

令和 5 年 10 月 30 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05756

研究課題名（和文）酵母に発現させた3重らせん型ランダムペプチドライブラリからの創薬リードの探索

研究課題名（英文）Discovery of drug leads from a random triple-helical peptide library constructed in yeast cells

研究代表者

増田 亮（MASUDA, Ryo）

早稲田大学・理工学術院・次席研究員（研究院講師）

研究者番号：90632159

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：3重らせんペプチドは生体内での酵素分解に強く抵抗するため、生物活性を有する3重らせんペプチドは医薬品のリードとなりえる。本研究では、ランダムなアミノ酸配列を有する3重らせんペプチドの分子集団（ライブラリ）を酵母内に構築し、そこからタンパク質に結合する3重らせんペプチドを選択するシステムを開発した。標的タンパク質を色素上皮由来因子、フォン・ウィルブラド因子、インテグリン $\alpha 1 \beta 1$ および $\alpha 2 \beta 1$ に結合する3重らせんペプチドを本ライブラリから探索したところ、新規の結合ペプチドを複数得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに生物活性を有するペプチドの取得は、ファージディスプレイ法等を利用して構築されたランダムペプチドライブラリから多くなされてきた。生体内での易分解性を克服するために環状ペプチドライブラリが広く用いられてきたが、そのケミカルスペースに含まれる生物活性ペプチドは探索し尽くされた感がある。3重らせんのランダムペプチドライブラリの構築は新しいケミカルスペースの探索を可能とするものであり、ペプチド創薬における新しい展開を期待させるものである。

研究成果の概要（英文）：Because Triple-helical peptides resist against degradation by proteases, bioactive triple-helical peptides are candidates of peptide drug leads. In this research, we constructed a random library of triple-helical peptide in yeast cells and established a selection system of protein-binding peptides from the library. We have already novel triple-helical peptides that bind to pigment epithelium-derived factor, von Willebrand factor, and integrin $\alpha 1 \beta 1$ or $\alpha 2 \beta 1$.

研究分野：ペプチド科学

キーワード：コラーゲン 3重らせんペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ペプチドは小分子化合物と抗体の中間に位置する分子量を有することから、小分子医薬品のような大量に安定して調製できる利点と抗体医薬のような標的分子に対する高親和性・高選択性を発揮できる利点を併せ持つことができる。したがって生物活性を有するペプチドは、医薬品のリードのモダリティとして有望である。

医薬品リードとなりえる生物活性ペプチドを取得するための手法の一つとして、ファージ等の発現系を利用して構築されたランダムなペプチドのライブラリからのセクションが挙げられる。しかし、一般的なペプチドは生体内ではプロテアーゼによって容易に分解されてしまい、医薬品への応用が困難である。その問題点を克服するために、近年では環状等に立体構造を固定したペプチドのランダムライブラリを構築し、そこからタンパク質に結合する生物活性ペプチドを取得する手法が主流となっている。しかし、環状構造を有するペプチドのランダムライブラリからの生物活性ペプチドの取得はこれまでに多くなされていることから新規の生物活性ペプチドの取得が早晩困難になると考えられる。したがって、新しい立体構造を有するランダムペプチドライブラリの構築はペプチド創薬において重要である。

申請者のグループではこれまでに、プロテアーゼによる分解に強く抵抗するペプチドとして3重らせんペプチドを見出している。3重らせん構造は天然ではコラーゲンに見られる構造であり、3本のポリペプチド鎖が縋り合わさることによって形成される。コラーゲン様のアミノ酸配列を有するペプチドもまた水溶液中で自発的に3重らせんを形成することができる。3重らせん構造は剛直な棒状構造であるためにプロテアーゼによって認識されにくく、これまでに血管中や消化管中に投与した3重らせんペプチドが代謝を受けずにほぼ定量的に排泄されることを見出している。

2. 研究の目的

本研究では、3重らせんを有するペプチドのランダムライブラリを生物発現系を利用して構築し、そこからタンパク質に結合する3重らせんペプチドを取得するシステムの確立を目的とする。そのために、ランダムな配列を有する3重らせんペプチドを prey として酵母内に発現させることでライブラリを作製することとした。その酵母を bait として標的タンパク質を発現させた酵母と接合し、2-ハイブリッド法をもちいてそれらの相互作用を検出する系を確立し、標的タンパク質に結合する3重らせんペプチドを取得することとした。

3. 研究の方法

(1)酵母-2-ハイブリッド法によるセクションを行うための系の構築には、Takara 社の Matchmaker Gold 酵母ツーハイブリッドシステムをもちいた。Bait として標的タンパク質を酵母内に発現させるために、pGBKT7 のベクターに該当遺伝子を組み込み、酵母へ transform した。Prey として3重らせんペプチドを酵母内に発現させるために、pGADT7 のベクターに該当遺伝子を組み込み、酵母へ transform した。

これらの酵母を混合することで酵母を接合させ、bait と prey を共発現する酵母を作製した。この酵母を選択プレートに播種し、bait と prey が相互作用する酵母クローンを選択した。これらの酵母クローンの選択は、His と Ade による栄養要求性、aureobasidin A による薬物抵抗性、および X- α -Gal の分解による発色によって行った。選択されたクローンのゲスト配列の同定は、DNA シークエンサーおよび次世代シークエンサー (NGS) によって行った。

(2)セクションによって取得したアミノ酸配列が標的タンパク質に結合するかを調査するために、*in vitro* での評価を行った。その評価のために、取得配列を有するペプチドを Fmoc 固相合成法により調製した。分取精製したペプチドは、規定の操作により、水溶液中における3重らせん構造形成を行った。溶液中における3重らせん構造形成の確認は、円偏光二色性スペクトルを解析することにより行った。

In vitro での評価は 96 well plate 上にコラーゲンをコートし、ブロッキング後、GST タグが融合した標的タンパク質と取得ペプチドを混合した溶液を添加することで、競合阻害実験を行った。コラーゲンに結合したタンパク質を抗 GST 抗体で検出することで、ペプチドの標的タンパク質への親和性を評価した。

4. 研究成果

(1) ペプチドライブラリのデザイン

3重らせんペプチドは、そのアミノ酸配列によって3重らせんの熱安定性が変化する。したがって多様な配列を有するペプチドが酵母内で3重らせん構造を形成できるようにするためには、デザイン上の工夫が必要となる。本申請研究では、ペプチドの3重らせん熱安定性を向上させるためのデザインとして、host-guest システムを採用した。host-guest システムは、3重らせんの熱安定性を向上させるイミノ酸リッチな配列からなる host 領域で、興味配列となる guest 領域を挟むデザインである。本研究では、guest 領域を NNK コドンでコードされるランダム配列とした。

ライブラリ内に含まれるペプチドの多様性は、酵母のコロニー数ベースで 1.2×10^6 であった。また、ランダム領域内に含まれるアミノ酸を次世代シークエンサーによって解析したとこ

る、それらは NNK コドンでコードされるアミノ酸の分布とほぼ一致するようにランダムであることがわかった。

2) 既知の相互作用の検出

酵母内で3重らせんペプチドとタンパク質の相互作用を2-ハイブリッド法で検出できるかを検証することとした。そのために、コラーゲン結合性タンパク質（および結合ドメイン）である色素上皮由来因子（PEDF）、フォンウィルブランド因子のA3ドメイン（VWF-A3）、インテグリン $\alpha 1$ およびインテグリン $\alpha 2$ の1ドメイン（integrin $\alpha 1$ あるいはintegrin $\alpha 2$ ）をbaitとして、それらに対するコラーゲン上の既知の相互作用配列を guest 領域に組み込んだペプチドとの相互作用の検出を確認した（発現させたアミノ酸配列とそれらに結合するタンパク質は表1にまとめた）。その結果、PEDFはペプチド1と、integrin $\alpha 1$ はペプチド2と、integrin $\alpha 2$ はペプチド3と、VWF-A3はペプチド4とのみ相互作用している様子が観察された（図1）。これらの結果から、本システムにおける酵母-2-ハイブリッド法によって、タンパク質と3重らせんペプチドの相互作用を高い特異性で検出できることが示された。

表1. 実験に用いたペプチドのゲスト配列

ペプチド	ゲスト配列	結合タンパク質
1	Lys-Gly-His-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly-Leu	PEDF
2	Pro-Gly-Leu-Pro-Gly-Glu-Asn-Gly-Pro	integrin $\alpha 1$
3	Pro-Gly-Phe-Pro-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro	integrin $\alpha 2$
4	Arg-Gly-Gln-Pro-Gly-Val-Met-Gly-Phe	VWF-A3

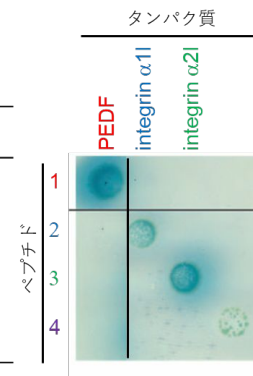


図1. 酵母-2-ハイブリッド法によるタンパク質とペプチドの相互作用の検出

3) ランダム3重らせんペプチドライブラリからのタンパク質結合ペプチドのセレクション

申請者が構築したランダムな3重らせんペプチドライブラリから、PEDF、VWF-A3、integrin $\alpha 1$ 、integrin $\alpha 2$ に結合するペプチドのセレクションを行った。

PEDFはコラーゲンと相互作用することで血管新生を阻害する作用を有しており、PEDFに結合するペプチドは創傷治癒材として利用できる可能性がある。PEDFに結合するペプチドを探索したところ、15個のアミノ酸配列を取得した。これらはコラーゲン上に存在しない非天然の配列であった。これらの配列を有する化学合成ペプチドをもちいて、PEDFに対する親和性を評価したところ、天然の結合配列を有するペプチド1に匹敵する親和性を発揮するペプチドを数個見出した。さらに、コラーゲン上でPEDFと同じ結合配列を共有するヘパラン硫酸に対するこれらのペプチドの親和性を評価すると、いくつかの配列はヘパリンへの親和性が低く、PEDFに高い親和性を有していることがわかった。

VWFはコラーゲンと相互作用することで血小板の凝集を促進する因子であり、VWFに結合するペプチドは血小板凝集阻害剤としての機能が期待できる。VWF-A3に結合するペプチドを探索したところ、4個のアミノ酸配列を取得した。これらはいずれもコラーゲン上に存在しない非天然の配列であった。これらの配列のVWF-A3に対する親和性を評価したところ、天然の結合配列を有するペプチド4よりも強い親和性を発揮するペプチドを見出した。

Integrinは細胞膜上に発現する受容体であり、コラーゲンとの相互作用を介して細胞の接着や伸展を促す。またintegrin $\alpha 2\beta 1$ は血小板凝集に必須な分子である。これらに結合するペプチドを探索したところ、integrin $\alpha 1$ に結合するペプチドとして数十個のクローンを得た。これらは非天然のアミノ酸配列ではあったが、配列中の特定位置にGluがされていた。インテグリンとコラーゲンの相互作用には、コラーゲン中のGluと金属イオンの配位が重要であることが報告されており、これらのペプチドは天然の結合配列と同様の結合様式を取っていることが示唆された。一方でintegrin $\alpha 2$ に結合するペプチドをセレクションしたところ、数千個のクローンを得た。それらをNGSで解析したところ、ゲスト領域にGluを含まない配列が存在していた。これらの配列を有する化学合成ペプチドでintegrin $\alpha 2$ への結合を評価したところ、その結合は金属イオンに非依存的であることがわかった。したがって、これらのペプチドのintegrin $\alpha 2$ への結合様式は天然のものとは異なる新規のものであることが示唆された。

以上より、本申請研究により、酵母内のランダムな3重らせんペプチドライブラリの構築、およびそこからタンパク質結合ペプチドの取得系の確立を行うことができた。本研究によって得られたペプチドについては、さらに生物活性を評価することによって医薬品リードとしての応用可能性を検証する。また、標的タンパク質を他のタンパク質に拡大することによってペプチド創薬における本手法の汎用性を検証する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 K.K. Fujii, Y. Taga, Y.K. Takagi, R. Masuda, S. Hattori, T. Koide	4. 巻 23
2. 論文標題 The Thermal Stability of the Collagen Triple Helix Is Tuned According to the Environmental Temperature.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 2040
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23042040	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryo Masuda, Khine Phyu Phyu Thant, Tetsuya Kadonosono, Takaki Koide
2. 発表標題 A METHOD FOR OBTAINING PROTEIN-BINDING PEPTIDES FROM A RANDOM TRIPLE-HELICAL PEPTIDE LIBRARY
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田亮
2. 発表標題 3重らせん型ランダムペプチドライブラリの構築と酵母2-ハイブリッド系による機能性配列の探索
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
研究分担者	小出 隆規 (Koide Takaki) (70322253)	早稲田大学・理工学術院・教授 (32689)	

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
---------	---------