-G₁ と M13-G₂ のモノクローナル体をそれぞれ調製し、両者の当量混合物を磁場なし・磁場ありの条件にてガングリオシド単分子膜に対して作用させ、吸着された分画の組成を調べたところ、磁場なしでは M13-G₁ が主成分、磁場ありでは M13-G₂ が主成分となっており、ライブラリから吸着選別したときの傾向と良く一致した (図 7)。すなわち、磁場の有無による組成の逆転は、実験の誤差によるものではなく、極めて興味深い現象である。

そのメカニズムの詳細について、手がかりを得るべく M13-G₁ と M13-G₂ のペプチド部分 (以下、Pep-G₁、Pep-G₂ と表記) を化学合成し、標的物質の LB 膜に対する吸着挙動を水晶振動子マイクロバランス法 (QCM 法) により調べた。その結果、標的物質との会合定数においては、Pep-G₁ ($K_d = 1.6 \times 10^{-5} \text{ M}$) が Pep-G₂ ($K_d = 1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$) よりやや優れた値を示すものの、標的物質への最大吸着量においては、Pep-G₂ ($\Delta M_{\text{max}} = 145 \text{ ng/cm}^2$) が Pep-G₁ ($\Delta M_{\text{max}} = 100 \text{ ng/cm}^2$) を 1.5 倍以上回るという結果を得た (図 8)。これは、Pep-G₁ と Pep-G₂ とでは標的物質に対する吸着のメカニズムが異なっており、そのことがライブラリ選択において磁場の有無による両者の吸着順位の逆転につながっていることを示唆する。また、標的物質であるガンリオシドが負電荷を帯びていることを考えると、ペプチド中のカチオン性残基が吸着において重要な役割を担っていると予想される。

そこで Pep-G₁ および Pep-G₂ のアミノ酸配列について考察した。Pep-G₁ は 3 つのカチオン性残基 (リジン 2 個、ヒスチジン 1 個) を有し、それらはファージ本体から十分に離れたところに位置するのに対し、Pep-G₂ は 1 つのカチオン性残基 (アルギニン 1 個) しか有さず、しかもそれはそれらはファージ本体の近傍に位置していた。Pep-G₂ がファージ本体と結合した際、ファージ外殻からの立体障害の影響を受け、ファージ外殻が標的物質表面に対し垂直配向したときのみ Pep-G₂ 本来の結合能力が発揮されると仮定すると、今回の現象を説明することができる。今後、磁場なし・磁場ありの条件を併用してファージディスプレイ法を行うことにより、本来は標的物質への強い結合能力を持ちながらもファージ外殻からの立体障害により本来の能力を発揮できないペプチドを見落とすリスクを軽減できる可能性がある。

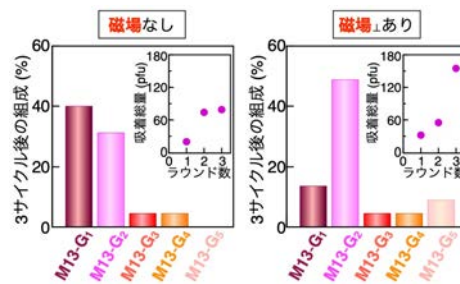


図 6

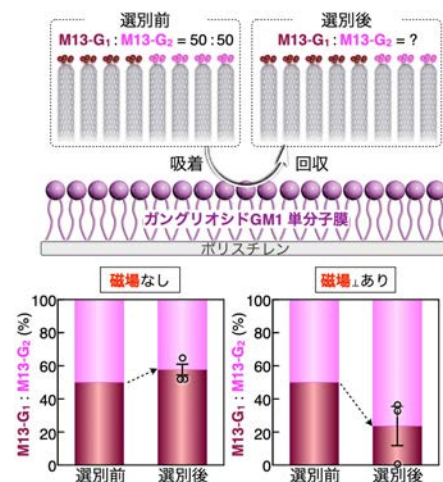


図 7

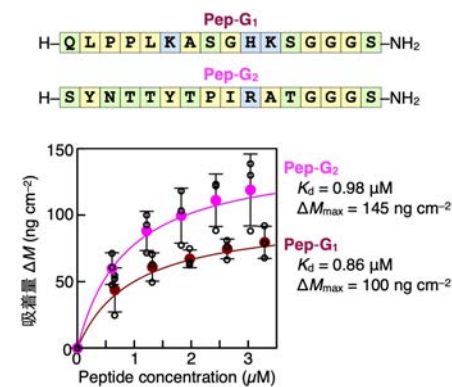


図 8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koki Sano, Naoki Igarashi, Yasuo Ebina, Takayoshi Sasaki, Takaaki Hikima, Takuzo Aida, and Yasuhiro Ishida	4. 巻 11
2. 論文標題 A mechanically adaptive hydrogel with a reconfigurable network consisting entirely of inorganic nanosheets and water	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-19905-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihiro Yamauchi, Noriko Nishizawa Horimoto, Kuniyo Yamada, Yoshitaka Matsushita, Masayuki Takeuchi, and Yasuhiro Ishida	4. 巻 60
2. 論文標題 Two-step divergent synthesis of monodisperse and ultra-long bottlebrush polymers from an easily purifiable ROMP monomer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 1528-1534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202009759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yasuhiro Ishida
2. 発表標題 Bioinspired Soft Materials with Anisotropic Structures
3. 学会等名 Biomaterials International 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田 康博
2. 発表標題 分子フラスコの科学:キラル分子の分離・検出・生産・配列
3. 学会等名 第 97回高分子若手研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Ishida
2. 発表標題 Macroscopically Oriented Helical Nanopores for Aligning Chromophores Noncentrosymmetrically
3. 学会等名 International CREST-CPL Conference (ICCC-2022) in Awaji (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 康博
2. 発表標題 コロイドが水中につくる巨大格子のテンプレート機能
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 王 樹旭、内田 紀之、石田 康博、相田 卓三
2. 発表標題 磁場で制御されるファージ集合体の可変秩序構造
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 康博
2. 発表標題 ついに実用的機能を発揮し始めた、らせん超分子ポリマー
3. 学会等名 CEMS Topical Meeting Online "超分子ポリマーの進化系"
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuhiro Ishida
2. 発表標題 Helical supramolecular polymers with rationally designed binding sites for chiral guest recognition
3. 学会等名 Molecular Chirality Asia 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 康博
2. 発表標題 生物に近づく精密ソフトマテリアル - 異方性・階層性・自立性 -
3. 学会等名 関東高分子若手研究会 秋の講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 康博
2. 発表標題 殆どが水でできたフォトニック結晶：光を操るための全く新しいツール
3. 学会等名 “光”機到来！Qコロキウム 第13回 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuxu wang, Yasuhiro Ishida, Noriyuki Uchida, and Takuzo Aida
2. 発表標題 Magnetically controllable phage assembly with centimeter sizescale
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------